



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Química Orgánica**

**Memoria para optar al grado de**

**Doctor en Ciencias Químicas**

Presentada por

**Laura Galán Fernández**

**Madrid, Junio 2015**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**Departamento de Química Orgánica**

Trabajo Original de Investigación

**SÍNTESIS DE SISTEMAS POLIHETEROCÍCLICOS BASADOS EN  
ANILLOS DE PIRIDINA, PIRAZOL E INDAZOL  
LUMINISCENCIA DE SUS COMPLEJOS CON LANTÁNIDOS Y SU  
APLICACIÓN EN EL MARCAJE DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA  
DETECCIÓN DE BACTERIAS RESPONSABLES DE SEPSIS**

**Madrid, Junio 2015**



## Agradecimientos

---

Esta tesis ha sido financiada por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid y por el Séptimo Programa Marco de la Unión Europea dentro del proyecto ACUSEP, Grant nº 259848, a quienes deseo expresar mi agradecimiento.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la dirección del Prof. Juan Carlos Rodríguez Ubis a quien deseo expresar mi más sincero agradecimiento por su apoyo, confianza y dedicación a lo largo de todo este tiempo. Quiero agradecer especialmente al Prof. Ernesto Brunet Romero la oportunidad que me concedió al permitirme formar parte de este grupo de investigación y a la Dra. Olga Juanes Recio por su ayuda, consejos, charlas y ánimo durante todo el tiempo que llevábamos trabajando juntas.

Agradezco al Departamento de Química Orgánica de la Universidad Autónoma de Madrid haberme permitido utilizar todos los medios técnicos de que dispone para la realización de este trabajo.

Quiero agradecer al Servicio de Investigación Interdepartamental (SIdI) los servicios prestados, al equipo de Maite (laboratorio de Espectroscopia de Masas), Loli y Antonio (laboratorio de RMN), Pascual y Luis (laboratorio de Análisis Químico Elemental), y muy especialmente a Rosa y a sus “Evas” del laboratorio de Cromatografía (a las que he vuelto locas con tanto oligonucleótido) por el esfuerzo, dedicación incluso fuera de su horario laboral y ánimo en momentos de caos.

A Fernando, Ángeles y especialmente Emilie porque parte de esta tesis es fruto de su esfuerzo, trabajo y dedicación.

I thank all my colleagues of Turku (Finland) for their kind attention, for their patience and for teaching me to work with the oligonucleotide's “microscopic world”: Minna, Emilia, Saara, Ulla, Tero, Ari and Harri.

Agradecer a todos los compañeros de laboratorio que he tenido (especialmente María y Lauri) y a los que tengo actualmente (Ele y Arturo ¡sois magníficos!) que me han aguantado, animado, ayudado y me han hecho pasar grandes momentos.

A todos mis vecinos de laboratorio, especialmente a Alfonso (mi “maestro” junto con Jorge en mis comienzos en la investigación), Abraham, Irene, Cinthya y Ruth, mi “guía laboral”, amiga y compañera en los trayectos de tren y días de nieve.

A Bea y Vanesa, las cuales siempre están disponibles para que el departamento y el laboratorio funcione; Mati y Feli las limpiadoras más divertidas de toda la facultad, y Richard por sus largas conversaciones, cotilleos y diversión.

A mis compañeros de risas y comidas: Mariam, Marine, Satoko, Edu, Andrés, Fabrice, Mikel y Manu con los que he pasado grandes momentos y han sido partícipes indirectamente de esta tesis con su apoyo, consejos y locuras; y especialmente a Ricardo por su ayuda incondicional, por momentos memorables y lo más importante, por su amistad ¡gracias a todos!

A mis dos “Raqueles”: una, amiga desde del colegio (qué tiempos aquellos de risas, cartitas y anécdotas que incluyen alguna foto); la otra, que empezó siendo la amiga de los veranos en el pueblo y se acabó convirtiendo en la amiga de todas las estaciones del año... Gracias por ser como sois, por estar siempre ahí y sobretodo por vuestra amistad a lo largo de todos estos años y los que nos quedan ¡qué haría sin vosotras!

Marimar, Ángel, Raúl, Toni, Silvia, César, Soraya, Mario... siempre hacen que me lo pase genial con ellos ¡sois el alma de fiesta!

A mis compañeros de la carrera y del Máster, en especial a Mari y a Josefina, porque aunque están “lejos” siempre están preocupándose por mí.

A mis chicos NOVA: Jesús por ser el artífice de la nueva yo gracias a su dedicación, consejos y ayuda no sólo como entrenador sino como amigo, Iván, Álvaro, Richy, Aarón, Sergio, Superman (Christopher), Julián, Gustavo, Rubén, César, Manu, Koke, Dani’s, Abraham, Pablo, Carlos’s, Simón, Javi, Juancar, Pelayo y Pepe, gracias a todos por “darme caña”, hacerme reír en cuanto entro por la puerta, estar pendientes de mí en todo momento y tratarme como una princesa dentro de su “reino varonil”. Por supuesto a mis chicas NOVA: Linda, Fina y especialmente a Irene e Isa, que me ayudan a aportar el “ambiente femenino” al lugar, además de darme su apoyo y complicidad.

A mis tíos y primos (vosotros sabéis quiénes) por estar siempre ahí.

Por último, las personas más importantes de mi vida y a las que va dedicada esta tesis, a mis padres y a mi hermana por su cariño, paciencia y comprensión, porque sin su apoyo nunca habría llegado hasta aquí y hacen que el día a día sea mucho más fácil aunque en muchas ocasiones no sea nada fácil aguantarme... ¡Os quiero mucho!

A todos, muchísimas gracias.

*“El éxito consiste en obtener lo que se desea.*

*La felicidad, en disfrutar lo que se obtiene.”*

**Ralph Waldo Emerson (1803-1882)**  
poeta y pensador estadounidense





## Contenidos

---

1.	Introducción y antecedentes.....	13
1.1.	Iones lantánidos .....	17
1.2.	Luminiscencia de los iones lantánidos en complejos orgánicos .....	19
1.2.1.	Eficiencia de los quelatos .....	21
1.2.2.	Estructuras de ligandos sensibilizadores de iones lantánidos .....	24
-	Ligandos de estructura abierta .....	24
-	Estructuras macrocíclicas con heterociclos incluidos en el anillo.....	29
-	Estructuras macrocíclicas con brazos heterocíclicos.....	31
-	Estructuras macrobíclicas o criptandos.....	34
1.3.	Luminiscencia de los lantánidos en el ámbito biomédico.....	36
1.4.	Proyecto ACUSEP (Integrated whole blood acoustophoresis and homogeneous nucleic acid detection cartridge for rapid sepsis diagnostics) (7º Programa Marco de la U.E., área de salud).....	39
1.4.1.	Aportación de la acustoforésis en la determinación de la concentración del organismo patógeno en sangre.....	43
1.4.2.	Detección de ácidos nucleicos usando sondas quelato de lantánidos .....	44
1.4.3.	Cartucho de integración acustoforética de la sangre y amplificación nucleica ..	45
1.4.4.	Expectativas del proyecto .....	46
2.	Objetivos .....	51
3.	Resultados y discusión. Síntesis.....	63
3.1.	Ligandos biperazólicos derivados de la 4-bromo-2,6-difluorpiridina .....	63
3.2.	Ligandos monosustituidos derivados de la 4-bromo-2,6-difluorpiridina.....	68
3.2.1.	Síntesis de ligandos monopirazólicos.....	70
3.2.2.	Síntesis de ligandos monoindazólicos .....	74
3.2.3.	Síntesis de ligandos monopirazólicos con restos iminodiacético .....	79
-	Síntesis de ligandos con restos iminodiacético modificado.....	87
3.3.	Síntesis de los ligandos sustituidos por 3-carboxiheterociclos y 5-aminoindazol .....	91
3.3.1.	Síntesis de ligandos sustituidos por 3-carboxipirazol y 5-aminoindazol.....	95
3.3.2.	Síntesis de ligandos sustituidos por 3-carboxiindazol y 5-aminoindazol .....	103
3.4.	Síntesis de los ligandos sustituidos por 3-carboxiindazol y 6-aminoindazol.....	116
3.4.1.	Síntesis de los 6-amino-1-indazolil derivados .....	118
3.4.2.	Síntesis de 6-amino-2-indazolil derivados.....	120

4.	Resultados y discusión. Complejación .....	127
4.1.	Estudio de complejación por formación de sus complejos con Ln(OTf) <sub>3</sub> .....	129
4.1.1.	Ligandos monopirazólicos .....	129
4.1.2.	Ligandos monoindazólicos .....	133
4.1.3.	Ligandos iminodiacético .....	135
4.2.	Estudio de complejación mediante formación de complejos ternarios .....	138
4.2.1.	Complejos ternarios con poliazacoronas DO <sub>2</sub> A y DO <sub>3</sub> A .....	140
4.2.2.	Complejos ternarios con EDTA.....	144
4.2.3.	Complejos ternarios con éteres corona .....	161
-	Ligandos monosustituidos.....	163
-	Ligandos disustituidos 5-aminoindazol / 3-carboxipirazol .....	171
-	Ligandos disustituidos 5-aminoindazol / 3-carboxiindazol .....	176
-	Ligandos disustituidos 6-aminoindazol / 3-carboxiindazol .....	180
•	Isómeros 6-amino-1-indazolil.....	181
•	Isómeros 6-amino-2-indazolil.....	184
5.	Resultados y discusión. Conjugación e hibridación .....	191
5.1.	Conjugación de los oligonucleótidos con el quelato portador de iones (ICC) .....	194
5.2.	Conjugación de los oligonucleótidos con los ligandos antena (AL).....	197
5.3.	Luminiscencia en las reacciones de hibridación .....	203
6.	Conclusiones.....	213
7.	Parte experimental .....	217
7.1.	Materiales y métodos .....	217
7.2.	Síntesis de los ligandos .....	219
7.2.1.	Procedimientos generales .....	219
7.2.2.	Ligandos bipirazólicos derivados de la 4-bromo-2,6-difluorpiridina.....	222
7.2.3.	Ligandos monosustituidos derivados de la 4-bromo-2,6-difluorpiridina .....	225
7.2.4.	Ligandos sustituidos por 3-carboxipirazol y 5-aminoindazol .....	254
7.2.5.	Ligandos sustituidos por 3-carboxiindazol y 5-aminoindazol.....	262
7.2.6.	Ligandos sustituidos por 3-carboxilindazol y 6-aminoindazol.....	271
7.3.	Formación de los complejos .....	279
7.4.	Síntesis del quelato portador de iones (ICC).....	281
7.5.	Reacciones de conjugación e hibridación .....	283

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---



## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

Lantánidos, luz y luminiscencia, son tres palabras que despiertan fascinación. La primera porque tiene su origen en la palabra griega *lanthanein* cuyo significado es “mentira escondida”, y la segunda, porque se asocia con la vida y su origen con el Big-Bang. En cuanto a la luminiscencia, tiene sus raíces en la mitología y antiguamente producía curiosidad y superstición, era a la vez admirada y temida debido a fenómenos tales como las auroras boreales, la luz del mar, animales y piedras luminosas, relámpagos, maderas fosforescentes e incluso el brillo de los ojos.

Fue Georges Stokes, en 1852, mediante el uso de filtros y prismas, quien demostró que la luz incidente de una región espectral era absorbida y transformada por la disolución en una luz emitida en una región espectral diferente, con mayor longitud de onda. Esta emisión luminiscente desaparecía, aparentemente, de forma instantánea cuando se apagaba la luz incidente, tal como lo hacían los espatos minerales. Stokes estableció la palabra fluorescencia procedente de flúor-spar (espatos, en inglés).

El descubrimiento realizado por el zapatero Vincenzo Cascariolo de la piedra de Bolonia en 1603, primer fósforo inorgánico descrito (actualmente identificado como sulfato de Bario dopado por iones metálicos tales como Zn(II), Sn(II) y Cd(II)), dio lugar a la definición de la fosforescencia como el fenómeno por el cual ciertas sustancias presentan la propiedad de brillar durante largo tiempo después de ser excitadas. El término luminiscencia fue introducido en 1888 por el físico e historiador científico alemán Eilhard Wiedemann para abarcar los dos fenómenos, la fluorescencia y la fosforescencia.

En la actualidad, la luminiscencia se define como el proceso por el cual un material genera emisión de luz (proceso radiativo), cuando es excitado con una cierta cantidad de energía.

Los dos tipos de luminiscencia mencionados se ponen de manifiesto en nuestra vida diaria debido a las múltiples aplicaciones que tienen. Algunas de ellas son:

- Los tubos fluorescentes en cuyo interior hay un vacío parcial y una pequeña cantidad de mercurio. Una descarga eléctrica en el tubo causa que los átomos de mercurio emitan luz. La luz emitida se encuentra en el rango ultravioleta (UV), y es por lo tanto invisible para nuestros ojos, pero el tubo al encontrarse revestido con una capa de un material fluorescente llamado *fósforo*, absorbe la luz ultravioleta y la emite en el espectro visible.

- El LED de luz blanca en el cual el semiconductor emisor produce luz en la parte azul del espectro, la cual choca con un compuesto fluorescente depositado en el chip; produciendo una emisión en la región verde y roja del espectro. La combinación de la luz azul que pasa a través del fluorescente y la luz emitida por el mismo produce una luz casi blanca.
- En microscopía de fluorescencia de tejidos, células o estructuras subcelulares se consigue marcando selectivamente las zonas a observar con fluoróforos y permitiendo que aquellos encuentren sus zonas de máxima afinidad revelando una imagen de éstas.
- En la secuenciación automática de ADN por el método de terminación de la cadena ya que los desoxiribonucleótidos se encuentran marcados con un fluoróforo específico, de tal forma que se generan cadenas de diferente longitud y que, al ser sometidas a una fuente de UV, se puede determinar la base nitrogenada terminal de cada cadena debido a que la longitud de onda emitida es característica para cada fluoróforo.
- En la detección de ADN mediante el uso del bromuro de etidio, el cual presenta libertad conformacional en disolución y como consecuencia poca fluorescencia. Su fluorescencia aumenta enormemente cuando se une al ADN debido a que el bromuro de etidio se sitúa entre las bases de forma paralela, provocando su inmovilización y un aumento de la señal fluorescente que permite visualizar la localización exacta de fragmentos de ADN con el método de electroforesis en geles de agarosa.
- En inmunología, en el que el sistema de reconocimiento antígeno-anticuerpo puede ser puesto de manifiesto y cuantificarse empleando la fluorescencia en el caso de marcarse cualquiera de las dos especies mediante una sonda fluorescente.
- En los monitores y televisores basados en un tubo de rayos catódicos, en los que la existencia de materiales luminiscentes electrosensibles provocan que el haz de electrones que va realizando un barrido de la pantalla origine una persistencia de la imagen entre barridos sucesivos.
- En gemología, mineralogía, geología y ciencias forenses. Muchos tipos de calcita y ámbar presentan fluorescencia bajo luz ultravioleta de onda corta; los rubíes, las esmeraldas y el diamante Hope exhiben fluorescencia roja bajo luz UV de onda corta; los diamantes también emiten luz bajo rayos X. El petróleo emite fluorescencia en un rango de colores, desde el marrón mate para aceites pesados y alquitrán hasta el amarillento y blanco azulado para los aceites muy livianos y condensados. Este fenómeno es usado en perforaciones hechas para la exploración de petróleo permitiendo identificar pequeñas cantidades de crudo en las perforaciones y en los poros de las muestras.

A la vista de las aplicaciones mencionadas, ambos fenómenos luminiscentes pueden considerarse como algo cotidiano y multidisciplinar debido a que son fenómenos que aparecen en diversos ámbitos y en los que es necesario un desarrollo continuo para la mejora e implementación de nuevas aplicaciones. La clave de este desarrollo reside en la optimización e investigación de nuevos compuestos luminóforos que sean capaces de cubrir las necesidades que puedan ir surgiendo y fomentar el progreso tecnológico.

Entre los compuestos o especies químicas que producen estos fenómenos se encuentran los de naturaleza puramente orgánica, que se caracterizan por tener electrones capaces de absorber energía en forma de radiación ultravioleta y/o visible, excitándose para después emitir parte de esa energía en forma de luz; o estructuras de complejos metálicos en los que el metal participa activamente en los procesos de emisión de luz. Ambos se presentan casi siempre como sistemas conjugados  $\pi$  o en forma de complejos metálicos. En el primer caso, los niveles de energía que alcanzan los electrones son orbitales  $\pi^*$  generados a partir de enlaces sencillos y dobles alternados, mientras que los cromóforos de complejos metálicos surgen de la división de orbitales  $d$  al unir metales con ligandos.

Tanto los sistemas  $\pi$  como los complejos metálicos presentan como principal ventaja que son muy versátiles en cuanto a sus aplicaciones, pero en el caso de los sistemas conjugados existe una gran limitación en cuanto a la síntesis de nuevas estructuras, ya sea por la imposibilidad de conocer, *a priori*, las propiedades de nuevas estructuras, como por el acceso a estructuras concretas y sus posibles modificaciones estructurales. En el caso de los complejos metálicos su síntesis está mucho más abierta al desarrollo de nuevas estructuras y ofrecen muchas más posibilidades de innovación, por lo que puede ser el mejor camino para la optimización y el desarrollo de aplicaciones.

Los complejos metálicos para este tipo de aplicaciones se forman en ocasiones con metales de transición. Dichos metales se caracterizan por presentar electrones que, por un lado, les confieren las características físicas de maleabilidad, ductilidad, brillo y conductividad tanto térmica como eléctrica y por otro presentan niveles electrónicos con lo que producen fenómenos luminiscentes. En este sentido existen dos factores que limitan enormemente el número de iones de estos metales que pueden formar quelatos fluorescentes:<sup>1</sup> i) muchos de estos iones son paramagnéticos, lo que hace que aumente la velocidad de cruce entre sistemas al estado triplete y que la desactivación por fluorescencia sea poco probable, aunque puede observarse fosforescencia, y ii) los complejos de los metales de transición se caracterizan por presentar muchos niveles

---

<sup>1</sup> a) C.N. Reilly, B.W. Good, J.F. Desreux, *Anal. Chem.*, **1975**, *47*, 2110. b) I. Bertini, P. Turano, A.J. Vila, *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 2833.

de energía poco espaciados lo que aumenta la probabilidad de desactivación por conversión interna.

Una de las familias que no se encuentra limitada por los dos factores comentados y que pueden formar quelatos fluorescentes es la serie de los lantánidos. Los iones lantánidos son una familia de elementos con propiedades químicas muy parecidas debido a la similar configuración electrónica de sus capas externas, sin embargo el diferente número de electrones  $f$  para cada uno de ellos provoca la aparición de niveles electrónicos muy diferentes para los distintos iones. Estos niveles son susceptibles de ser poblados mediante excitación por radiación ultravioleta provocando una emisión de luz característica, dando lugar a unas bandas de emisión exclusivas para cada ion. Estas propiedades luminiscentes se han venido utilizando tradicionalmente en dispositivos de visualización y los largos tiempos de emisión observados en ciertas condiciones han provocado un interés creciente y reciente fundamentalmente en el área biomédica, como sensores para especies como  $H^+$  y  $O_2$ ,<sup>2</sup> como marcadores luminiscentes en inmunoensayo,<sup>3</sup> en marcaje de proteínas, en el análisis de ADN y ARN y en general en todas aquellas aplicaciones bioanalíticas donde se requieran sensibilidades muy elevadas, ya que los tiempos de vida permiten discriminar señales fluorescentes del material biológico, habiéndose llegado a detectar cantidades del orden del femtogramo.<sup>4</sup>

Los iones lantánidos también pueden emplearse en aplicaciones no luminiscentes como en las determinaciones estructurales en disolución,<sup>5</sup> en la catálisis de la ruptura de los enlaces fosfodiéster en ADN y ARN<sup>2</sup> y concretamente con el ion gadolinio (Gd), como agente de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI),<sup>6,7</sup> mientras que los isótopos radiactivos de los complejos de estos elementos pueden ser usados en medicina nuclear para diagnóstico y terapia.<sup>8</sup>

---

<sup>2</sup> D. Parker, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 205, 109.

<sup>3</sup> a) E. Soini, T. Lövgren, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **1987**, 18, 105; b) A. Mayer, S. Neuenhofer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, 33, 1044; c) E.F. Gudgin Dickson, A. Pollak, E.P. Diamandis, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **1995**, 27, 3; d) M. Elbanowski, B. Makowsda, *J. Photochem. Photobiol. A.*, **1996**, 99, 85.

<sup>4</sup> J.-C. G. Bünzli, C. Piguet, *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, 34, 1048.

<sup>5</sup> a) J.H. Forsberg, *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, Ed. Elsevier, **1996**. b) C. Piguet, C.F.G.C. Geraldès, *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, Ed. Elsevier, **2003**.

<sup>6</sup> A.E. Merbach, E. Tóth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, Ltd., **2001**.

<sup>7</sup> a) E. Toth, L. Helm, A.E. Merbach, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, Ed. Willey, **2001**. b) P. Caravan, J.J. Ellison, T.J. McMurry, R.B. Lauffer, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2293.

<sup>8</sup> a) D. Nayak, S. Lahiri, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **1999**, 242, 423. b) T.A. Kaden, *Dalton Trans.*, **2006**, 3617.



## 1.1. Iones lantánidos

Los lantánidos son los 14 elementos que van después del lantano (La) en la tabla periódica y que tienen como números atómicos aquellos que van del 58 al 71. En ellos, los 14 electrones  $4f$  se colocan sucesivamente a la configuración electrónica del La ( $[\text{Xe}(4f^05d^16s^2)]$ ). Generalmente, el estado de oxidación de los iones lantánidos es +3, aunque alguno de ellos, en ocasiones, puede encontrarse en otros estados de oxidación como es el caso del cerio que es +4 y samario, iterbio y europio con un estado de oxidación +2. El radio iónico toma valores desde 1,2 a 0,861 Å, dependiendo de su estado de oxidación, del ligando y del número de coordinación. El número de átomos dadores en la primera esfera de coordinación se encuentra entre 6 y 12, pero la coordinación más habitual está en 8 y 9.<sup>9</sup>

Como se acaba de comentar, los complejos de iones lantánidos son capaces de absorber la radiación ultravioleta y emitir parte de esta energía en forma de luz. En los metales de transición, los electrones excitados  $d$  están fuertemente acoplados con el entorno a través del campo ligando, por lo que se abren vías de desexcitación no luminiscentes muy eficaces. En los iones lantánidos, las transiciones electrónicas de más baja energía se realizan en la capa  $4f$ , y estos orbitales, al estar aislados del entorno por las capas más externas  $5s$  y  $5p$ , están muy débilmente involucrados en la coordinación. Esto conlleva a que la multiplicación de los estados electrónicos por efecto del campo ligando sea menor y de menor energía, lo que hace que se produzcan saltos energéticos lo suficientemente grandes como para que las transiciones luminiscentes sean efectivas. Además, debido al apantallamiento de los electrones  $4f$ , los niveles electrónicos de un ion dado permanecen prácticamente invariados sea cual sea su entorno.

Los espectros de emisión de los cationes lantánidos están formados por bandas a distintas frecuencias, estrechas y bien definidas, llamadas *emisiones línea*, que se corresponden cada una a la transición desde el estado excitado de menor energía a uno de los subniveles del estado fundamental, siendo estas frecuencias características de cada ion. Las propiedades químicas de los lantánidos son similares, pero sus propiedades luminiscentes son bastante diferentes, pudiéndose clasificar de acuerdo a estas últimas en tres grupos:

- La, Gd y Lu, no presentan luminiscencia debido a la elevada diferencia de energía entre el nivel excitado más bajo en energía y el estado fundamental ( $\Delta E=32000 \text{ cm}^{-1}$ ).

<sup>9</sup> J.C.G. Bünzli, G.R. Choppin, *Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences, Theory and Practice*, Elsevier, 1989.

- Pr, Nd, Ho, Er, Tm e Yb, muestran luminiscencia débil. La diferencia energética entre los estados excitados más bajos en energía y el estado fundamental es relativamente pequeña, haciendo posible, y muy competitiva, la desexcitación por vía no radiativa.
- Sm, Eu, Tb y Dy muestran una mayor eficacia de luminiscencia, debido a que poseen unas diferencias energéticas apropiadas entre sus estados emisores y el fundamental, las cuales corresponden a valores de  $\Delta E$  de 7400, 12300, 14200 y 7850  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente.<sup>10</sup>

En la Figura 1 se muestran los niveles de energía de los lantánidos que presentan luminiscencia (Eu, Tb, Sm y Dy), comparados con los niveles de energía del Gd.

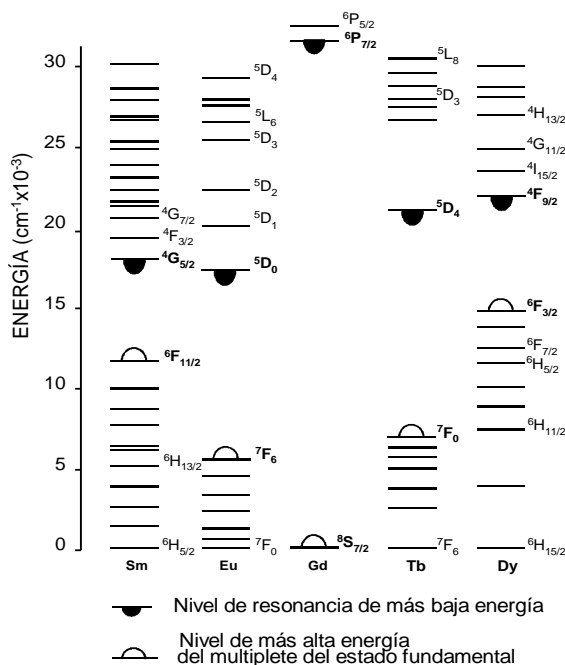


Figura 1.- Niveles de energía de los lantánidos Sm, Eu, Gd, Tb y Dy

Las bandas de emisión características de los cationes Eu, Tb, Sm y Dy desde sus niveles de resonancia (estados excitados que dan origen a emisiones lumínicas) se muestran en la Tabla 1.

<sup>10</sup> W. de W. Jr. Horrocks, M. Albin, *Prog. Inorg. Chem.*, **1984**, 31, 1.

	Transición	$\lambda$ Emisión (nm)	Intensidad Relativa
<b>Europio</b>	$^5D_1 \rightarrow ^7F_0$	526	débil
	$^5D_1 \rightarrow ^7F_1$	537	débil
	$^5D_1 \rightarrow ^7F_2$	558-560	débil
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_0$	578-580	débil
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_1$	585-600	intensa
	<b><math>^5D_0 \rightarrow ^7F_2</math></b>	<b>610-630</b>	<b>muy intensa</b>
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_3$	645-660	débil
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_4$	680-705	media
	$^5D_0 \rightarrow ^7F_5$	710	débil
<b>Terbio</b>	$^5D_4 \rightarrow ^7F_6$	485-500	media
	<b><math>^5D_4 \rightarrow ^7F_5</math></b>	<b>540-555</b>	<b>muy intensa</b>
	$^5D_4 \rightarrow ^7F_4$	580-595	media
	$^5D_4 \rightarrow ^7F_3$	615-625	media-débil
	$^5D_4 \rightarrow ^7F_2$	645-655	débil
<b>Samario</b>	$^4G_{5/2} \rightarrow ^6H_{5/2}$	559	intensa
	$^4G_{5/2} \rightarrow ^6H_{7/2}$	594	intensa
<b>Disproseo</b>	$^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{15/2}$	485	débil
	$^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{13/2}$	575	intensa

Tabla 1.- Longitudes de onda de las transiciones luminiscentes de Eu y Tb

## 1.2. Luminiscencia de los iones lantánidos en complejos orgánicos

Los complejos de iones lantánidos con ligandos orgánicos confieren a estos unas propiedades que han permitido un espectacular desarrollo de los iones lantánidos como sondas luminiscentes en multitud de aplicaciones.<sup>11</sup>

La excitación directa del lantánido en solución es muy poco eficaz, debido, entre otras razones a su bajo coeficiente de absorción molar ( $\epsilon = 1-10 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Los ligandos orgánicos, a menudo contienen una parte cromófora que sirve de “antena” captadora de la radiación excitante y que posteriormente se emplea en el proceso de transferencia de energía al ion lantánido.<sup>12</sup> Este efecto, conocido como *efecto*

<sup>11</sup> U. Karhunen, L. Jaakkola, Q. Wang, U. Lamminmäki, T. Souka, *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 751.

<sup>12</sup> J.M. Lehn, *Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives*, VCH: Weinheim, **1995**.

*antena*,<sup>13-15</sup> puede aumentar la intensidad de luminiscencia del catión ya que, tanto la mayor eficacia en la absorción de la antena ( $\epsilon > 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) como la eficacia en la transferencia de energía y la protección del ion por complejación evitando fenómenos de desactivación no radiativa, provocan un efecto multiplicador sobre las características emisivas del lantánido complejoado.<sup>16,17</sup>

Weissman<sup>16</sup> postuló una transferencia de energía interna desde el ligando orgánico al lantánido, observando que la eficacia de la luminiscencia dependía del tipo de ligando.

El mecanismo que explica esta transferencia de energía se representa en la Figura 2.<sup>18</sup>

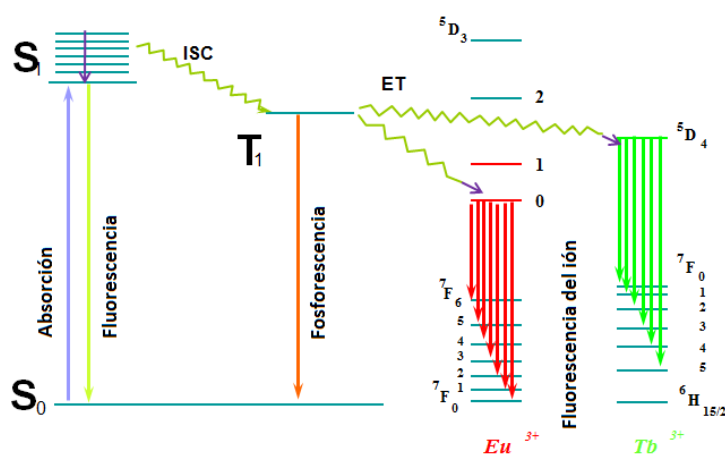


Figura 2.- Diagrama de Jablonski para la sensibilización del ion lantánido por el ligando antena

La primera etapa del proceso fotofísico que se produce consiste en la absorción de energía por parte del ligando, que tiene alto coeficiente de absorción molar, lo que provoca la excitación desde el estado fundamental  $S_0$  a uno de los estados vibracionales de  $S_1$ . La molécula pierde rápidamente ( $10^{11} - 10^{13} \text{ s}^{-1}$ ) el exceso de energía vibracional por desexcitación no radiativa (conversión interna), cayendo al estado más bajo en energía de  $S_1$ , y permanece ahí durante  $10^{-8}$ s aproximadamente. En este momento, pueden darse dos alternativas. La molécula bien puede desexcitarse mediante una transición lumínica para regresar a  $S_0$  (fluorescencia), o bien pasar a un

<sup>13</sup> B. Alpha, R. Ballardini, V. Balzani, J.-M. Lehn, S. Perathoner, N. Sabbatini, *Photochem. Photobiol.*, **1990**, 52, 299.

<sup>14</sup> M.H. Werts, *Sci. Prog.*, **2005**, 88, 101.

<sup>15</sup> E.G. Moore, A.P.S. Samuel, K.N. Raymond, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, 42, 542

<sup>16</sup> S.I. Weissman, *J. Chem. Phys.*, **1942**, 10, 214.

<sup>17</sup> N. Sabbatini, S. Perathoner, V. Balzani, B. Alpha, *Supramolecular Photochemistry*, Springer, **1987**.

<sup>18</sup> a) G.A. Crosby, R.E. Whan, R.M. Alire, *J. Chem. Phys.*, **1961**, 34, 743; b) G.A. Crosby, R.E. Whan, J.J. Freeman, *J. Phys. Chem.*, **1962**, 66, 2493.

estado triplete T, mediante un proceso de cruce entre sistemas. De nuevo, desde el estado triplete T la molécula tiene dos posibles vías de evolución; puede volver al estado fundamental, lo que implica una transición de spin prohibida (fosforescencia) o la energía puede ser transferida a un nivel  $4f$  apropiado del ion lantánido ( $5 \times 10^5 - 10^9 \text{ s}^{-1}$ ). La pérdida de energía del ion lantánido puede producirse mediante un proceso no radiativo o provocar la emisión de luz (luminiscencia). Como consecuencia de este proceso tiene lugar un desplazamiento de Stokes muy grande, lo que conduce a un significativo aumento de sensibilidad en la detección de la emisión cuando se compara con el empleo de sondas fluorescentes basadas en fluoróforos orgánicos.

### 1.2.1. Eficiencia de los quelatos

El entorno que contiene al lantánido también debe cumplir con otros requisitos que conducen a aumentos en la respuesta del proceso y el consiguiente incremento de la sensibilidad como son: i) proteger al lantánido de las moléculas de agua del entorno y sus vías asociadas a la desactivación no radiativa<sup>19</sup> basadas en acoplamientos vibracionales con los enlaces O-H, ii) generar el *efecto antena* óptimo para obtener una sensibilización eficiente del lantánido,<sup>16,20</sup> lo que se aborda mediante la optimización de los niveles electrónicos del cromóforo orgánico, y iii) proporcionar un entorno molecular en el que la estabilidad esté garantizada por la compensación de carga.<sup>21,22</sup>

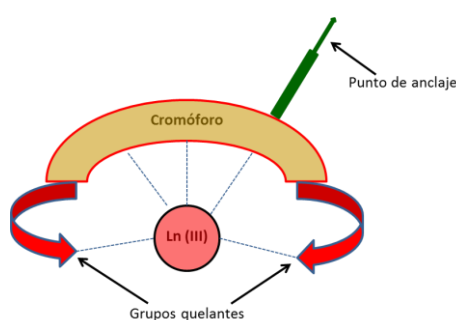


Figura 3.- Estructura de un quelato lantánido

<sup>19</sup> a) R.M. Supkowski, W.D.W. Jr Horrocks, *Inorg. Chim. Acta*, **2002**, 340, 44. b) W.D.W. Jr Horrocks, D.R. Sudnick, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 334. c) A. Beeby, I.M. Clarkson, R.S. Dickins, S. Faulkner, D. Parker, L. Royle, A.S. de Sousa, J.A.G. Williams, M. Woods, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1999**, 493. d) G. Stein, E. Würzberg, *J. Chem. Phys.*, **1975**, 62, 208. e) T. Kimura, Y. Kato, *J. Alloys Compd.*, **1998**, 275, 806.

<sup>20</sup> N. Sabbatini, M. Guardigli, J.-M. Lehn, *Coord. Chem. Rev.*, **1993**, 123, 201.

<sup>21</sup> S.A. Cotton, *Compt. Rend. Chimie*, **2005**, 8, 129.

<sup>22</sup> J.-C.G. Bünzli, *Rare Earths*, Editorial Complutense, **1998**.

En soluciones acuosas, los cambios en la entalpía y la entropía para la formación del complejo entre los cationes Ln(III) y muchos ligandos iónicos, se encuentran influenciados principalmente por cambios en la hidratación del catión y del ligando.

La complejación da como resultado una disminución de la hidratación, produciendo un cambio de entropía que es favorable para el proceso de formación del complejo. Por otro lado, la deshidratación es endotérmica y la contribución por la formación del enlace entre el catión y el ligando, a menudo, no compensa esta aportación energética desfavorable a la variación de energía libre de Gibbs para que el proceso general de complejación sea regido por la entropía.

Las aproximaciones a ligandos complejantes de lantánidos que cumplan con estos requisitos básicos han sido muy diversas y todas ellas muy recientes, así como las aplicaciones desarrolladas sobre este tipo de complejos.

Teniendo en cuenta las características necesarias de aislamiento del lantánido respecto del entorno, las primeras aproximaciones se desarrollaron coincidiendo con el "boom" de la química supramolecular y más concretamente de la química de macrociclos que dio lugar a la concesión del premio Nobel de Química a Pedersen, Cram y Lehn en 1987. Los complejos lantánidos basados en ligandos macrocíclicos buscaban lograr un entorno de coordinación cerrado y protegido del exterior por una estructura cíclica y dotada de átomos coordinantes. Se han descrito numerosos ejemplos de derivados de coronas, azacoronas como el triazaciclono-nano,<sup>23</sup> tetraazaciclododecano,<sup>24</sup> y otros ciclos<sup>25</sup> además de su comportamiento en la complejación de lantánidos.

Este tipo de estructuras cuyo efecto cavidad (macrocíclico) había sido demostrado en multitud de ocasiones para la complejación de metales, no es, sin embargo, suficiente para satisfacer la necesidad de aislamiento del lantánido. La incorporación de grupos coordinantes adicionales que cuelgan de la estructura macrocíclica y completan las necesidades de coordinación de los lantánidos, ha sido explotada con éxito en algunas aplicaciones y estas estructuras macrocíclicas de tipo podando,<sup>26</sup> se han convertido en una de las vías de desarrollo de nuevos complejos de lantánidos con perspectivas más prometedoras dada la versatilidad estructural que pueden ofrecer.

---

<sup>23</sup> a) H. Takkalo, I. Hemmilä, T. Sutela, M. Latva, *Chim. Acta*, **1996**, 79, 789. b) L. Charbonnière, R. Ziessel, M. Guardigli, A. Roda, N. Sabbatini, M. Cesario, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 2436. c) L. Tei, A.J. Blake, C. Wilson, M. Schröder, *Dalton Trans.*, **2004**, 1945.

<sup>24</sup> K. Kumar, C.A. Chang, L.C. Francesconi, D.D. Dischino, M.F. Malley, J.Z. Gougoutas, M.F. Tweedle, *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 3567.

<sup>25</sup> M.E. Bluhm, B.P. Hay, S.S. Kim, E.A. Dertz, K.N. Raymond, *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 5475.

<sup>26</sup> a) J.-M. Senegas, G. Bernardinelli, D. Imbert, J.-C.G. Bünzli, P.-Y. Morgantini, J. Weber, C. Piguet, *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 4680. b) N. Weibel, L. Charbonnière, R. Ziessel, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 1793.

Como se discutirá más adelante, en la mayoría de los casos, la estabilidad del lantánido se logra mediante la introducción de funciones aniónicas como brazos carboxilato y fosfonato que proporcionan fuertes interacciones electrostáticas con los cationes lantánidos triplemente cargados. Asimismo las estructuras macrobíclicas de tipo criptando han aportado compuestos con interesantes propiedades y aplicaciones en el campo inmunológico de sus complejos de lantánidos.<sup>27</sup>

Es importante comentar que la elección del ligando que va a actuar como antena debe ser realizada teniendo en cuenta que existe una transferencia de energía intramolecular desde el estado triplete del ligando orgánico a los niveles de resonancia del metal, y que la mayor efectividad, en cuanto a valores de intensidad de luminiscencia se refiere, se obtiene cuando esa diferencia energética entre los estados se encuentra en el intervalo comprendido entre 2000 y 5000  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>28</sup> Por esta razón, un mismo ligando no es igualmente eficiente para la sensibilización de los distintos iones lantánidos, siendo necesaria la síntesis de ligandos diferentes para cada lantánido.

Por tanto, el diseño de una sonda luminiscente basada en iones lantánidos se centra en dos partes fundamentales, por un lado la que posee los restos responsables de la coordinación y aislamiento del ion y por otro la que actúa como antena, sensibilizando sus niveles emisivos.

Ambas unidades pueden estar claramente diferenciadas aunque en la mayor parte de los casos la unidad antena también está implicada, aunque no de modo único, en la complejación del lantánido. La Figura 4 pretende esquematizar estas partes que forman parte del diseño de una sonda luminiscente basada en estos iones.

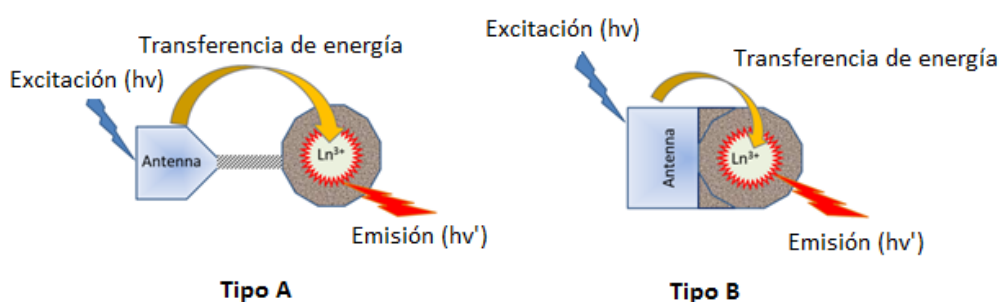


Figura 4.- Esquema de funcionamiento de una sonda luminiscente

<sup>27</sup> a) B. Alpha, J.-M. Lehn, G. Mathis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1987**, 26, 266. b) C. Galaup, J. Azéma, P. Tisnès, C. Picard, P. Ramos, O. Juanes, E. Brunet, J.C. Rodríguez-Ubis, *Helv. Chim. Acta*, **2002**, 85, 1613.

<sup>28</sup> M. Latva, H. Takalo, V. Mukkala, C. Matachescu, J.C. Rodríguez-Ubis, J. Kankare, *J. Lumin.*, **1997**, 75, 149.

La unidad antena representada en la figura de las moléculas de tipo A no se halla implicada directamente en la coordinación y su proximidad al metal está condicionada por el diseño de la estructura, lo que también influye de modo determinante en la sensibilización del ion lantánido, ya que los mecanismos dipolares de transferencia de energía están fuertemente influidos por la distancia existente entre cromóforo y lantánido. En las moléculas de tipo B el diseño pretende que el cromóforo participe activamente en la coordinación asegurando su proximidad y de este modo maximizando la transferencia de energía. Una estructura de tipo B implica que la antena tenga grupos coordinantes, por lo que los anillos heteroaromáticos son las estructuras elegidas en este tipo de diseños y las que han conducido a los mejores resultados.

De este modo una revisión bibliográfica de los principales tipos de estructuras descritos debería de atender, más a que a la clasificación por cromóforo-antena (en su inmensa mayoría ligandos poliheterocíclicos) y por grupos coordinantes, a la topología que el ligando en su conjunto presenta en su coordinación sobre el ion lantánido.

Dado que como se acaba de comentar hay una separación clara entre estructuras macrocíclicas y estructuras abiertas, a continuación se recogen los ligandos más representativos de cada grupo junto con las características más significativas que estos ligandos aportan a la luminiscencia de los lantánidos y sus aplicaciones más importantes.

## 1.2.2. Estructuras de ligandos sensibilizadores de iones lantánidos

### - Ligandos de estructura abierta

A pesar de la oxigenofilia que presentan los iones lantánidos de la que a menudo se aprovecha para el empleo de ligandos carboxilato en su coordinación, el oxígeno no es un átomo frecuente en coordinación ya que su inclusión en el diseño de ligandos coordinantes no resulta muy versátil. Así, aparte de los carboxilatos mencionados, otras estructuras bien establecidas como coordinantes de estos iones son las  $\beta$ -dicetonas, explotadas comercialmente en algunas aplicaciones bioanalíticas de los iones lantánidos.<sup>29-31</sup>

<sup>29</sup> a) N.J. Cowans, A. Stamatopoulou, J. Hellström, M.-M. Mäkela, K. Spencer, *Prenatal Diagn.*, **2010**, *30*, 127. b) I. Hemmilä, S. Dakubu, V.-M. Mikkala, H. Siitari, T. Lövgren, *Anal. Biochem.*, **1984**, *137*, 335. c) H. Siitari, I. Hemmilä, E. Soini, T. Lövgren, V. Koistinen, *Nature*, **1983**, *301*, 258.

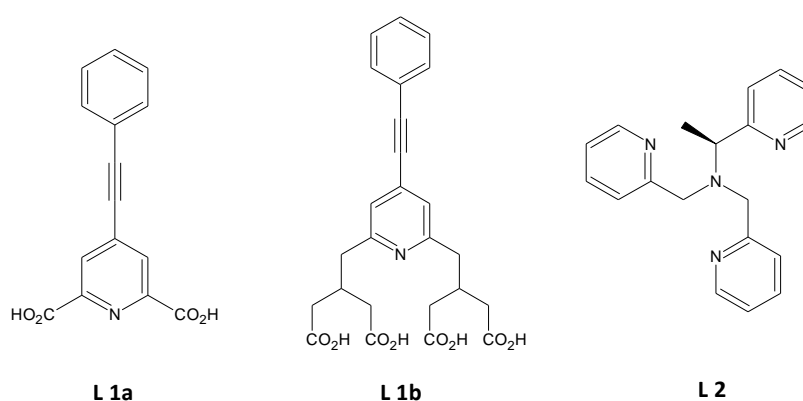
<sup>30</sup> E.P. Diamandis, *Clin. Biochem.*, **1988**, *21*, 139.

<sup>31</sup> S. Zhou, W. Zheng, Z. Chen, D. Tu, Y. Liu, Z. Ma, R. Li, H. Zhu, M. Huang, X. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 12498.



En contraste, numerosos trabajos están dedicados al diseño de ligandos que contienen anillos heterocíclicos nitrogenados para su uso en la complejación con lantánidos con el fin de explotar su potencial luminiscente. El átomo de nitrógeno es más versátil en estos compuestos y el anillo de piridina, ya sea mediante la combinación con él mismo o con otros anillos, es el heterociclo empleado con mayor frecuencia para la sensibilización luminiscente de los quelatos de Eu(III) y Tb(III).

Los quelatos de Eu(III) con el **L1a** y **L1b**,<sup>32</sup> quizás de los más sencillos en cuanto a su estructura se refiere, han sido usados como marcadores luminiscentes en TRFIA (Time-Resolved FluoroImmunoAssay),<sup>33</sup> microscopía<sup>34</sup> y en ensayos de hibridación del ADN.<sup>35</sup> El ligando **L1a** fue usado como marcador luminiscente en la separación electroforética de muestras biológicas (aminoácidos, péptidos, proteínas).<sup>36</sup> Mientras que las estructuras de tipo **L2** se han usado para la detección de materiales aniónicos<sup>37</sup> dependiendo su selectividad hacia los diferentes aniones del lantánido empleado, ya que los complejos de Eu(III) y Tb(III) se usan como sensores luminiscentes de iones cloruro (Cl<sup>-</sup>) y nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) respectivamente.



Los ligandos trípodes basados en estructuras pirazol-piridina-carboxilato y bipyridina-carboxilato (**L3**, **L4** y **L5**) han sido desarrollados como ligandos neutros para los iones

<sup>32</sup> H. Takkalo, V.M. Mikkala, H. Mikola, P. Liitti, I. Hemmilä, *Bioconjug. Chem.*, **1994**, *5*, 278.

<sup>33</sup> K. Mitrunen, K. Petterson, T. Piironen, T. Björk, H. Lilia, T. Lövgren, *Clin. Chem.*, **1995**, *41*, 1115.

<sup>34</sup> L. Seveus, M. Väisälä, S. Syrjänen, *Cytometry*, **1992**, *13*, 329.

<sup>35</sup> M. Kwiatkowski, M. Samiotaki, U. Lamminmäki, V.M. Mikkala, U. Landegren, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, *22*, 2604.

<sup>36</sup> M. Latva, T. Ala-Kleme, H. Bjennes, J. Kankare, K. Haapakka, *Analyst*, **1995**, *120*, 367.

<sup>37</sup> a) R. Wietzke, M. Mazzanti, J.M. Latour, J. Pecaut, P.Y. Cordier, C. Madic, *Inorg. Chem.*, **1998**, *37*, 6690.

b) X.P. Yang, C.Y. Su, B.S. Kang, X.L. Feng, W.L. Xiao, H.Q. Liu, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2000**, 3253. c)

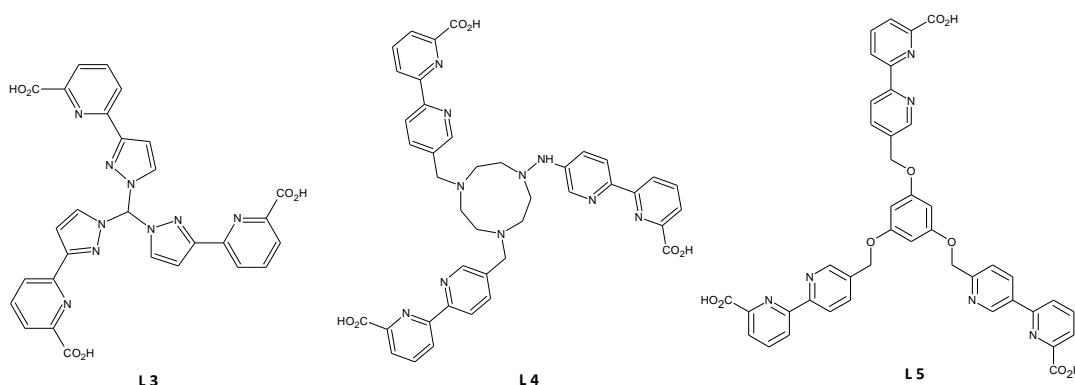
R. Wietzke, M. Mazzanti, J.M. Latour, J. Pecaut, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2000**, 4167. d) T. Yamada, S.

Shinoda, T. Uenishi, H. Tsukube, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 9031. e) T. Yamada, S. Shinoda, H. Tsukube,

*Chem. Commun.*, **2002**, 1218.

lantánidos. Las buenas propiedades luminiscentes que muestran han abierto un amplio rango de posibilidades estructurales, en los que las tres unidades heteroaromáticas pueden estar unidas por diferentes tipos de brazos.<sup>23b,38,39</sup>

Las estructuras trípodes derivadas del pirazol como el trispirazolilmetano<sup>40</sup> y sus análogos trispirazolilboratos,<sup>41</sup> han demostrado ser ligandos interesantes porque forman complejos con excelentes propiedades coordinativas.<sup>42</sup> Mientras que el pirazol por sí solo no es un buen cromóforo para la sensibilización del lantánido,<sup>43</sup> las estructuras con unidades pirazolilpiridina sí que resultan adecuadas para los procesos de transferencia de energía, especialmente para el caso del Tb(III).<sup>44</sup>



En el caso de **L6**, **L7** y **L8**,<sup>20,45-47</sup> el lantánido interacciona fuertemente con el Boro cargado negativamente y los ligandos nitrogenados proporcionan buen apantallamiento del metal protegiéndolo de las moléculas del disolvente.

<sup>38</sup> a) L.J. Charbonnière, R. Ziessel, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 6305. b) L.J. Charbonnière, N. Weibel, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 659. c) L.J. Charbonnière, R. Ziessel, *Helv. Chim. Acta*, **2003**, *86*, 3402.

<sup>39</sup> G. Ulrico, S. Bedel, C. Picard, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 8835.

<sup>40</sup> D.L. Reger, *Comments Inorg. Chem.*, **1999**, *21*, 1.

<sup>41</sup> S. Trofimenko, *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, *88*, 1842.

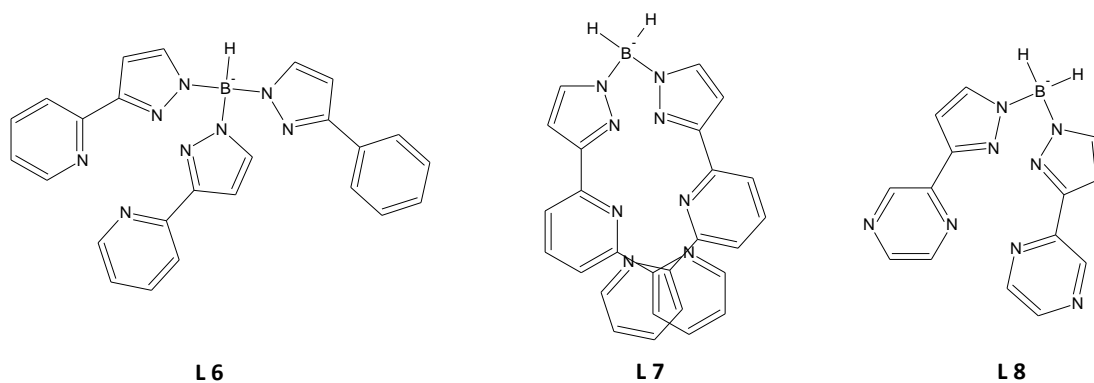
<sup>42</sup> a) N. Marques, A. Sella, J. Takats, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 2137. b) E.R. Humphrey, K.L.V. Mann, Z.R. Reeves, *New J. Chem.*, **1999**, *23*, 417. c) N. Armaroli, G. Accorsi, F. Barigelletti, *Inorg. Chem.*, **1999**, *38*, 5769. d) A. Beeby, B.P. Burton-Pye, S. Faulkner, G.R. Motson, J.C. Jeffery, J.A. McCleverty, M.D. Ward, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2002**, 1923.

<sup>43</sup> O. Juanes, J. de Mendoza, J.C. Rodríguez-Ubis, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1985**, 1765.

<sup>44</sup> a) M.J. Remuñán, H. Román, M.T. Alonso, J.C. Rodríguez-Ubis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1993**, 1099. b) J.C. Rodríguez-Ubis, R. Sedano, G. Barroso, O. Juanes, E. Brunet, *Helv. Chim. Acta*, **1997**, *80*, 86.

<sup>45</sup> a) P.L. Jones, A.J. Amoroso, J.C. Jeffrey, J.A. McCleverty, E. Psillakis, L.H. Rees, M.D. Ward, *Inorg. Chem.*, **1997**, *36*, 10. b) N. Armaroli, V. Balzani, F. Barigelletti, M.D. Ward, J.A. McCleverty, *Chem. Phys. Lett.*, **1997**, *276*, 435.

<sup>46</sup> C. Piguet, J.C.G. Bünzli, G. Bernardelli, G. Hopfgartner, A.F. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 8197.



Existe un tipo de ligandos abiertos cuyos complejos presentan forma de hélice mediante un autoensamblaje espontáneo de estructuras moleculares complejas a partir de estructuras más pequeñas.<sup>48</sup> Estos complejos pueden clasificarse en homodinucleares<sup>43,49</sup> (sólo contienen iones de elementos *f*) y heterodinucleares<sup>50</sup> (contienen iones de elementos *d* y *f*). Estas “hélices” con lantánidos han sido investigadas por su potencial uso como conversores de luz en aplicaciones de detección como sondas luminiscentes o de diagnóstico.<sup>51</sup> El ligando **L9** corresponde a las estructuras empleadas en la formación de los complejos por la aproximación de Horrocks<sup>46d</sup> mientras que el ligando **L10** corresponde a los desarrollados por Bünzli.<sup>43,46-48</sup>

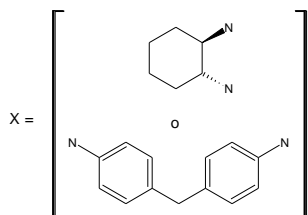
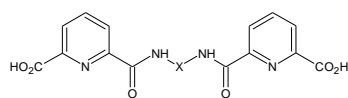
<sup>47</sup> X. Yang, C. Su, B. Kang, X. Feng, W. Xiao, H. Liu, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2000**, 3253.

<sup>48</sup> J.M. Lehn, A. Rigault, J. Siegel, J. Harrowfield, B. Chevrier, D. Moras, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, *84*, 2565.

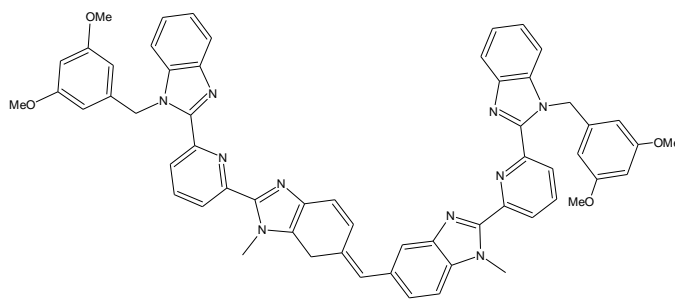
<sup>49</sup> a) N. Martin, J.C.G. Bünzli, V. McKee, C. Piguet, G. Hopfgartner, *Inorg. Chem.*, **1998**, *37*, 577. b) M. Elhabiri, R. Scopelliti, J.C.G. Bünzli, C. Piguet, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1998**, 2347. c) M. Elhabiri, R. Scopelliti, J.C.G. Bünzli, C. Piguet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 10747. d) J.J. Lessmann, W.D. Horrocks Jr., *Inorg. Chem.*, **2000**, *39*, 3114.

<sup>50</sup> a) C. Edder, C. Piguet, J.C.G. Bünzli, G. Hopfgartner, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1997**, 4657. b) C. Piguet, G. Hopfgartner, A.F. Williams, J.C.G. Bünzli, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 491. c) C. Piguet, G. Bernardinelli, J.C.G. Bünzli, S. Petoud, G. Hopfgartner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 2575.

<sup>51</sup> a) G. Bernardinelli, C. Piguet, A.F. Williams, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1992**, *31*, 1622. b) C. Piguet, A.F. Williams, G. Bernardinelli, J.C.G. Bünzli, *Inorg. Chem.*, **1993**, *76*, 4139.



L 9



L 10

Una serie de ligandos que ha dado lugar a complejos con excelente rendimiento en su uso como marcadores luminiscentes para aplicaciones de fluoroinmunoensayo, es aquella formada por una estructura derivada de poliaminocarboxilatos combinada con anillos heteroaromáticos diferentes (pirazol, pirazina, pirimidina, tiazol, triazol...).<sup>41,52,53</sup>

En estas estructuras, algunas de las cuales han sido desarrolladas por nuestro grupo de trabajo, se combinan de forma óptima grupos iminodiacetato que otorgan al complejo de gran estabilidad y protección de los iones lantánidos, junto con la posibilidad de introducir numerosas variaciones en la estructura cromofórica sensibilizadora de la luminiscencia del lantánido.

Con este grupo de compuestos se ha observado que existe una relación entre el tipo de cromóforo y el lantánido usado, así por ejemplo, para los ligandos **L11-L13** se obtienen mejores rendimientos cuánticos con Eu(III) mientras que para los ligandos **L14-L16** los mejores rendimientos se producen con Tb(III), resultados que muestran una buena correlación en la diferencia de energía entre el estado triplete de la unidad heterocíclica y el lantánido, siendo éste un factor determinante en la eficiencia de la transferencia de energía.<sup>28</sup>

El complejo de Tb(III) con **L17** y el de Eu(III) con **L18** se usa para ensayos de TRFIA en los protocolos de medición de los antígenos prostáticos (PSA) específicos libres y totales.<sup>54</sup>

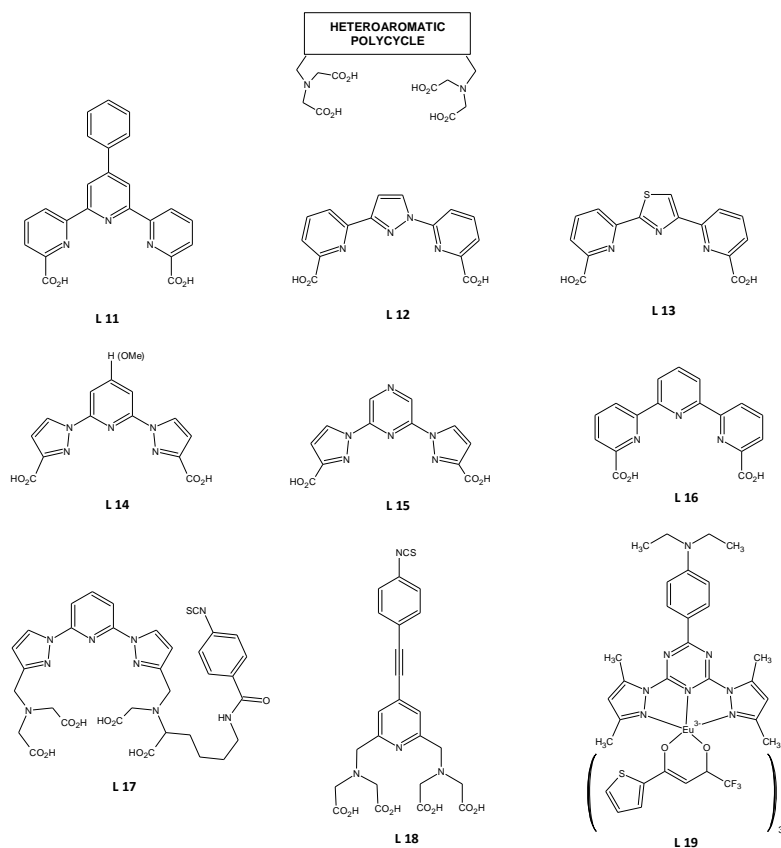
En el caso de los complejos de Eu(III) que se forman con los ligandos **L11** y **L16** que presentan la terpiridina como sensibilizador, se han usado para el marcaje biológico

<sup>52</sup> a) V.M. Mukkala, J. Kankare, *Helv. Chim. Acta*, **1992**, *75*, 1578. b) V.M. Mukkala, M. Kwiatkowski, J. Kankare, H. Takalo, *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 893. c) V.M. Mukkala, C. Sound, M. Kwiatkowski, *Helv. Chim. Acta*, **1992**, *75*, 1621. d) V.M. Mukkala, M. Helenius, I. Hemmilä, J. Kankare, H. Takalo, *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 1361. e) H. Takalo, E. Hänninen, J. Kankare, *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 877.

<sup>53</sup> E. Brunet, O. Juanes, R. Sedano, J.C. RodríguezUbis, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, *1*, 613.

<sup>54</sup> a) L. Meriö, K. Petterson, T. Lövgren, *Clin. Chem.*, **1996**, *42*, 1513. b) J.C. Rodríguez-Ubis, H. Takalo, V.M. Mukkala, *US Pat. Appl.*, 1995-548, 174 EP 1996-660056.

cuando presentan en la estructura un grupo isotiocianato,<sup>55</sup> y el complejo con el ácido bis-terpiridina(metilenammina)tetraacético se utilizó para la determinación de ácidos nucleicos y anticuerpos.<sup>56</sup>



#### - Estructuras macrocíclicas con heterociclos incluidos en el anillo

La estructura macrocíclica **L20** puede ser el ejemplo más simple de esta tipología de ligandos, en la que existe un único anillo, en este caso piridina, formando parte del macrociclo y la coordinación del ion lantánido se completa con brazos que presentan restos acetato.<sup>57</sup>

A la hora de diseñar este tipo de ligandos hay que tener en cuenta que el tamaño del macrociclo influye notablemente en la coordinación con el lantánido y en la manifestación de sus propiedades luminiscentes, así como la longitud de los brazos que actúan como anclaje al ion metálico. Un ejemplo de aplicación de este tipo de

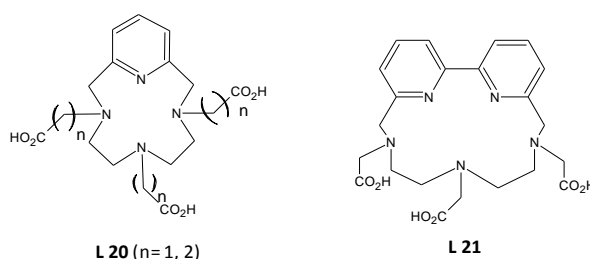
<sup>55</sup> M.E. Cooper, P.G. Sammes, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **2000**, 1695.

<sup>56</sup> A.K. Saha, K. Kross, E.D. Kloszewski, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 11032.

<sup>57</sup> a) J.M. Siaugue, F. Segat-Dioury, A. Favre-Réguillon, C. Madic, J. Foos, A. Guy, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 7443. b) J.-M. Siaugue, F. Segat-Dioury, I. Sylvestre, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 4713. c) F. Dioury, I. Sylvestre, J.-M. Siaugue, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 21, 4424.

estructuras puede obtenerse con los complejos de Gd(III), los cuales se usan como agentes de contraste de Imagen de Resonancia Magnética (MRI).<sup>58,59</sup>

Si se elabora la estructura con un mayor número de grupos heterocíclicos surgen ligandos del tipo **L21**, los cuales están basados en una cadena principal azamacrocíclica que contiene un grupo bipyridina intracíclico. Este macrociclo formado presenta ocho átomos donadores que intervienen en la formación del complejo y el blindaje de los iones lantánidos, con el cromóforo bipyridina utilizado como *antena* para la fotosensibilización de los lantánidos. Algunos derivados de este macrociclo se han sido sintetizado por la elevada utilidad que pueden generar en el campo biomédico.<sup>60</sup>



Combinando unidades de pirazol y piridina se originan estructuras bipyrazolpiridina como en el caso **L22** y **L23** que proporcionan excelentes propiedades luminiscentes debido principalmente a que son capaces de aislar eficientemente al metal.<sup>61</sup>

Las estructuras macrocíclicas que incorporan dos azamacrociclos de piridina y unidades de fenantrolina (**L24**) fueron sintetizadas para el estudio de complejos orgánicos con los lantánidos emisores infrarrojos Nd(III) y Yb(III).<sup>62</sup> La luminiscencia de estos iones tiene interés porque pueden ser sensibilizados por cromóforos puesto que absorben en la región visible del espectro electromagnético. Para este tipo de complejos se alcanza el número de coordinación 11 para cada metal a través de los cuatro átomos de nitrógeno del macrociclo 12-corona-4, los tres grupos carboxilato y los cuatro iones nitrato adicionales, desplazando el agua de la primera esfera de coordinación.

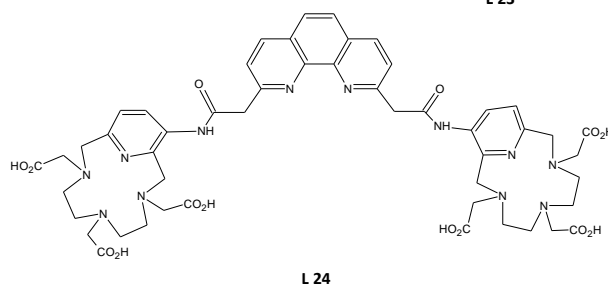
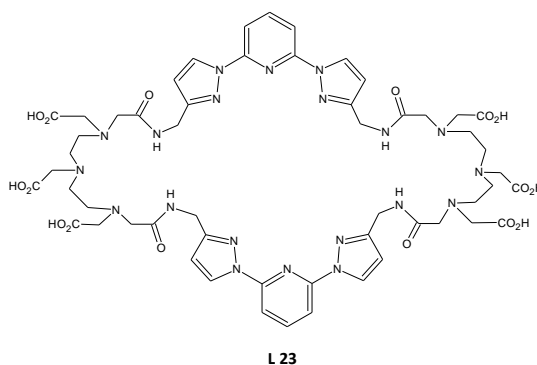
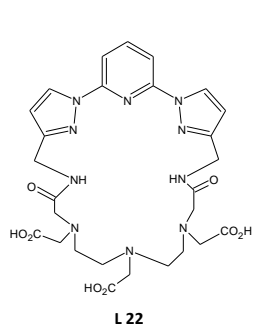
<sup>58</sup> W.D. Kim, D.C. Hrcir, G.E. Kiefer, A.D. Sherry, *Inorg. Chem.*, **1995**, *34*, 2225.

<sup>59</sup> a) K.W.-Y. Chan, W.-T. Wong, *Coord. Chem. Rev.*, **2007**, *251*, 2428. b) E. Terreno, D. Delli Castelli, A. Viale, S. Aime, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 3019. c) A. Datta, K.N. Raymond, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 938.

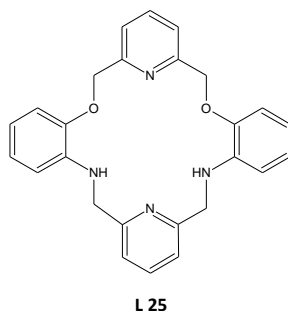
<sup>60</sup> J. Azéma, C. Galaup, C. Picard, P. Tisnès, P. Ramos, O. Juanes, J.C. Rodríguez-Ubis, E. Brunet, *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 2673.

<sup>61</sup> E. Brunet, O. Juanes, R. Sedano, J.C. Rodríguez-Ubis, *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 213.

<sup>62</sup> a) L. di Bari, G. Pintacuda, P. Salvadori, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 9257. b) F. Pina, M.A. Bernardo, E. Garcia-España, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2000**, 2143. c) Y.V. Korovin, N.V. Rusakova, Y.A. Popkov, V.P. Dotsenko, *J. Appl. Spectrosc.*, **2002**, *69*, 841.



Debido al carácter duro de los iones lantánidos, la investigación de sus propiedades de coordinación también se centra en la formación de complejos con ligandos macrocíclicos que contienen donadores oxígeno o combinación de donadores de nitrógeno-oxígeno como puede ser un ligando tipo **L25**.<sup>63,64</sup>



#### - Estructuras macrocíclicas con brazos heterocíclicos

Los compuestos de este tipo muestran propiedades interesantes porque los brazos formados por heterociclos presentan un doble papel, como protectores contra las moléculas de agua externas y como absorbentes de luz y sensibilizadores. El grupo

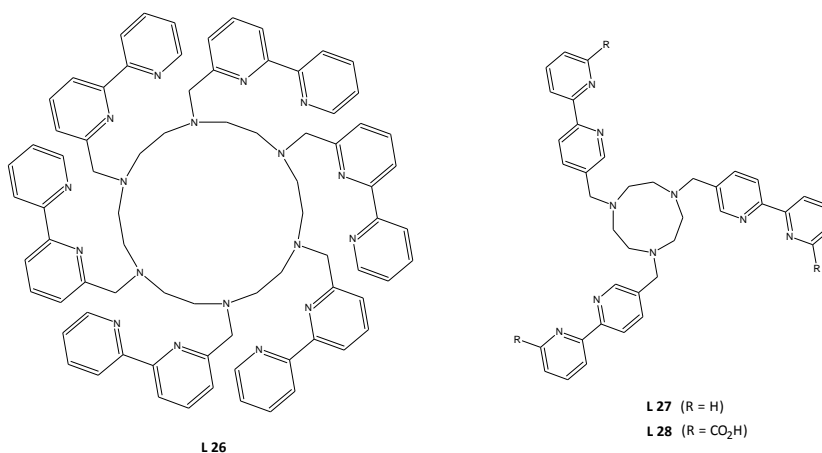
<sup>63</sup> a) L. Jin, S. Lu, *Polyhedron*, **1996**, *15*, 4069. b) K. Bukietynska, P.N. Thuy, *Polyhedron*, **1988**, *7*, 641. c) K. Bukietynska, P.N. Thuy, *Inorg. Chim. Acta*, **1987**, *132*, 21. d) M. Frechette, *Can. J. Chem.*, **1993**, *71*, 377.

<sup>64</sup> a) C. Platas, R. Bastida, A. de Blas, *Polyhedron*, **1998**, *17*, 1759. b) C. Platas, F. Avecilla, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, J.C. Bünzli, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1999**, 1763.

cromóforo 2,2'-bipiridina aparece en muchos de los ejemplos estudiados, probablemente, porque es una estructura versátil que permite diseñar ligandos multidentados que cumplen con los requisitos estructurales y de transferencia de energía necesaria.

La preparación de los complejos que permiten enlazar simultáneamente a dos iones lantánidos es un enfoque muy prometedor para el diseño de dispositivos moleculares fotoquímicos, capaces de realizar funciones complicadas y ser utilizados como sondas para una variedad de aplicaciones químicas y biológicas. Los ligandos **L26** y **L27** muestran éteres poliazacorona sustituidos con los brazos 6-metileno-2,2'-bipiridina diseñados para ese propósito.<sup>65,66</sup> Es importante comentar que no todas las bipiridinas se coordinan a los metales, lo que puede hacer que disminuya su efectividad luminiscente, por lo que debe ser tenido en cuenta en el diseño y posterior aplicación.

Un derivado del ligando **L27** es el ligando **L28**, que presenta grupos carboxilato y muestra mejores resultados debido a la presencia de dichos grupos. Estos grupos actúan como brazos de unión al lantánido y lo alejan de los grupos CH<sub>2</sub> del ciclo disminuyendo la extinción luminiscente que se produce en **L27**.



Existen macrociclos basados en unidades DOTA (**L29**) y TETA (**L30**) acoplados con el radical carboestirilo **124** (7-amino-4-metil-2(1H)-quinolinona) y que contienen poliaminocarboxilatos.<sup>67,68</sup> Dicho radical tiene la capacidad de sensibilizar a Eu(III) y a

<sup>65</sup> a) R. Ziessel, J.M. Lehn, *Helv. Chim. Acta*, **1990**, *73*, 1149. b) R. Ziessel, M. Maestri, L. Prodi, V. Balzani, A. Van Dorselaer, *Inorg. Chem.*, **1993**, *32*, 1237.

<sup>66</sup> L. Prodi, M. Maestri, R. Ziessel, V. Balzani, *Inorg. Chem.*, **1991**, *30*, 3798.

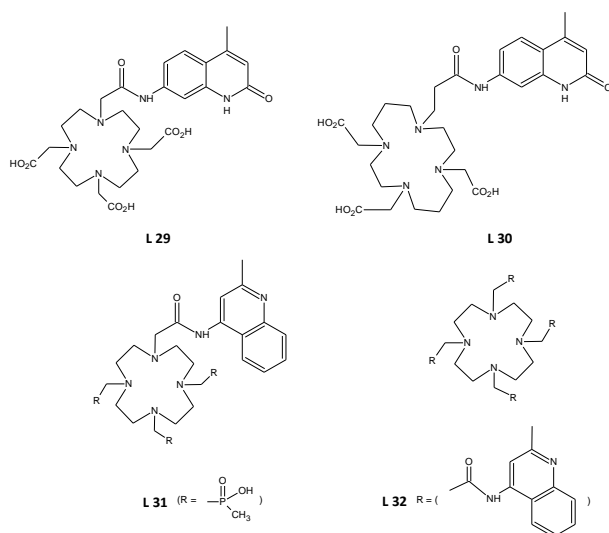
<sup>67</sup> D. Parker, Y. Bretonniere, *Ernst Schering Research Foundation workshop*, **2005**, *49*, 123.

<sup>68</sup> a) M. Li, P.R. Selvin, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 8132. b) M. Xiao, P.R. Selvin, *J. Amer. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 7067.

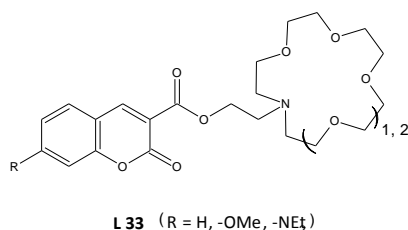


Tb(III) con eficacia similar. Estos quelatos son eficaces como donadores en la transferencia de energía lo que hace posible su uso en aplicaciones de imagen.

Otra de las aplicaciones que ofrecen los complejos quinolínicos (**L31** y **L32**) con Eu(III), Tb(III) e Yb(III) es su uso en dispositivos luminiscentes para la señalización de los iones y moléculas a través de procesos luminiscentes “off-on”. En estos dispositivos, el metal proporciona una respuesta a algunas perturbaciones externas, tales como la presencia de determinados iones o el reconocimiento de moléculas.<sup>69</sup>



De manera análoga a los macrociclos que contienen nitrógeno existen los que presentan átomos de oxígeno (éteres corona), siendo las cumarinas<sup>70</sup> un ejemplo de ligandos que contienen estos ciclos (**L33**). Presentan excelentes propiedades luminiscentes y algunas de sus aplicaciones pueden ser, entre otras, su uso como sondas luminiscentes y marcadores en bioensayos.



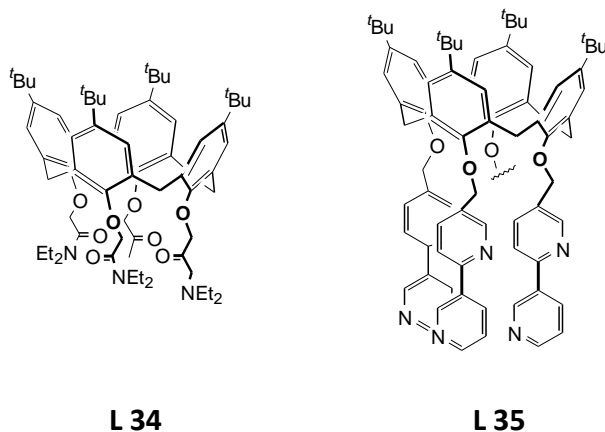
<sup>69</sup> T. Gunnlaugsson, D.A. MacDonaill, D. Parker, *J. Amer. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 12866.

<sup>70</sup> a) E. Brunet, M.T. Alonso, O. Juanes, R. Sedano, J.C. Rodríguez-Ubis, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 4459.

b) E. Brunet, P. García-Losada, J.C. Rodríguez-Ubis, O. Juanes, *Can. J. Chem.*, **2002**, 80, 169.

Un último ejemplo de estructuras macrocíclicas con brazos heterocíclicos son los calixarenos,<sup>71,72</sup> un tipo de estructura macrocíclica empleada para complejar iones lantánidos.<sup>73</sup> Su estructura, formada principalmente por 4 o 6 unidades de anillos aromáticos unidos por puentes metilénicos le confiere un coeficiente de absorción molar relativamente alto (**L34** y **L35**). Aunque su cavidad hidrofóbica no está muy adaptada para albergar cationes, proporciona un buen aislamiento de las moléculas de agua del entorno. Además, su relativa facilidad de funcionalización por los grupos hidroxilo con restos coordinantes, aumenta su poder de complejación y su solubilidad en agua.<sup>74</sup>

Con objeto de aumentar la absorción, se han sintetizado otros calixarenos en los que se sustituyen varios o todos los grupos acetamida por anillos de bipyridina.<sup>75</sup>



#### - Estructuras macrobíclicas o criptandos

Los criptandos<sup>76</sup> o macrobiciclos que contienen cadenas de polioxaetileno, pueden considerarse como una estructura tridimensional análoga a los éteres corona, que fueron originalmente diseñados para la complejación con metales alcalinos.

<sup>71</sup> a) J.M. Harrowfield, M.I. Ogden, A.H. White, F.R. Willner, *Aust. J. Chem.*, **1989**, 42, 949. b) N. Sabbatini, M. Guardigli, A. Mecati, V. Balzani, R. Ungaro, E. Ghidini, A. Castani, A. Pochini, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1990**, 878. c) J.-C. Bünzli, J.M. Harrowfield, *Calixarenes*, ed. J. Vicens, V. Böhmer, Klumer, Amsterdam **1990**, 211.

<sup>72</sup> Z. Pikramenou, D.G. Nocera, *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 532.

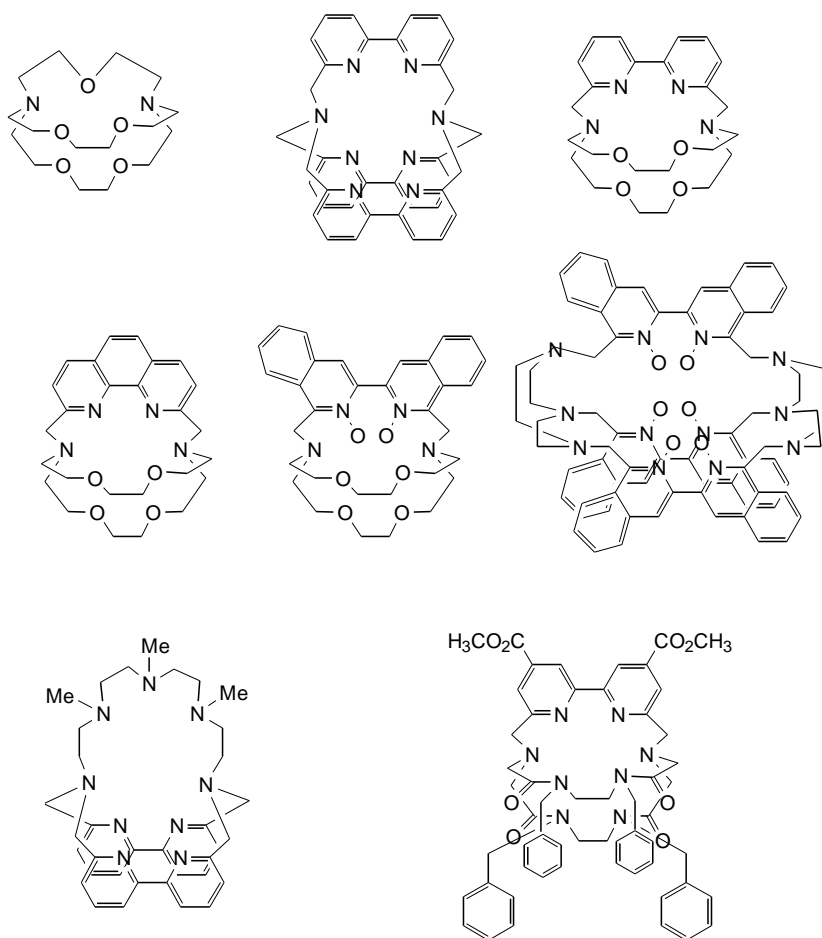
<sup>73</sup> N. Sabbatini, N. Guardigli, I. Manet, *New J. Chem.*, **1995**, 19, 137.

<sup>74</sup> F.J. Steemers, H.G. Meuris, W. Verboon, D.N. Reinhoudt, E.B. van der Tol, J.W. Verhoeven, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 4229.

<sup>75</sup> G. Ulrich, R. Ziessel, I. Manet, M. Guardigli, N. Sabbatini, F. Fraternali, G. Wipff, *Chem. Eur. J.*, **1997**, 3, 1815.

Más tarde, algunos de ellos como los que se muestran a continuación, fueron utilizados para complejar iones lantánidos.<sup>77</sup>

Con el fin de obtener una mayor intensidad de luminiscencia, mediante la transferencia de la energía absorbida por el ligando al metal, se diseñan criptandos con grupos cromóforos, tales como anillos heterocíclicos (generalmente de bipyridina) en el que los heteroátomos participan en la complejación del metal.<sup>78</sup> A continuación se muestran algunos ejemplos de criptandos.



<sup>76</sup> a) J.C. Rodríguez-Ubis, D. Plancherel, B. Alpha, J.M. Lehn, *Helv. Chim. Acta*, **1984**, *67*, 2264. b) J.M. Lehn, M. Pietraszkiewicz, J. Karpiuk, *Helv. Chim. Acta*, **1990**, *73*, 106. d) J.M. Lehn, J.-B. Regnouf de Vains, *Helv. Chim. Acta*, **1992**, *75*, 1221.

<sup>77</sup> a) N. Sabbatini, S. Dellonte, M. Ciano, A. Bonazzi, V. Balzani, *Chem. Phys. Lett.*, **1984**, *107*, 212; b) N. Sabbatini, S. Dellonte, G. Blasse, *Chem. Phys. Lett.*, **1986**, *129*, 541; c) G. Blasse, M. Buys, N. Sabbatini, *Chem. Phys. Lett.*, **1986**, *124*, 538.

<sup>78</sup> a) Y. Haas, G. Stein, *J. Phys. Chem.*, **1971**, *75*, 3668. b) A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, *88*, 2058. c) J.L. Kropp, M.W. Windsor, *J. Phys. Chem.*, **1967**, *71*, 477.

### 1.3. Luminiscencia de los lantánidos en el ámbito biomédico

Recordemos que los iones lantánidos presentan una serie de ventajas luminiscentes intrínsecas: (i) líneas de emisión bien definidas y casi independientes del compuesto, (ii) gran desplazamiento de Stokes cuando se excita el ligando, y (iii) largos tiempos de vida del estado emisor de algunos lantánidos (Eu, Tb, Sm, Dy). Esto da lugar a que se originen excelentes complejos luminiscentes cuando son quelatados por ligandos orgánicos que contienen cromóforos que actúan como captadores luminiscentes (antenas). El ligando permite una excitación eficiente del ion lantánido ya que protege a éste de las moléculas de agua presentes en el medio.

Los quelatos de lantánidos, en general, poseen longitudes de onda de excitación y rendimientos cuánticos de emisión comparables a los fluoróforos orgánicos habituales. Los desplazamientos de Stokes son excepcionalmente grandes (entre 200 y 300 nm), si se comparan con los de las moléculas fluorescentes, que oscilan entre 20 y 50 nm. Además, la emisión de luminiscencia de estos complejos tiene lugar en el UV/Visible (entre 400 y 700 nm) por lo que la medida de la emisión no interfiere con la fluorescencia que suelen presentar las muestras biológicas y que es una de las aplicaciones que tienen este tipo de compuestos.

Los complejos de Eu(III) y Tb(III) pueden, en algunos casos, ser altamente luminiscentes y exhibir tiempos de emisión en el rango de milisegundos. Estos tiempos de vida tan largos permiten detectar biomoléculas marcadas con iones lantánidos con alta sensibilidad mediante la técnica de luminiscencia resuelta en el tiempo (TRF).<sup>79,80</sup>

En la espectroscopia resuelta en el tiempo (TRF), la excitación se produce por una lámpara pulsada (o laser) y el tiempo de retardo es aplicado antes de su medida. De esta manera, la corta duración de la luminiscencia de la parte orgánica de la muestra, puede extinguirse antes de medir la luminiscencia exclusiva del centro metálico, lo que garantiza una mejor relación señal/ruido (Figura 5).<sup>4</sup>

El empleo de los iones lantánidos junto con la técnica de fluorescencia resuelta en el tiempo, deriva en un tipo de fluoroinmunoensayo denominado TRFIA (Time Resolved FluoroImmunoAssay).<sup>81</sup>

---

<sup>79</sup> I. Hemmilä, V. M. Mikkala, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **2001**, 38, 441.

<sup>80</sup> I. Hemmilä, T. Stahlberg, P. Mottram, *Bioanalytical Applications of Labelling Technologies*, Wallac Oy, **1995**.

<sup>81</sup> E. F. Gudgin Dickson, A. Pollack, E. P. Diamandis, *J. Photoch. Photobio. B.*, **1995**, 27, 3.

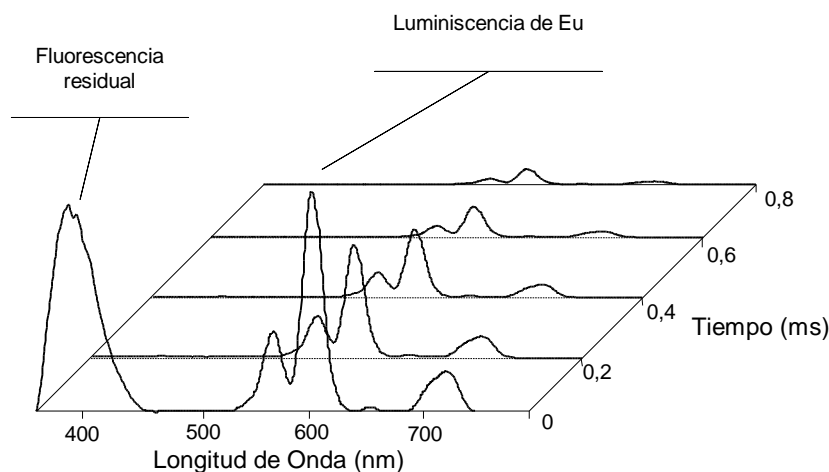


Figura 5.- Fluorescencia Resuelta en el tiempo (TRF)

Se han desarrollado un número importante de sistemas de detección basados en lantánidos para ser usados en ensayos homogéneos.<sup>82</sup> Estos ensayos se basan en la modulación directa de la luminiscencia de la sonda durante la reacción bioquímica bajo estudio. El antígeno de interés se acopla a dos anticuerpos, uno que actúa como donador marcado con el lantánido y el otro con un aceptor orgánico que emite a una longitud de onda distinta a la de emisión del ion lantánido. Una vez que las inmunorreacciones tienen lugar, la muestra se excita a los máximos de excitación de la sonda de los lantánidos y, entre los diferentes procesos fotofísicos que se producen, se realiza la medición resuelta en el tiempo que permite aislar la señal emitida por la parte receptora.

Una de las aplicaciones pioneras de los lantánidos y más ampliamente utilizada ha sido el método DELFIA (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay),<sup>83</sup> que es adecuado para ensayos competitivos o no competitivos heterogéneos. En este método, el quelato de lantánido usado para el marcaje tiene propiedades de unión fuertes, aunque no es en sí mismo luminiscente en el medio de ensayo debido a la ausencia de un cromóforo sensibilizador adecuado en el ligando; en ese sentido, no puede ser considerado como una sonda de lantánido luminiscente.

Para que pueda considerarse como tal, el ion lantánido debe dissociarse del ligando al que se encuentra unido, mediante una disolución que, por un lado libera el ion de su complejo no luminiscente y por otro, forma un nuevo complejo que presenta una fuerte emisión. Esta disolución denominada *solución de revelado*, "enhancement

<sup>82</sup> U. Karhunen, J. Rosenberg, U. Lamminmäki, T. Soukka, *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 9011.

<sup>83</sup> E. Soini, T. Lövgren, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **1987**, *18*, 105.

solution” o “development solution” contiene un nuevo ligando y agentes sinérgicos que permiten observar la luminiscencia del lantánido con elevadas sensibilidades.

La ventaja de este sistema de detección es que no requiere que las propiedades óptimas de unión y de luminiscencia del complejo lantánido estén combinadas en el marcaje. El quelato marcado tiene propiedades de unión muy fuerte, es simple y fácil de usar para el marcado, y es química y fotoquímicamente muy estable.

La disolución de revelado ha sido elegida para optimizar la luminiscencia de los lantánidos, utilizando un entorno micelar que contiene el ligando responsable de la absorción y transferencia de energía, así como otros reactivos potenciadores de la luminiscencia.

Las mejoras de estos formatos de ensayo utilizan un quelato de lantánido luminiscente como una sonda en sí y no se requiere etapa de disociación para liberar el ion lantánido.

La señal de luminiscencia del quelato de lantánido, el cual se encuentra directamente marcando al analito, se detecta desde la superficie de la fase sólida utilizada para la inmovilización (microplacas de plástico, perlas o gel electroforético) o directamente desde la solución.<sup>84</sup> Esta metodología se aplica para inmunoensayos basados en microplacas convencionales para hormonas, anticuerpos y antígenos de agentes infecciosos, proteínas, enzimas, toxinas, péptidos, antígenos, metabolitos y fármacos terapéuticos.<sup>85</sup>

Una nueva técnica que surge para la mejora de estos métodos de detección es la de los interruptores basados en lantánidos luminiscentes marcados, que permite ensayos de uniones homogéneas sensibles y específicas.<sup>82,86,87</sup>

El mecanismo de estos interruptores (Figura 6) consiste en que el quelato de lantánido luminiscente se divide en dos mitades marcadas no luminiscentes, que se unen covalentemente a dos fragmentos biomoleculares separados. Estos fragmentos reconocen al analito a través de su parte marcada cuando se aproxima, lo que aumenta la concentración y permite el autoensamblaje de ambas partes. La señal obtenida es muy específica en presencia del analito debido a que dos fragmentos necesitan unirse para generar la señal. Cuando no existe analito, los restos marcados se mantienen aparte y no se detecta señal de luminiscencia.

---

<sup>84</sup> K. Matsumoto, J. Yuan, *Lanthanide Chelates as Fluorescence Labels for Diagnostics and Biotechnology*, **2003**, vol. 40, 191.

<sup>85</sup> E.F. Gudgin Dickson, A. Pollak, E.P. Diamandis, *Pharmacol. Therapeutics*, **1995**, 66, 207.

<sup>86</sup> a) U. Karhunen, J. Rosenberg, U. Lamminmäki, T. Soukka, *Anal. Chem.*, **2011**, 83, 9011. b) H. Pääkkilä, E. Malmi, S. Lahtinen, T. Soukka, *Biosensors and Bioelectronics*, **2014**, 62, 201.

<sup>87</sup> a) J. Coates, P.G. Sammes, G. Yahioğlu, R.M. West, A.J. Garman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1994**, 2311. b) S.T. Mullins, P.G. Sammes, R.M. West, G. Yahioğlu, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1995**, 75.

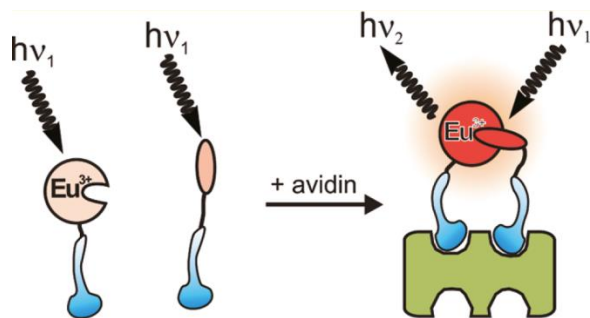


Figura 6.- Mecanismo de un interruptor lantánido

Esta aplicación de la luminiscencia de los lantánidos se ha demostrado en ensayos de hibridación de ácidos nucleicos<sup>5a,88-91</sup> y en la amplificación nucleica,<sup>92</sup> así como en la detección de proteínas.<sup>5b,93</sup> Todas estas aplicaciones utilizan el mismo principio fundamental: en el ensayo se usan dos o más reactivos que deben estar en proximidad a fin de que se produzca la señal específica de luminiscencia de lantánidos, tal y como ya se ha comentado.

#### 1.4. Proyecto ACUSEP (Integrated whole blood acoustophoresis and homogeneous nucleic acid detection cartridge for rapid sepsis diagnostics) (7º Programa Marco de la U.E., área de salud)<sup>94</sup>

Durante los últimos 15 años, ha habido un progreso notable en el análisis y la manipulación de ADN y su uso en la nanotecnología. El análisis de ADN se realiza en biología molecular, diagnósticos médicos, y medicina forense.

<sup>88</sup> U. Karhunen, M. Soikkeli, S. Lahdenperä, T. Soukka, *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 772, 87.

<sup>89</sup> Y. Kitamura, T. Ihara, Y. Tsujimura, Y. Osawa, D. Sasahara, M. Yamamoto, K. Okada, M. Tazaki, A. Jyo, *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, 102, 1921.

<sup>90</sup> A. Oser, G. Valet, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1990**, 29, 1167.

<sup>91</sup> G. Wang, J. Yuan, K. Matsumoto, Z. Hu, *Anal. Biochem.*, **2001**, 299, 169.

<sup>92</sup> a) A. Lehmusvuori, U. Karhunen, A.H. Tapio, U. Lamminmäki, T. Soukka, *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 731, 88. b) A. Lehmusvuori, A.H. Tapio, P. Mäki-Teeri, K. Rantakokko-Jalava, Q. Wang, H. Takalo, T. Soukka, *Anal. Biochem.*, **2013**, 436, 16.

<sup>93</sup> H. Pääkkilä, S. Blom, K. Kopra, T. Soukka, *Analyst*, **2013**, 138, 5107.

<sup>94</sup> Página web del proyecto ACUSEP <http://acusep.fi>

Gran parte de esta tecnología, que está basada en la detección de fluorescencia y luminiscencia de lantánidos, está tomando un papel principal en este campo de investigación.

La Figura 7 muestra un formato de ensayo de hibridación de ADN homogéneo basado en la formación de los complejos luminiscentes de Eu(III) y Tb(III) mediante la aproximación de un ligando antena (AL) y un quelato portador de iones (ICC).

Como ya se ha comentado anteriormente y según puede observarse en la figura, el mecanismo consiste en que la sonda oligonucleótido marcada con el lantánido (Ln) no es fluorescente, al igual que la sonda marcada con un cromóforo que actúa de antena.

Cuando se produce la hibridación de ambos oligonucleótidos sobre el “oligo-target”, se induce la formación de un quelato mixto que resulta ser altamente fluorescente. Las posiciones vacantes de coordinación en ICC se complementan con la coordinación a AL formando los complejos luminiscentes, que revelan la existencia de una secuencia de ADN complementaria a la secuencia de los oligonucleótidos marcados con el AL y el ICC.

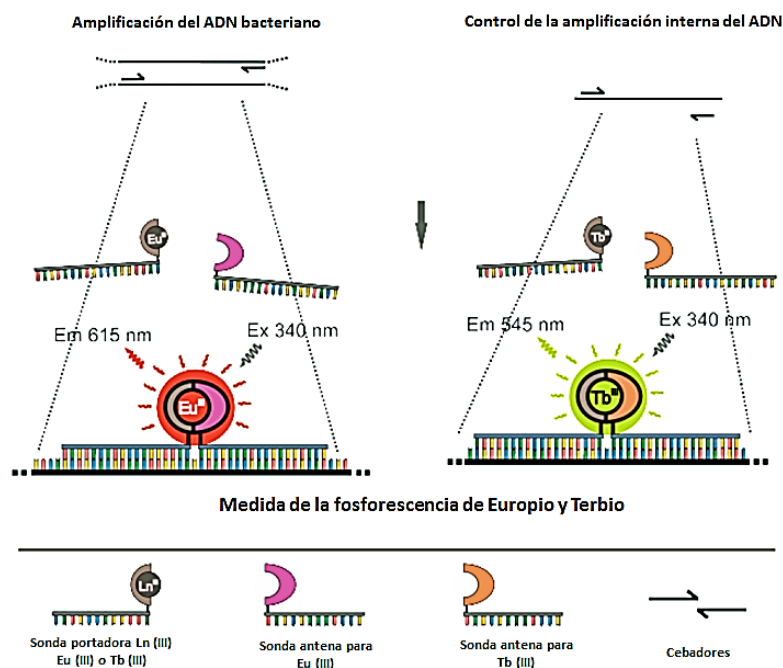


Figura 7.- Principio de ensayo homogéneo de oligonucleótidos

Es en este contexto, en el que este proyecto de tesis pretende aportar soluciones en forma de la preparación de nuevos ligandos antena que sean capaces de actuar como



sensibilizadores de los iones lantánidos, principalmente Europio, para el marcaje de los oligonucleótidos de las bacterias causantes de sepsis.

El hecho de elegir esta aplicación en concreto se debe a la participación de nuestro grupo de investigación en el proyecto que se describe a continuación, colaborando en el desarrollo de un método de diagnóstico más rápido y eficaz, que los usados hasta el momento, y que sea capaz de intentar asegurar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por este tipo de patología de origen bacteriano.

Las infecciones bacterianas son procesos bastante comunes y que no suelen resultar mortales. Sin embargo, ciertos tipos de bacterias peligrosas<sup>95</sup> cuando entran en el torrente sanguíneo (comúnmente conocido como bacteremia) pueden dar lugar a una infección denominada sepsis (Tabla 2).

Bacterias Gram (+)	Bacterias Gram (-)
Staphylococcus aureus	Escherichia coli
Streptococcus pyogenes	Klebsiella pneumoniae
Streptococcus agalactiae	Proteus mirabilis
Streptococcus faecalis	Proteus vulgaris
Streptococcus pneumoniae	Pseudomonas aeruginosa
Listeria monocytogenes	Salmonella enteritidis
	Haemophilus influenzae

*Tabla 2.- Principales bacterias causantes de sepsis*

La sepsis representa una importante preocupación en el área médica (un 9% de los pacientes con sepsis progresan a sepsis severa y el 3% de éstas evolucionan a shock séptico),<sup>96</sup> además su impacto en los gastos de cuidados intensivos es muy alto. Cada año, en todo el mundo, se producen alrededor de 18 millones de casos de sepsis grave y se prevé un aumento debido principalmente a la creciente utilización de procedimientos médicos invasivos y al aumento de la esperanza de vida, así como un mayor número de individuos de alto riesgo, como los pacientes oncológicos y con VIH. La sepsis es una enfermedad grave que causa en torno a 135.000 muertes al año en Europa, ocupando tristemente el segundo puesto en el ranking de mortalidad hospitalaria después de las afecciones cardíacas.

<sup>95</sup> G. S. Martin, D. M. Mannino, S. Eaton, M. Moss, *N. Engl. J. Med.*, **2003**, *348*, 1546.

<sup>96</sup> M. P. Rodrigo Casanova, J. M. García Peña, V. Rodríguez, M. Ortega, L. Aguilera Celorrio, *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.*, **2007**, *54*, 484.

Un paciente con sepsis debe ser tratado con antibióticos de amplio espectro lo antes posible, ya que cualquier retraso en el tratamiento pondría en riesgo su vida. La identificación de las bacterias causantes de la sepsis es la clave para elegir el tratamiento con el antibiótico adecuado.

El actual estándar usado en el diagnóstico de la sepsis es el cultivo de sangre. Lamentablemente, los resultados del cultivo se obtienen a las 24-72 horas y pueden ser falsos negativos en el caso de bacterias resistentes al cultivo o si el paciente ha recibido fármacos antimicrobianos antes de que la muestra de sangre fuera tomada.

En la sepsis, la cantidad de carga bacteriana en el torrente sanguíneo es 1-300 cfu/mL,<sup>97</sup> por lo que es difícil de detectar directamente. Por lo tanto, los nuevos métodos de detección molecular se basan en la amplificación de la muestra de sangre de una forma aislada y enriquecida por el ácido nucleico del agente bacteriano que la causa. Estas pruebas tienen un gran potencial porque acortan el diagnóstico y mejoran el cuidado de sepsis clínica, ya que resultan ser más independientes del tratamiento antibiótico previo o de las condiciones de cultivo del organismo causante.

El procedimiento del ensayo típicamente se compone de cuatro etapas (Figura 8): 1) cultivo para enriquecer de bacterias la sangre a estudiar; 2) concentración y aislamiento del material genético; 3) amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) de amplia gama; y 4) identificación post-PCR de los genes del agente bacteriano y resistentes a los antibióticos mediante técnicas de secuenciación.<sup>98,99</sup>

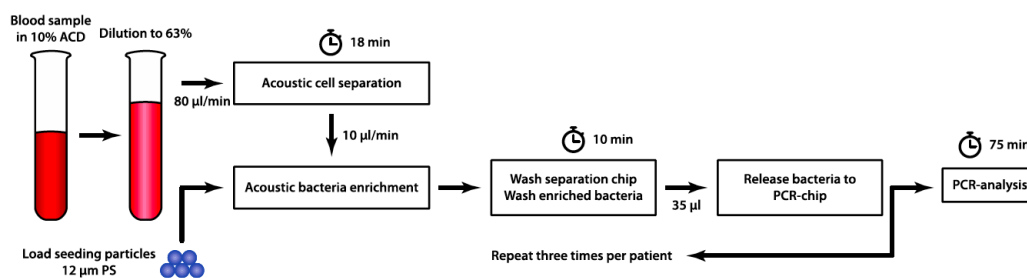


Figura 8.- Protocolo del proyecto ACUSEP para la determinación de la sepsis

<sup>97</sup> K. Y. Y. Chan et al., *Crit. Care Med.*, **2009**, 37, 2441.

<sup>98</sup> H. Westh et al., *Clin. Microbiol. Infect.*, **2009**, 15, 544.

<sup>99</sup> N. Wellinghausen et al., *J. Clin. Microbiol.*, **2009**, 47, 2759.

### 1.4.1. Aportación de la acustoforésis en la determinación de la concentración del organismo patógeno en sangre

La acustoforésis<sup>100</sup> permite la separación rápida de diferentes tipos de partículas entre sí y su medio. El método combina un campo de ultrasonido y un flujo laminar a través de un microcanal de silicio. Las partículas expuestas a un campo de ultrasonido se ven afectadas por una fuerza de radiación acústica. Esta fuerza mueve las partículas hacia los nodos de presión dependiendo de la densidad y la compresibilidad de las partículas y el medio. Las ondas de ultrasonidos se generan por un elemento piezocerámico que se acopla al chip de silicio que está presente en el canal de separación. La frecuencia del ultrasonido está sintonizada para coincidir con la longitud de onda media del ancho del canal, lo que da como resultado un plano nodal de presión a lo largo del canal y una presión anti plano nodal a lo largo de cada pared lateral de dicho canal.<sup>101</sup>

Como cada partícula o célula tiene una respuesta relativamente única para la separación mediante ultrasonidos, existe un “coeficiente acustoforético” que debe ser determinado para el organismo séptico. Esto se logra mediante la realización de ensayos piloto, donde las bacterias sépticas que se enriquecieron mediante el cultivo o por el método tradicional de aislamiento, se someten a acustoforésis, y las fracciones de flujo son analizadas por microscopia electrónica e inmunofluorescencia. La separación del organismo séptico se optimiza alterando repetidamente el caudal, la energía del ultrasonido y los ajustes de frecuencia.

Para concentrar el organismo causante de la sepsis, la sangre se inyecta en el chip acustoforético y se procesa para eliminar las células sanguíneas y enriquecerla de otros organismos causantes de sepsis (Figura 9).<sup>102</sup>

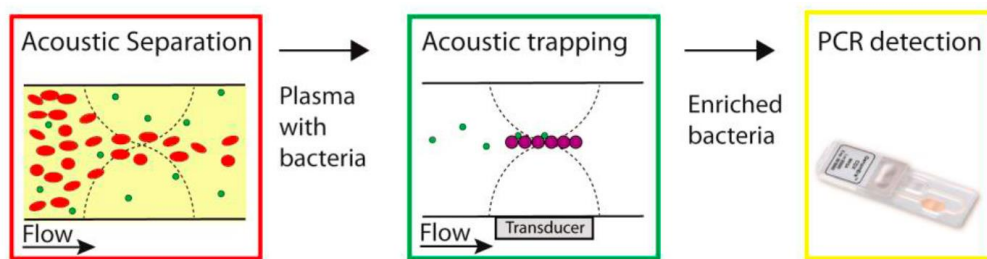


Figura 9.- Proceso de acustoforesis para el enriquecimiento bacteriano

<sup>100</sup> T. Laurell et al., *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, *36*, 492-506.

<sup>101</sup> A. Nilsson et al., *Lab. Chip.*, **2004**, *4*, 131-135.

<sup>102</sup> a) B. Hammarstrom, M. Evander, H. Barbeau, M. Bruzelius, J. Larsson, T. Laurell and J. Nilsson, *Lab. Chip*, **2010**, *10*, 2251. b) B. Hammarstrom, T. Laurell and J. Nilsson, *Lab. Chip*, **2012**, *12*, 4296. c) B. Hammarstrom, M. Evander, J. Wahlstrom and J. Nilsson, *Lab. Chip*, **2014**, *14*, 1005.

La separación de células sanguíneas se realiza centrándose en eritrocitos, plaquetas y glóbulos blancos en el centro del canal y en la extracción de una fracción de plasma suficientemente pura para el enriquecimiento del organismo a determinar. La cantidad del organismo séptico es sustancialmente menor que las células de sangre y por lo tanto no se ve afectado por la fuerza de la onda acustoforética. Después la fracción de plasma pasa a un resonador acustoforético, donde las partículas son retenidas, enriquecidas y posteriormente liberadas al apagar la excitación ultrasónica<sup>103</sup> (Figura 10).

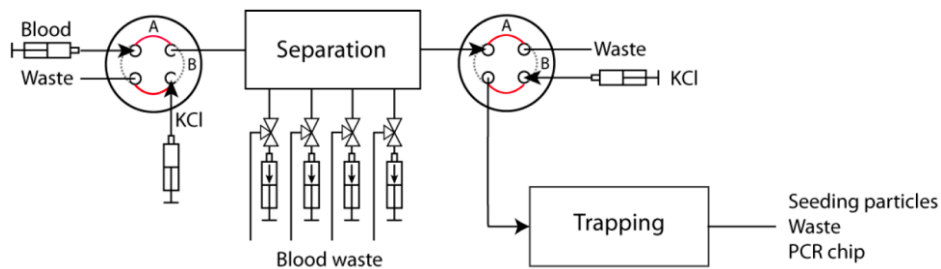


Figura 10.- Enriquecimiento del plasma en el resonador acustoforético

Después de la recolección acustoforética y la concentración de los organismos que causan la sepsis, se lleva a cabo la suspensión en un medio limpio y se transportan a las cámaras de PCR.<sup>104</sup>

#### 1.4.2. Detección de ácidos nucleicos usando sondas quelato de lantánidos

Con el método de complementariedad o método basado en los interruptores moleculares mencionado en la página 38 para formar el quelato lantánido, las características luminiscentes del ion captador de la luz y del ion portador se separan en dos mitades distintas, que son no fluorescentes de manera independiente, pero que mediante su adecuada combinación se puede formar un complejo altamente fluorescente. El marcaje puede darse en los extremos 3' y 5' de las sondas de los oligonucleótidos que serían complementarios a la secuencia amplificada, propia de cada especie de organismo que causa la sepsis y cuya detección se busca.

<sup>103</sup> A. Lenshof et al., *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 6030.

<sup>104</sup> M. Evander et al., *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 2984.

La principal ventaja de esta técnica de doble marcaje es la generación de una señal altamente específica y la excelente sensibilidad en el diagnóstico rápido de la sepsis.

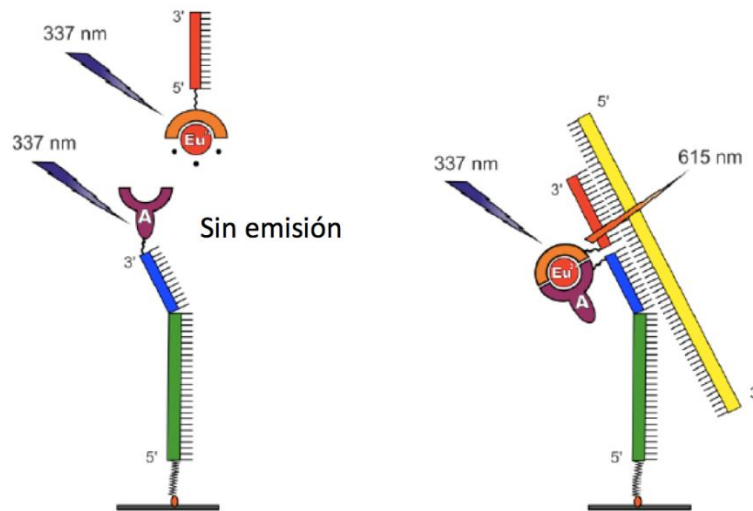


Figura 11.- Método de complementariedad en la técnica de doble marcaje

#### 1.4.3. Cartucho de integración acustoforética de la sangre y amplificación nucleica

La técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) se utilizará para la amplificación de los organismos causantes de la sepsis más común y los genes resistentes a los antibióticos. La detección puede realizarse con sondas complementarias solubles o con una matriz de complementación. Cuando se utiliza la complementación soluble, cada reacción de amplificación contiene sondas marcadas por los organismos a determinar y sondas marcadas para un control de amplificación interno. Si la detección se realiza con una matriz de complementación, se pueden observar múltiples sondas en distintas áreas de la superficie del chip lo que permite la detección de varios organismos.

Todos los reactivos necesarios para la detección y la amplificación pueden ser colocados y secados antes de meterlos en los recipientes de reacción para la PCR, que se integrarán en la unidad de preparación de la muestra para formar un cartucho (Figura 12a). Abacus Diagnostica Oy (participante en el proyecto ACUSEP) ha diseñado una plataforma instrumental totalmente automatizada utilizando el concepto de ensayo PCR homogénea y una tecnología de instrumento y chip usando una química de reactivo seco (Figura 12b).<sup>105</sup>

<sup>105</sup> V. Hagren et al., *Anal. Biochem.*, **2008**, 374, 411.

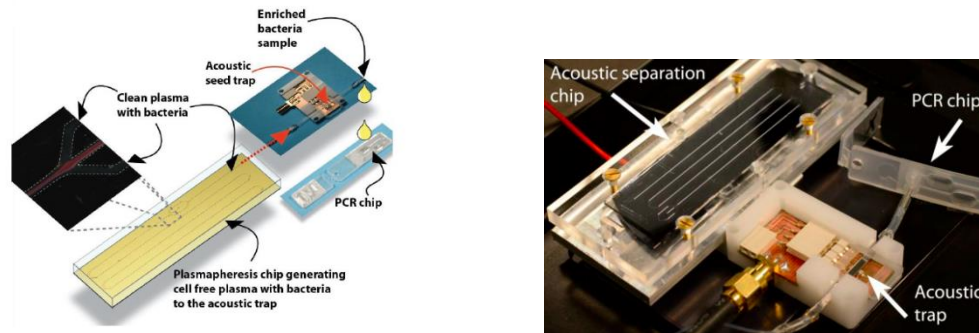


Figura 12.- a) Esquema del cartucho para la determinación de la sepsis. b) Cartucho real desarrollado por Abacus Diagnostica Oy

#### 1.4.4. Expectativas del proyecto

**Impacto científico.-** Llevar a cabo una demostración de que el aislamiento eficiente del organismo que causa la sepsis y la eliminación simultánea de inhibidores de la PCR de la sangre es posible mediante preparación de muestras por acustoforesis. Además, se demostraría que la detección del ácido nucleico y la preparación de la muestra pueden realizarse en un solo cartucho.

**Impacto económico.-** El coste anual de la sepsis en Europa está estimado aproximadamente en 7.600 millones de euros.<sup>106</sup> Al reducir el tiempo desde la toma de la muestra hasta obtener el resultado del diagnóstico de sepsis, pasando de varias horas a menos de una hora; combinando la preparación de muestras por acustoforesis y la reacción de PCR en un tubo cerrado; e iniciar el tratamiento adecuado lo más pronto posible, da como resultado una reducción de los costes del tratamiento y la mortalidad. Además, gracias a la identificación temprana de la bacteria, el tratamiento con antibióticos innecesarios se reduciría.

**Impacto social.-** La rápida identificación de los organismos causantes de la sepsis mejoraría la funcionalidad del sistema sanitario ya que se reduciría el número de hospitalizaciones mejorando la calidad de vida.

**Impacto ambiental.-** Mediante la reducción de la cantidad de agentes antimicrobianos extra que reciben los pacientes, disminuiría la carga antibiótica del medio ambiente, así como la aparición de nuevas cepas resistentes a los antibióticos.

**Impacto comercial.-** La aparición de herramientas de diagnóstico en el campo de la sepsis beneficiaría a las PYMES que venden la tecnología. Las primeras PYMES en aplicar dichas herramientas serían las que probablemente tomarían la delantera en el

<sup>106</sup> A. R. Neilson et al., *J. Crit. Care*, **2003**, *18*, 217-227.

mercado europeo y mundial. Esto debería beneficiar no sólo a las PYME europeas, sino también a las pequeñas corporaciones que ya están colaborando.

Impacto agrícola.- La sepsis en la ganadería es un problema paralelo al nuestro y que igualmente podría ser atajado con esta tecnología. Por ejemplo, la vaca sufre infecciones de mastitis por varias especies de *Staphylococcus*, lo que se traduce en graves consecuencias para los agricultores en lo referido a los costes de producción de leche. Mejorando la precisión y la velocidad de diagnóstico sería posible reducir el uso de antibióticos en la producción de leche, reduciendo los costes de su producción, la exposición del ganado a los antibióticos y la contaminación ambiental que producen.





## OBJETIVOS

---



## 2. OBJETIVOS

---

Tras poner en contexto los fundamentos de la luminiscencia de lantánidos, las principales estructuras sobre las que descansan las sondas basadas en estos complejos, sus principales aplicaciones, y el interés en el desarrollo de nuevas estructuras basadas en el concepto de interruptores luminiscentes para aplicaciones en la detección de ciertas cepas bacterianas, el presente trabajo aborda el desarrollo de nuevos ligandos para la obtención de complejos altamente luminiscentes y que mediante la incorporación de grupos reactivos para su anclaje a biomoléculas como oligonucleótidos, puedan tener aplicaciones como marcadores biológicos.<sup>107-110</sup>

A pesar de los esfuerzos por aislar a iones lantánidos del entorno acuoso con el diseño de ligandos muy envolventes del entorno de coordinación metálico como son las estructuras tipo criptandos,<sup>27b,76</sup> calixarenos<sup>71</sup> y ciclodextrinas,<sup>72</sup> mencionadas anteriormente, no se consigue su completo aislamiento del medio, lo que da lugar a una disminución de la luminiscencia de los complejos de Eu(III) y Tb(III)<sup>78</sup> por vías desexcitación vibracionales no radiativas. A partir de estos datos y a partir de la amplia experiencia del grupo de investigación en estructuras de tipo abierto basadas en ligandos poliheterocíclicos con restos aminopolicarboxilato, esta tesis se va a centrar en la síntesis de ligandos con este tipo de estructura abierta, fundamentalmente por dos motivos: i) tratar de variar la disponibilidad de puntos de coordinación alrededor del lantánido, y ii) llevar a cabo la introducción de una amplia variedad de sustituyentes que repercutirá por un lado en la posibilidad de sintonizar las características de absorción y sensibilización de los mismos y por otro en un mayor número de potenciales aplicaciones, todo ello gracias a la versatilidad sintética que ofrecen este tipo de estructuras.

Los inicios del grupo de investigación se centran en la síntesis y el estudio de luminiscencia de complejos Ln(III) derivados de la 2,6-bis(*N*-pirazolil)piridina, un ligando tridentado N<sub>3</sub> análogo al ligando terpiridina. Los complejos que se forman entre el Rutenio y la terpiridina son interesantes y bien conocidos en su empleo como

---

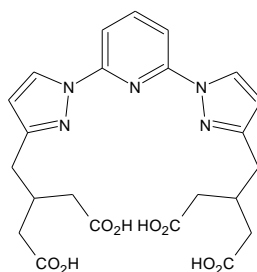
<sup>107</sup> a) N. Hildebrandt, L. Charbonnière, M. Beck, R. Ziessel, H.-G. Löhmansröben, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 7612. b) N. Hildebrandt, L.J. Charbonnière, H.-G. Löhmansröben, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2007**, Article ID 79169.

<sup>108</sup> J. Yuan, V. Wang, *Trens Anal. Chem.*, **2006**, *25*, 490.

<sup>109</sup> a) B. Song, G.L. Wang, M.Q. Tan, J.L. Yuan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 13442. b) L. Charbonnière, N. Hildebrandt, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 3241.

<sup>110</sup> D.M. Kolpashchikov, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 4709.

catalizadores para reacciones fotoquímicas y redox,<sup>111</sup> pero la dificultad para realizar reacciones de sustitución u otro tipo de modificaciones estructurales sobre este sistema, hace plantearse la posibilidad de introducir el anillo de pirazol, que también da lugar a estructuras N<sub>3</sub> de similar topología, pero con mayor número y tipo modificaciones estructurales simples en cuanto a los sustituyentes de estos sistemas.<sup>112</sup> Una de las primeras estructuras desarrolladas son moléculas conceptualmente basadas en el ácido 1,2-etanodiamino-*N,N,N',N'*-tetraacético (EDTA), capaz de formar fuertes complejos con iones metálicos,<sup>52a,113</sup> pero ahora dotada de grupos heteroaromáticos capaces de sumar posiciones de coordinación al metal y simultáneamente cromóforos para su sensibilización. Estas estructuras presentan ambas subunidades, la 2,6-bis(*N*-pirazolil)piridina y el ácido iminoacético (**L36**).<sup>44a</sup>



L 36

Los espectros de ultravioleta de todos los complejos estudiados (Eu(III) y Tb(III)) resultan muy similares, pero diferentes con respecto a los de los ligandos libres. La diferencia de absorción en el nivel de menor energía entre los ligandos libres y sus complejos, indica una perturbación producida por la coordinación del ion metálico.<sup>13,114</sup> Es importante tener en cuenta que mientras los pirazoles están fuera del plano de la piridina en el ligando libre se espera que, cuando se produce la coordinación al metal a través de los tres nitrógenos como sucede en otros ligandos

<sup>111</sup> a) V. Balzani, F. Barigelleti, L. de Cola, *Top Curr. Chem.*, **1990**, 158, 31. b) J.P. Sauvage, M.D. Ward, *Inorg. Chem.*, **1991**, 30, 3869.

<sup>112</sup> D.L. Jameson, K.A. Goldsby, *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 4992.

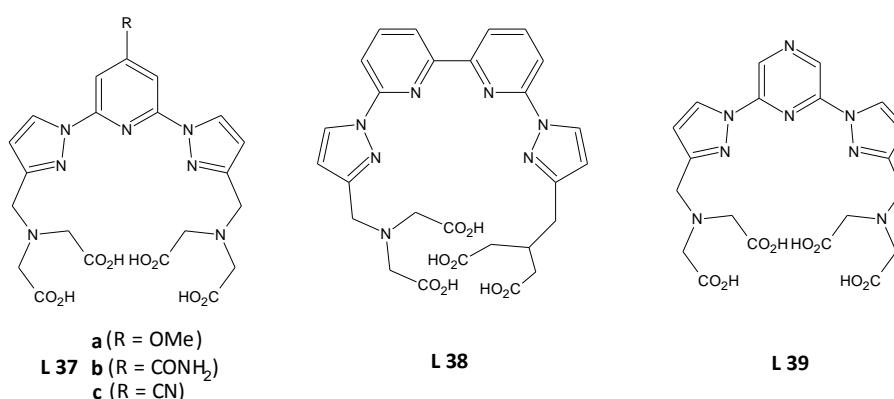
<sup>113</sup> V.M. Mukkala, C. Sund, M. Kwiatkowski, P. Pasanen, M. Högbereg, J.J. Kankare, H. Takalo, *Helv. Chim. Acta*, **1990**, 75, 1621.

<sup>114</sup> E. Weiss, T. Lambersten, B. Schubert, J.K. Cockcroft, A. Wiedenmann, *Chem. Ber.*, **1990**, 123, 79.

$N_3$ , los pirazoles adquieren mayor planaridad aumentando la conjugación<sup>115,116</sup> y originan un cambio en sus propiedades fotofísicas.<sup>117</sup>

En cuanto a los tiempos de vida de los complejos formados, se observan valores altos, lo que indica que los restos iminodiacético juegan un papel importante: i) dejan menos espacio disponible para que el agua acceda a la primera esfera de coordinación y ii) mejoran la estabilidad del complejo, lo que los hace especialmente interesantes como sondas luminiscentes.<sup>118</sup>

A la vista de los buenos resultados obtenidos con **L36**, se han preparado otros ligandos similares.<sup>44b,50</sup>



En todos los casos, el producto de partida usado es el derivado dihalogenado del heterociclo de seis miembros (piridina, pirazina, pirimidina) lo que da acceso a preparar esta variedad de ligandos. La variación en la unidad cromófora muestra diferencias en la absorptividad de los complejos y en sus características de emisión. Esta modulación de sus características los convierte en interesantes modelos para proseguir con la optimización de este tipo de cromóforos y su aplicación como sondas luminiscentes en aplicaciones biomédicas.

Un aspecto a considerar es que muchos de estos ligandos resultan ser intrínsecamente fluorescentes pero cuando se forman sus complejos, esta fluorescencia disminuye drásticamente sin interferir en la luminiscencia del metal debido a que los tiempos de vida media de los complejos de Eu(III) y Tb(III) son mayores y la medida se hace con

<sup>115</sup> E.C. Constable, *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.*, **1986**, 30, 69.

<sup>116</sup> a) S. Rüttimann, G. Bernardinelli, C.M. Moreau, A.F. Williams, A.W. Addison, *Polyhedron*, **1992**, 11, 635. b) C Piguët, A.F. Williams, G. Bernardelli, E. Moret, J.-C. Bünzli, *Helv. Chim. Acta*, **1992**, 75, 1697.

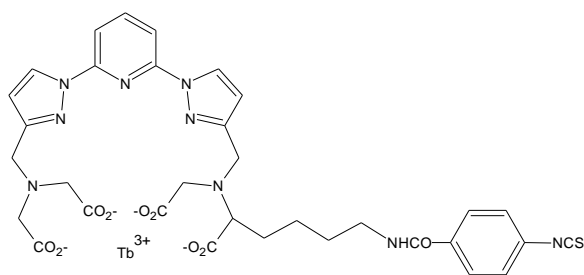
<sup>117</sup> M. Regueiro-Figueroa, A. Nonat, G.A. Rolla, D. Esteban-Gómez, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas, L.J. Charbonnière, M. Botta, C. Platas-Iglesias, *Chem. Eur. J.*, **2013**, 19, 11696.

<sup>118</sup> J.C. Rodríguez-Ubis, H. Takalo, V.-M. Mikkala, *US Patent 5859215*, **1999**.

resolución temporal. La longitud de onda de excitación obtenida en estos complejos es la misma para un ligando dado, lo que indica que la geometría de coordinación del resto orgánico es muy parecida, independientemente del metal considerado.

Los complejos con el ligando **L37b** muestran tiempos de vida largos con elevados rendimientos cuánticos, lo que sugiere que este tipo de sondas podrían unirse a biomoléculas mediante un enlace de tipo peptídico (grupo  $-\text{CONH}_2$ ) y permitir su uso en aplicaciones biomédicas.

A partir de la estructura **L36** que muestra unos excelentes resultados para la luminiscencia de su complejo de Tb(III), se lleva a cabo la modificación de uno de los restos iminodiacético (**L41**).<sup>119</sup> Esta modificación supone incluir una cadena de mayor longitud en el resto iminodiacético dotándole de un grupo isotiocianato ( $-\text{NCS}$ ), con el fin permitir de este modo su acoplamiento a biomoléculas que posean grupos amino, como es el caso de las proteínas responsables de la respuesta inmunológica.



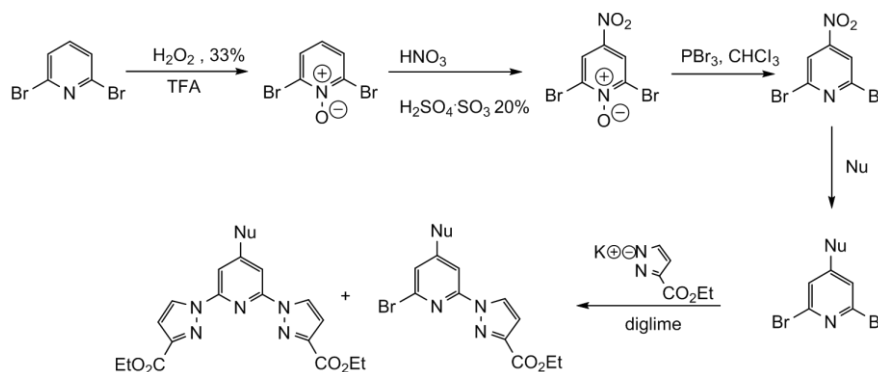
L 41

Al igual que el ligando **L36**, este nuevo ligando (**L41**) presenta dos máximos de excitación y se comprueba que sus propiedades luminiscentes no se ven modificadas sustancialmente por la incorporación del nuevo resto iminodiacético, por tanto, aunque no supone una mejora a nivel de sus propiedades emisivas, ya buenas en la estructura base, su mantenimiento permite su empleo como marcador en diferentes tipos de análisis inmunológicos.

A la vista de estos resultados, se constata que la modificación de la estructura bipirazol-piridina da buenos resultados en lo que a términos luminiscentes se refiere. Como problema asociado a este tipo de estructuras, cabe citar la limitada variedad de ligandos que pueden sintetizarse. La ruta de síntesis general presentada en el Esquema 1 muestra que por un lado la sustitución de los átomos de halógeno sobre la piridina es una reacción limitada por la relativa dificultad de esta sustitución

<sup>119</sup> a) H. Takalo, V.M. Mukkala, L. Meriö, J.C. Rodríguez-Ubis, R. Sedano, O. Juanes, E. Brunet, *Helv. Chim. Acta*, **1997**, *80*, 372. b) Tesis Rosa Sedano Pérez, Universidad Autónoma de Madrid, **2001**.

nucleófila, que requiere de condiciones enérgicas y por otro el acceso a sustituyentes sobre la posición 4 ha estado limitado a restos alcoxi, nitro, amida y ciano y derivados de estos.



Esquema 1

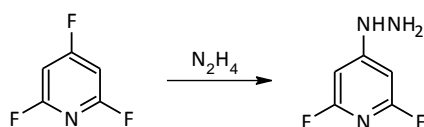
Una solución a esta limitación podría ser la evaluación de distintos precursores de la piridina con sustituyentes en posiciones 2, 4 y 6, que permitiesen una mayor versatilidad en su acceso a diferentes sustituyentes, así como una selectividad en la introducción a voluntad de los mismos, lo que podría conducir al acceso a bibliotecas de compuestos en los que se podrían modificar a voluntad y de modo diferente los sustituyentes en estas tres posiciones del anillo de piridina, abriendo un abanico más amplio de posibilidades sintéticas.

En primer lugar es importante conocer la reactividad descrita sobre este tipo de estructuras. Los pioneros en el estudio de la reactividad de polihalopiridinas fueron Schlosser y cols.<sup>120</sup> En concreto sus trabajos se centran en las 2,4,6-trihalopiridinas, sobre las que en sus primeros trabajos llama la atención el resultado obtenido en las reacciones de sustitución nucleófila heteroaromática, en cuanto a los resultados del control regioquímico se refiere.

Cuando existe sólo un átomo de halógeno en la posición 2(6) o 4 de la piridina, la sustitución nucleófila no ofrece ningún problema y se consigue llevar a cabo con mayor o menor facilidad dependiendo de los grupos involucrados. Los problemas surgen cuando existen dos o más grupos salientes en las posiciones activadas y que, dependiendo de su naturaleza, puede obtenerse una mezcla de productos de sustitución siendo casi exclusivo el producto sustituido en la posición 4.<sup>121,122</sup>

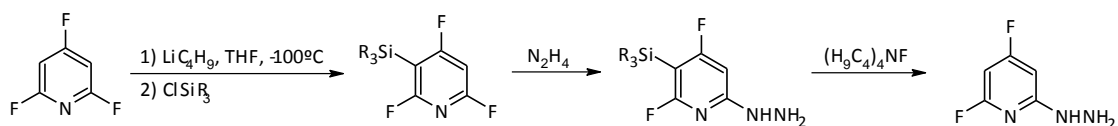
<sup>120</sup> a) M. Schlosser, T. Rausis, C. Bobbio, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 127. b) M. Schlosser, T. Rausis, C. Bobbio, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 2494.

<sup>121</sup> R.E. Banks, J.E. Burgess, W.M. Cheng, R.N. Haszeldine, *J. Chem. Soc.*, **1965**, 575.



Esquema 2

Mediante el uso de grupos voluminosos, como por ejemplo el trialquilsililo ( $-\text{SiR}_3$  donde  $\text{R} = \text{CH}_3$ ), se observa la supresión total de la movilidad de los átomos de halógenos vecinos,<sup>123</sup> lo que permite controlar la regioselectividad y poder realizar la reacción de sustitución en otras posiciones.



Esquema 3

Tras el estudio de diferentes nucleófilos se elige la hidracina como reactivo nucleófilo puesto que las hidracinopiridinas<sup>123</sup> resultantes son intermediarios muy versátiles. Este intermedio permite ser incorporado en pirazoles<sup>124</sup> por condensación con compuestos 1,3-dicarbonilo, puede reducirse para dar lugar a aminopiridinas mediante hidrogenolisis,<sup>125</sup> o puede perder los dos átomos de nitrógeno por desdiazotación. En cualquier caso el grupo hidracina se puede sustituir también por un átomo de hidrógeno.

Ziessel y Charbonnière<sup>126</sup> fueron quienes, continuando los trabajos de Schlosser consistentes en la introducción de la función hidracina en la piridina y su posterior transformación en un sustituyente bromo,<sup>127</sup> insertaron dos anillos pirazólicos

<sup>122</sup> S.S. Laev, V.D. Shteingarts, *Synthesis*, **1988**, 479.

<sup>123</sup> G.M. Brooke, J. Burdon, M. Stacey, J.C. Tatlow, *J. Chem. Soc.*, **1960**, 1768.

<sup>124</sup> B. Stanovnik, J. Steve, *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations*, Ed. Thieme, **2002**, 15-205.

<sup>125</sup> a) B.T. Newbold, *The Chemistry of the Hydrazo, Azo and Azoxy Groups*, Ed. Wiley, **1975**, Parte 2, 600-641. b) D. Holland, G.J. Moore, C.J. Tamborski, *J. Org. Chem.*, **1964**, 29, 1562. c) R.D. Chambers, J. Hutchinson, W.K.R. Musgrave, *J. Chem. Soc.*, **1964**, 3736.

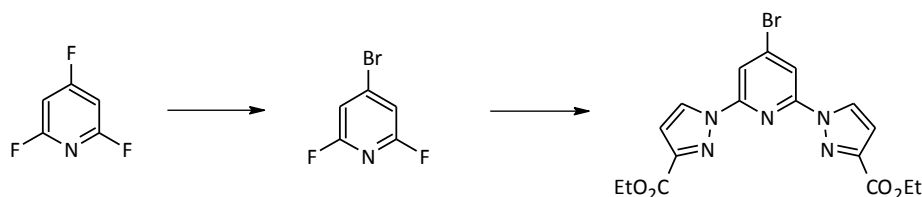
<sup>126</sup> P. Kadjane, M. Starck, F. Camerel, D. Hill, N. Hildebrandt, R. Ziessel, L.J. Charbonnière, *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 4601.

<sup>127</sup> D.R. Cefalo, J.I. Henderson, H.H. Mokri, *U.S. Patent 7087755*, **2006**.



mediante una sustitución nucleófila en las posiciones fluoradas 2 y 6 de la piridina, originando la 4-bromo-2,6-bis(*N*-pirazolil)piridina.

Esta vía muestra la mayor reactividad de las posiciones con flúor frente a su análogo bromo como grupo saliente, lo que facilita la reactividad sobre ciertas posiciones piridínicas y permite el acceso a una mayor versatilidad de ligandos poliheteroaromáticos con el anillo de piridina como parte central de las estructuras.



Esquema 4

A la vista de los antecedentes descritos hasta ahora, el desarrollo de este trabajo de tesis se orienta sobre la síntesis de derivados de las polifluorpiridinas, usando como producto de partida la 2,4,6-trifluorpiridina. La elección de esta piridina se debe, como se acaba de comentar a la facilidad inherente de la sustitución de estos halógenos y a la posibilidad que abre esta reactividad para la introducción de hasta tres sustituyentes diferentes que permitan jugar con la distinta naturaleza de los mismos para crear una esfera de coordinación óptima para el ion lantánido y modular las características de sensibilización en función de la naturaleza de estos sustituyentes, dando como resultado una emisión luminiscente eficiente con estos nuevos ligandos antena y de posible aplicación en el proyecto ACUSEP tal y como se planteaba en la Figura 11 (pág. 45).

En el diseño que requiere este tipo de aplicación, las características del ligando antena a desarrollar difieren sustancialmente de las señaladas y mostradas para otras aplicaciones de este tipo de sondas luminiscentes. Hasta ahora se ha discutido acerca del interés de que el ligando antena posea características de aislamiento del ion lantánido, lo que redundaba en una protección de la esfera de coordinación del ion frente a moléculas de agua de coordinación desactivantes de la luminiscencia del metal. En el caso de la aplicación que se pretende desarrollar es necesaria la interacción enlazante entre este ligando antena sensibilizador y la molécula portadora del lantánido denominada "Ion Carrier Chelate" (ICC). Este diseño implica que el quelato ICC muestre estabilidad en su complejación con el lantánido pero al mismo tiempo presente vacantes en su esfera de coordinación para la complejación con el ligando antena próximo. Por parte del ligando antena, se trata de que éste tenga grupos coordinantes que muestren afinidad por el ion, formando parte de un complejo

[Ln(ICC)] pero no demasiados, con el fin de evitar que el ion salte desde el complejo inicial [Ln(ICC)] para formar un nuevo complejo con el ligando antena arruinando el efecto de interruptor molecular que se busca (Figura 12).

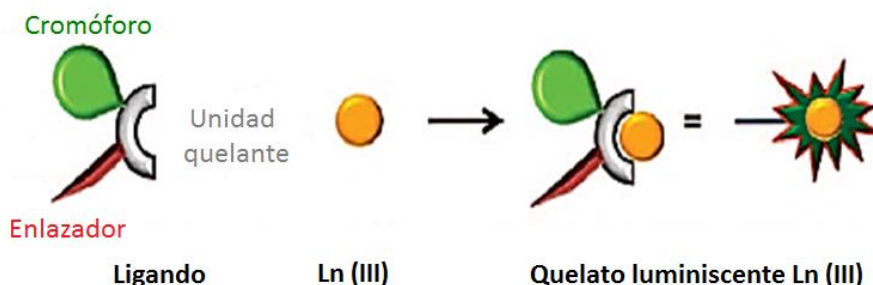
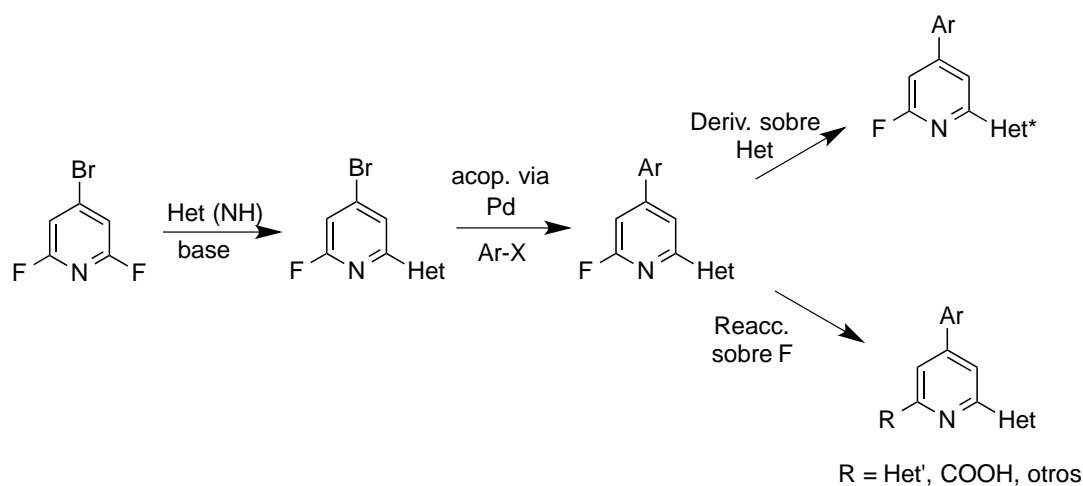


Figura 12.- Efecto interruptor

Las posibilidades sintéticas abiertas por una molécula como la 4-bromo-2,6-difluoropiridina permiten la sustitución selectiva de una de las posiciones fluoradas con restos heterocíclicos coordinantes, mientras que el átomo de bromo permite el acceso a un gran número de sustituyentes aromáticos mediante reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio. Esta estrategia permite combinar distintos sustituyentes sobre las posiciones 2 y 4 quedando la posición fluorada restante como tercera posición susceptible de ampliar la diversidad estructural de las estructuras propuestas.

En el Esquema 5 se recoge la propuesta sintética sobre la que descansa el trabajo realizado en esta memoria.



Esquema 5

Un punto importante en el diseño de los ligandos antena a preparar es que siempre hay que tener en cuenta la necesidad de que la molécula final posea un punto de anclaje para su conjugación sobre la cadena de oligonucleótido.

La naturaleza y grado de sustitución del anillo de piridina se evaluará atendiendo a las propiedades fotofísicas de sus complejos de lantánidos. La viabilidad de los mismos se comprobará mediante su conjugación sobre oligonucleótidos y la hibridación de estos sobre cadenas de oligonucleótidos modelo y bacterianos. Este estudio pretende mostrar una prueba de concepto que permita el desarrollo ulterior sobre el que descansa el sistema de acustoforesis que se pretende poner a punto en el proyecto ACUSEP en el que se engloba este trabajo.

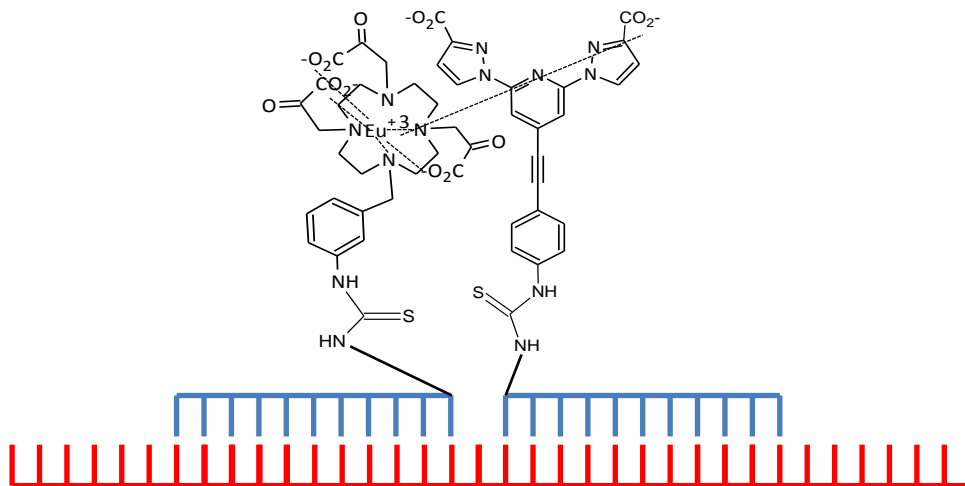


Figura 13.- Hibridación del ADN bacteriano con los oligonucleótidos marcados



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. SÍNTESIS

---



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. SÍNTESIS

---

Como se ha comentado en los Objetivos, la versatilidad que ofrece la 4-bromo-2,6-difluorpiridina es elevada. Por ello, tomando como referencia los antecedentes descritos en el capítulo anterior con respecto a la introducción de anillos pirazólicos en las posiciones 2 y 6 de la piridina, se realizan sustituciones nucleófilas para obtener otros derivados que presentan anillos pirazólicos, indazólicos, pirazoles con restos iminodiacético, así como combinaciones de anillos pirazólicos e indazólicos, lo que permite obtener diferentes familias de ligandos.

En cuanto a la posición 4 de la piridina, la introducción de diferentes sustituyentes se lleva a cabo mediante reacciones de Suzuki-Miyaura con derivados de ácidos aril borónicos o Sonogashira con alquinos terminales, lo que proporciona diferentes propiedades fotofísicas a los ligandos y que serán estudiadas más adelante.

A continuación se describe la síntesis de las diferentes familias que se encuentran clasificadas en función de los diferentes anillos que conforman su estructura.

#### 3.1. Ligandos bpirazólicos derivados de la 4-bromo-2,6-difluorpiridina

Como ya se ha mencionado anteriormente, este trabajo está relacionado con la participación de nuestro grupo en la síntesis de nuevos ligandos para el proyecto ACUSEP. La preparación de esta primera familia de ligandos tiene como objetivo mejorar el ligando de referencia que está siendo usado por los compañeros de proyecto en los ensayos de marcaje de los oligonucleótidos.

El ligando de referencia consiste en un anillo de piridina al cual se encuentran unidos ácidos carboxílicos en la posición 2 y 6 de la piridina y el grupo 4-feniletinilisotiocianato en la posición 4, tal y como está representado en la Figura 14.

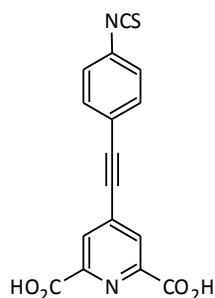
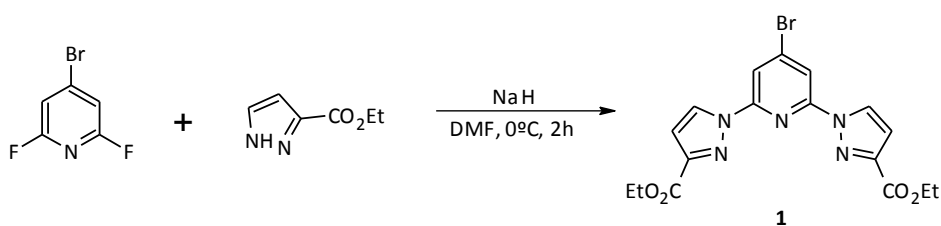


Figura 14.- Ligando de referencia

Debido a la experiencia de nuestro grupo en la síntesis de los derivados de las bispirazolilpiridinas, se preparan dos ligandos de este tipo: el primero que contiene un grupo feniletinilo con el fin de poder estudiar su comportamiento reactivo para poner a punto su síntesis, y un segundo ligando que presenta un punto de anclaje con el fin de poder compararlo con el ligando que se ha tomado como referencia en el desarrollo del proyecto ACUSEP.

#### Síntesis de la 4-bromo-2,6-bis-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)piridina

La síntesis de este compuesto inicialmente se lleva a cabo mediante la sustitución de los átomos de Flúor de la 4-bromo-2,6-difluorpiridina por el 3-etoxicarbonilpirazol siguiendo el procedimiento de Ziesel y Charbonnière tal y como se muestra en el Esquema 6.<sup>125</sup>



Esquema 6

La reacción se realiza usando hidruro sódico (NaH) para la formación del pirazolato siendo el disolvente la *N,N'*-dimetilformamida (DMF). Esta reacción genera como producto secundario el derivado monosustituido del que es posible variar su porcentaje con facilidad lo que, como se verá más adelante, también tiene un enorme potencial en la síntesis de otro tipo de ligandos que se incluyen en esta memoria.



El uso de la DMF como disolvente presenta como inconvenientes la dificultad para ser evaporada, siendo la destilación la manera más efectiva para su eliminación del medio de reacción, y su calentamiento excesivo puede originar simultáneamente la descomposición del producto que se quiere obtener.

Con el fin de evitar el uso de este disolvente, se busca una alternativa que presente similares propiedades químicas (disolvente aprótico) pero con menor punto de ebullición, siendo el tetrahidrofurano (THF) el disolvente elegido. La reacción se lleva a cabo en las mismas condiciones que las mostradas en el Esquema 6, con la salvedad de que el disolvente empleado es el THF.

De nuevo, el resultado de la reacción es la obtención mayoritaria del producto bispirazólico y una pequeña cantidad del producto resultante de la monosustitución (5 %). Por tanto, una vez comprobado que un cambio de disolvente no afecta al desarrollo de la reacción, se realiza el cambio definitivo a THF como disolvente.

Es importante destacar que la utilización de pirazoles asimétricamente sustituidos, implica el riesgo de obtener mezclas de regioisómeros por ataque de cualquiera de los dos átomos de nitrógeno del anillo de pirazol sobre las posiciones fluoradas de la piridina. Con el empleo del 3-etoxicarbonilpirazol en estas condiciones de reacción, se origina exclusivamente el producto con la regioquímica buscada 1,3. La obtención de este único isómero cuando se emplea 3-etoxicarbonilpirazol puede explicarse por la formación de un único anión en el que la carga negativa reside sobre el nitrógeno 1. Este comportamiento ya había sido observado en nuestro grupo para las reacciones de sustitución con el 3-etoxicarbonilpirazol en la síntesis de los derivados bispirazólicos.<sup>43</sup>

Los resultados experimentales (espectros de resonancia magnética nuclear, RMN) para este producto, confirman la simetría del compuesto lo que indica la sustitución de los dos átomos de Flúor y, además, las constantes de acoplamiento de los protones pirazólicos confirman que la regioselectividad corresponde a la 1,3.

Una vez sintetizada la unidad bispirazolilpiridina, y como ya se ha comentado antes, se lleva a cabo la reacción de Sonogashira para la introducción de los derivados fenilacetilénicos.

### Reacción de Sonogashira

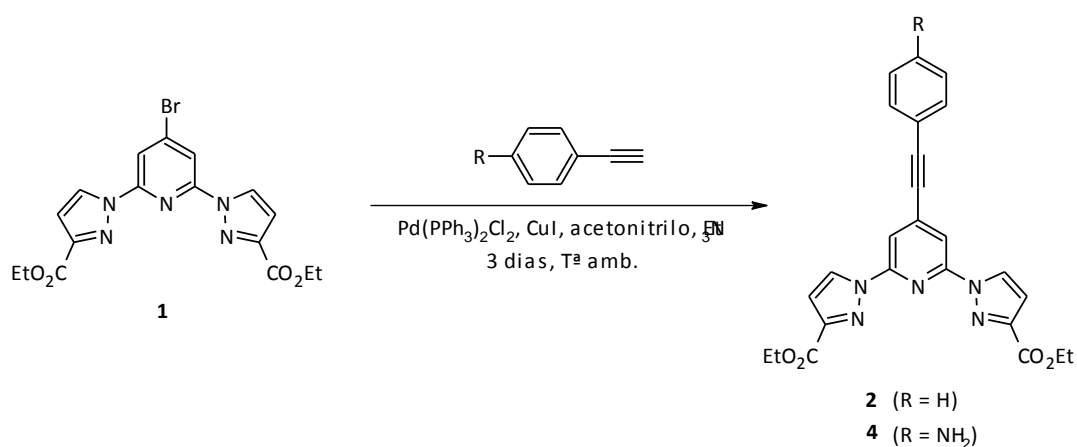
La reacción de Sonogashira<sup>128</sup> se realiza en primer lugar con el fenilacetileno dando lugar al ligando **2**, probando de esta manera la reactividad del bromo cuando se quiere

---

<sup>128</sup> a) K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 4467; b) K. Sonogashira *In Metal-Catalyzed Reactions*; F. Diederich, P.J. Stang, Eds.; Wiley-VCH: New York, 1998; c) P.J. Stan *In Modern*

introducir un derivado acetilénico estando presentes dos grupos pirazólicos. Una vez comprobado que no ofrece ningún problema la realización de este tipo de síntesis, se procede a realizar la sustitución con el 4-aminofenilacetileno para obtener el otro ligando (**4**) que es realmente el producto de interés.

Esta síntesis se lleva a cabo según se recoge en el Esquema 7. La única complicación que aparece en esta reacción es la completa eliminación del catalizador de Paladio una vez que la reacción ha finalizado, ya que a pesar de la purificación mediante cromatografía no consigue eliminarse completamente. Un lavado con éter etílico es capaz de eliminar todo rastro del catalizador aunque el rendimiento de la reacción se resiente, dando lugar a los productos puros con rendimientos del 55 %.



Esquema 7

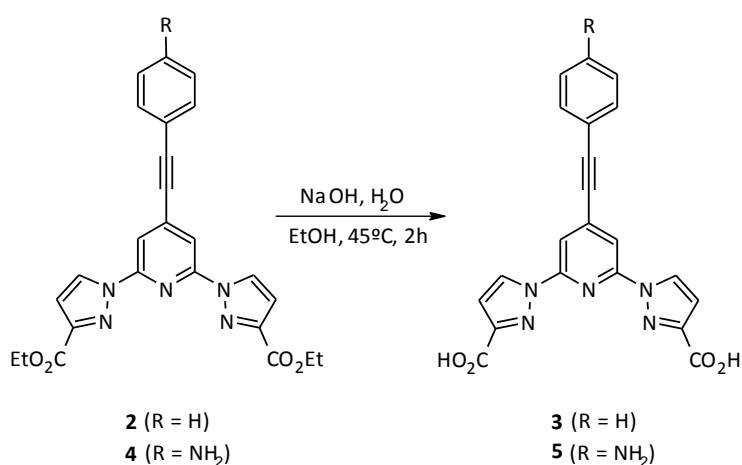
En el caso del compuesto sin sustituir (**2**) su espectro de <sup>1</sup>H-RMN muestra claramente la aparición de las señales correspondientes al anillo aromático. Dos grupos de señales aromáticas aparecen a 7,58 y 7,41 ppm, correspondientes a los protones del fenilo monosustituído. Su espectro de <sup>13</sup>C-RMN pone de manifiesto la presencia de los carbonos cuaternarios que están formando el triple enlace (91,9 y 91,2 ppm), y mediante un espectro de masas se confirma la existencia del producto al aparecer el pico molecular M<sup>+</sup> a 456 u.m.a., correspondiente a la masa monoisotópica del ligando.

La confirmación de que se ha obtenido el ligando **4** se realiza asimismo mediante el espectro de <sup>1</sup>H-RMN en el cual aparecen las señales aromáticas de los cuatro protones que ponen de manifiesto sus acoplamientos (7,38 y 7,00 ppm). Y, de la misma manera que en el ligando **2**, su espectro de <sup>13</sup>C-RMN muestra la existencia de los dos carbonos cuaternarios correspondientes al triple enlace (91,9 y 91,2 ppm) además de otra de las

señales características de este producto, el carbono cuaternario unido al grupo  $-NH_2$  (147,6 ppm). Su espectro de masas confirma la estructura del producto puesto que presenta el pico molecular  $M^+$  a 471 u.m.a.

### Reacción de hidrólisis

La reacción descrita en el Esquema 8 da lugar a la sal sódica de los bispirazoles ácido. El tratamiento con ácido clorhídrico (HCl) permite obtener los ácidos carboxílicos con rendimientos en torno al 80 %.



Esquema 8

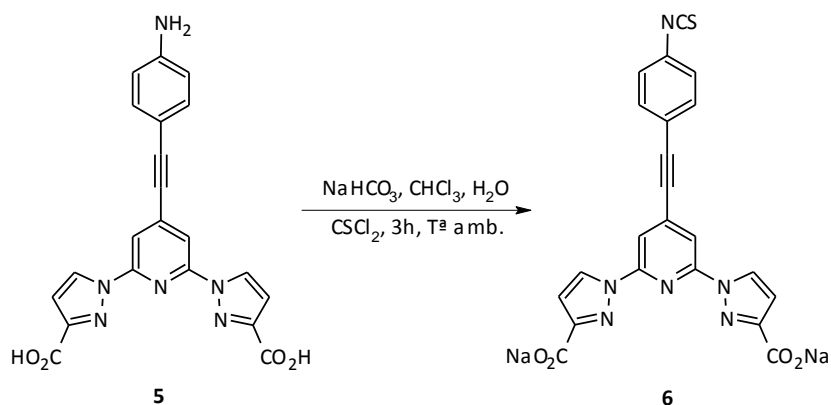
La confirmación de la obtención de estos productos se realiza mediante sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN. La baja solubilidad de estos productos en cloroformo hace necesario un cambio de disolvente para poder ser registrados.

En el caso de los espectros de protón, la evidencia más clara es la ausencia de los protones del éster; mientras que en el caso de los espectros de carbono la desaparición de estos carbonos relativos al grupo etilo del éster y la aparición del carbono del ácido carboxílico evidencian la presencia de los productos deseados.

### Síntesis de los isotiocianatos

La finalidad de la preparación de este compuesto es disponer de un grupo isotiocianato ( $-NCS$ ) que permita su anclaje a los oligonucleótidos.

Por ello, a partir del ligando **5** se realiza la reacción con tiofosgeno ( $\text{CSCl}_2$ ) para transformar el grupo  $-\text{NH}_2$  en el grupo isotiocianato ( $-\text{NCS}$ ), que sirve como punto de anclaje al oligonucleótido correspondiente. Su síntesis, con un rendimiento del 90 %, se muestra en el Esquema 9.



*Esquema 9*

En general, y en relación con las aminas de partida, estos isotiocianatos presentan gran insolubilidad por lo que su caracterización mediante resonancia magnética nuclear (RMN) no proporciona espectros bien definidos que permitan confirmar inequívocamente la obtención del producto.

La confirmación de la estructura de este producto se realiza mediante un espectro de masas, obteniéndose un pico molecular  $\text{M}^+$  a 501 u.m.a.

Este tipo de productos, una vez sintetizados, son muy sensibles y para evitar su degradación por acción de la temperatura se mantienen almacenados a  $-18^\circ\text{C}$  hasta su empleo en las reacciones de conjugación con los oligonucleótidos.

### 3.2. Ligandos monosustituidos derivados de la 4-bromo-2,6-difluorpiridina

El bispirazol preparado en la sección anterior corresponde a una estructura diácido similar al derivado dipicolinato empleado en el sistema preliminar descrito y que se empleará como referencia a lo largo de muchos puntos de esta memoria. Sin embargo la estructura del ácido dipicolínico no tiene muchas posibilidades de variación

estructural en lo referido a distintos cromóforos y/o grupos coordinantes adicionales. Habida cuenta de que el diseño de un ligando que actúe como antena (AL), en la reacción de hibridación, requiere la presencia de grupos coordinantes que se complementen con el quelato portador del lantánido (ICC), los grupos coordinantes deberían poder variarse en número y naturaleza (ácidos carboxílicos, heterociclos coordinantes). En este sentido el primero de los compuestos preparados tiene el previsible inconveniente que los grupos ácido están demasiado alejados como para que tanto estos como los heterociclos puedan coordinar simultáneamente con el lantánido ya complejoado con el ICC cuya estructura es la que se recoge en el Figura 15.

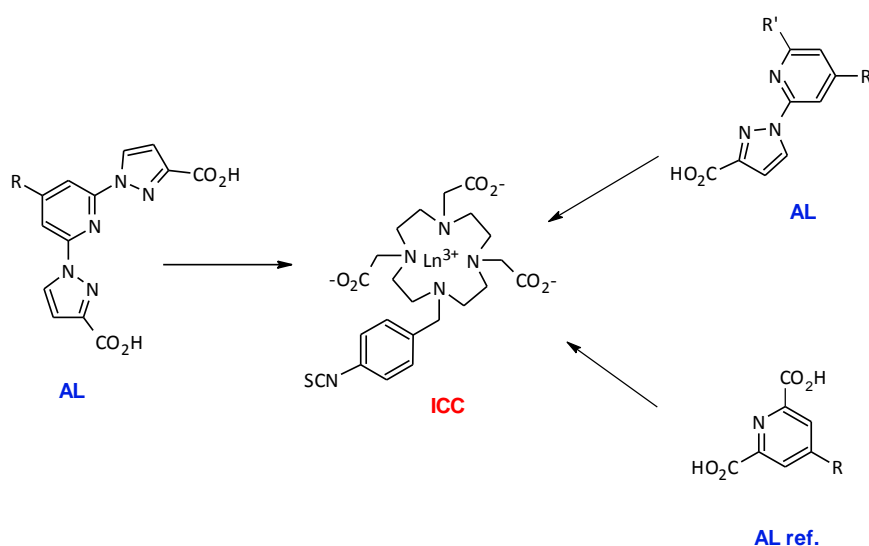


Figura 15.- Ligando ICC a emplear en el estudio y aproximación de distintos ligandos antena

La topología de los ligandos antena puede suponer un aspecto de importancia y el diseño de distintas estructuras podría resultar de interés para conocer que grupos y en que disposición pueden resultar más adecuados para la generación de la señal de luminiscencia óptima.

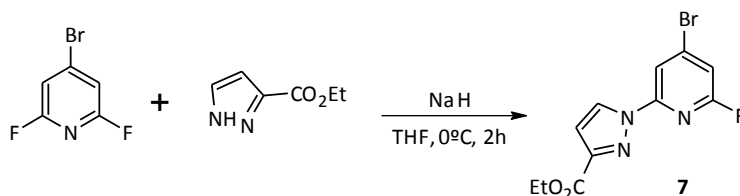
La gran reactividad de los átomos de flúor permite su sustitución por diversos anillos aromáticos para la creación de las diferentes familias y, como se ha comentado, dependiendo de la estequiometría de la reacción se pueden obtener sustituciones de uno o dos átomos de Flúor, por lo que este juego de reactividad ofrece muchas posibilidades para la generación de distintos ligandos con un número variable de posiciones de coordinación.

En primer lugar, se aborda la síntesis de familias que se denominan monosustituidas debido a que sólo contienen un anillo heteroaromático (pirazol o indazol) además de la piridina y el átomo de bromo como estructura general. De esta manera y, mediante las

reacciones Suzuki-Miyaura o Sonogashira, se procede a la sustitución del Bromo dando lugar a distintos ligandos sobre los que se realizará el estudio de sus propiedades fotofísicas mediante la formación de sus correspondientes complejos con Eu(III) y Tb(III).

### 3.2.1. Síntesis de ligandos monopirazólicos

Para la síntesis de esta serie es necesaria la preparación del producto que contiene un único anillo pirazólico. A partir de la reacción de sustitución descrita en el apartado anterior, se optimiza hasta conseguir la sustitución de sólo uno de los átomos de Flúor como se observa en el Esquema 10.



Esquema 10

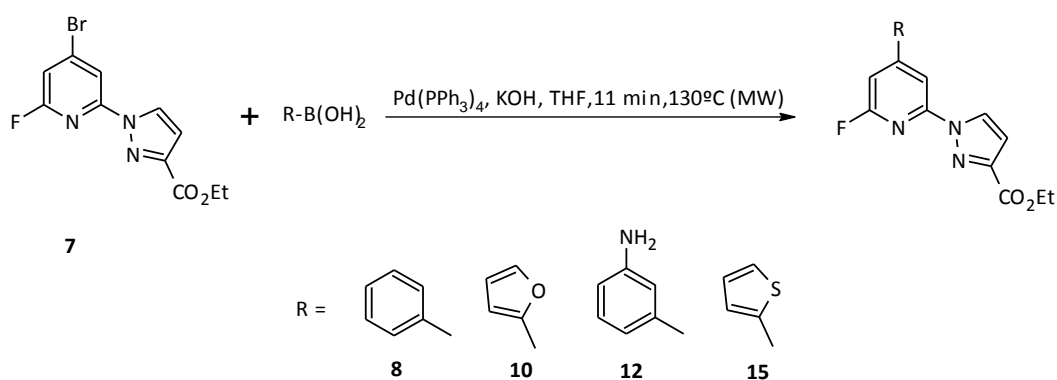
La diferencia en la síntesis de ambos productos reside en el número de equivalentes necesarios para su obtención. En la síntesis del producto monosustituido cabe esperar una proporción estequiométrica 1:1, pero con este ratio de equivalentes se obtiene gran cantidad de producto doblemente sustituido, por lo que la estequiometría adecuada para obtener de manera mayoritaria el producto monopirazólico es usar defecto de pirazol con respecto a la 4-bromo-2,6-difluorpiridina, y que tras varias pruebas se establece en 1 equivalente de la piridina frente a 0,6 equivalentes del pirazol (1:0,6). El resultado es una mezcla de compuesto monopirazólico y dipirazólico (**7** y **1** respectivamente) de la que se aísla el primero con un rendimiento del 83 %.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra claramente la presencia de asimetría en la estructura. En el espectro se aprecia la existencia del átomo de flúor por el acoplamiento de éste con el protón piridínico y la presencia de dos señales para los protones no equivalentes de la piridina. Asimismo, el acoplamiento de los protones de pirazol vuelve a ser indicativo de la regioquímica 1,3 del producto. En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN, la señal más evidente de que el producto es el esperado, es que sólo aparece un carbono al que se encuentra unido un átomo de flúor.

A partir de este producto (**7**) se sintetiza la familia de ligandos monopirazólicos mediante reacciones de acoplamiento cruzado tipo Suzuki-Miyaura y Sonogashira.

### Reacción de Suzuki-Miyaura

Para la obtención de estos productos se realiza la reacción de Suzuki<sup>129</sup> con distintos ácidos borónicos cuyas estructuras y condiciones se muestran en el Esquema 11, dando como resultado los productos buscados con rendimientos entre el 65 y el 85 %.



Esquema 11

Habitualmente, la reacción de Suzuki-Miyaura se lleva a cabo calentando la reacción a 60°C durante 12-14 horas. Con el fin de intentar mejorar los rendimientos y, principalmente, disminuir el tiempo de reacción, la síntesis se realiza haciendo uso de microondas, lo que logra que la reacción se complete en 11 minutos. En cuanto a la mejora del rendimiento para esta modificación, el empleo de microondas no proporciona aumentos significativos del mismo.

En cuanto a los resultados de sus espectros de <sup>1</sup>H-RMN, para el caso del ligando **8** las principales señales que caracterizan la obtención del producto, son las del nuevo anillo aromático introducido. En él aparecen dos grupos de multipletes (7,74-7,71 para dos protones y 7,52-7,50 ppm para los otros tres) de los cinco protones aromáticos presentes en la estructura.

<sup>129</sup> a) N. Miyaura, K. Yamada, A. Suzuki, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 3437. b) N. Miyaura, A. Suzuki, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1979**, 866. c) N. Miyaura, T. Yano, A. Suzuki, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 2865. d) N. Miyaura, T. Yanagi, A. Suzuki, *Synth. Commun.*, **1981**, 11, 513. e) N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 2457.

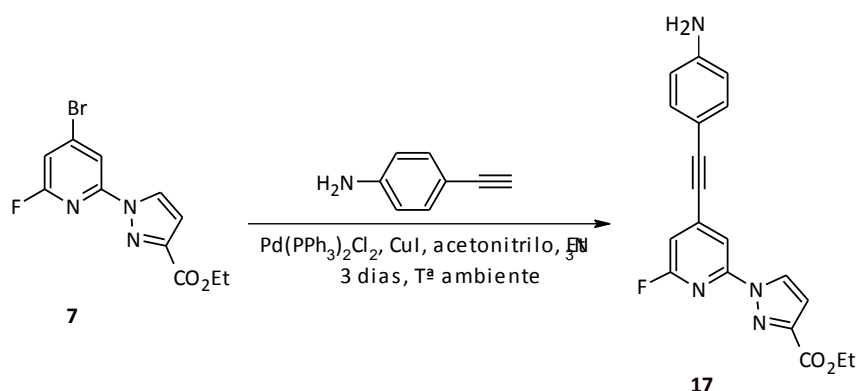
En el caso del ligando **10**, las señales más significativas son las de los tres protones que forman el anillo de furano. Estas señales aparecen como dobles dobletes debido a su acoplamiento y mostrando unos valores de desplazamiento de 7,58, 6,95 y 6,57 ppm.

Para el compuesto **12** su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra la aparición de las señales aromáticas de los cuatro protones aromáticos a 7,28, 7,03, 6,96 y 6,79 ppm con constantes típicas de un sistema *meta*-disustituido.

Por último, el compuesto **15** muestra como señales características las correspondientes al anillo de tiofeno con tres multipletes a 7,66, 7,49 y 7,16 ppm, más desapantalladas respecto al furano debido a la diferente electronegatividad que proporciona el heteroátomo (O, S).

### Reacción de Sonogashira

El procedimiento para la síntesis de este tipo de ligandos es similar al discutido anteriormente para el ligando bispirazolilpiridina sustituido como se muestra en el Esquema 12.



Esquema 12

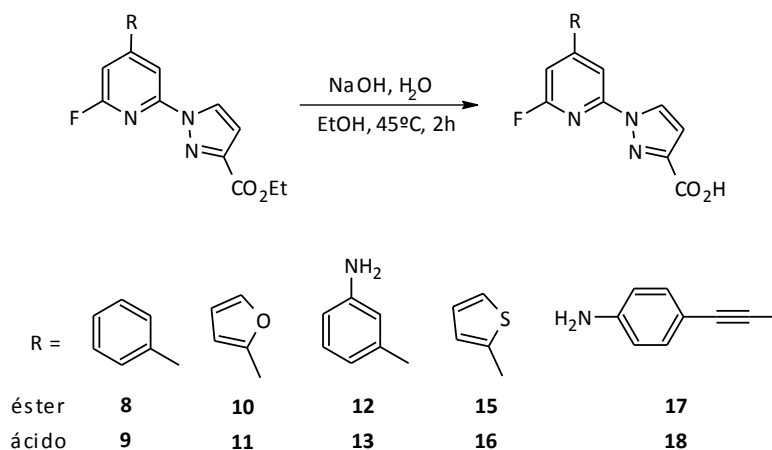
En este caso, sólo se ha preparado el compuesto amino sustituido ya que es el adecuado para su transformación en isotiocianato y posterior conjugación sobre el oligonucleótido.

El compuesto se obtiene con un rendimiento del 50 % y su espectro de protón muestra las señales correspondientes al fenilo *para*-disustituido, mientras que en el de Carbono la presencia de los carbonos acetilénicos corroboran su estructura.



### Reacción de hidrólisis

La etapa de hidrólisis de estos productos permite obtener los ligandos en forma de ácido carboxílico con rendimientos entre 70-99 % (Esquema 13).

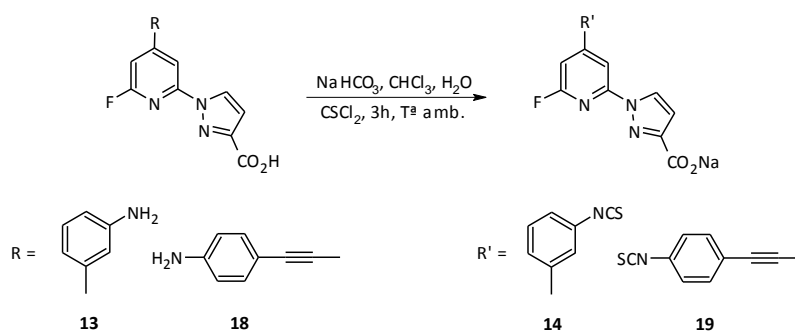


Esquema 13

El tratamiento del medio de reacción con ácido clorhídrico conduce a los ácidos monocarboxílicos. Sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN realizados en metanol muestran la desaparición de los grupos etilo; y sus espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN la aparición del carbono carboxílico a desplazamientos en torno a 184 ppm.

### Síntesis de los isotiocyanatos

Para los derivados monosustituídos, solamente los ligandos **13** y **18** poseen el grupo amino que puede ser transformado en el isotiocianato como se recoge en el Esquema 14.



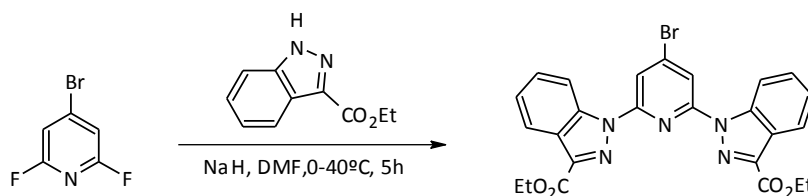
Esquema 14

La formación de los isotiocianatos, con rendimientos casi cuantitativos, conduce a compuestos muy insolubles en los disolventes habituales de RMN. Su estructura se confirma mediante sus espectros de masas y la aparición de la correspondiente banda de absorción de IR para la nueva función isotiocianato.

### 3.2.2. Síntesis de ligandos monoindazólicos

La segunda familia de ligandos monosustituidos es aquella que está formada por un único anillo de indazol. La presencia de un anillo aromático condensado en la nueva estructura debe hacer que la respuesta luminiscente cambie debido a la mayor deslocalización electrónica que es capaz de aportar dicho sistema.

Nuevamente, el referente para preparar esta serie de ligandos se encuentra en el procedimiento de Ziesel y Charbonnière,<sup>130</sup> mediante el cual introducían dos anillos de 3-etoxicarbonilindazol en la 4-bromo-2,6-difluorpiridina en unas condiciones de reacción más enérgicas que las puestas a punto para el caso del 3-etoxicarbonilpirazol, tal y como se muestra en el Esquema 15.



Esquema 15

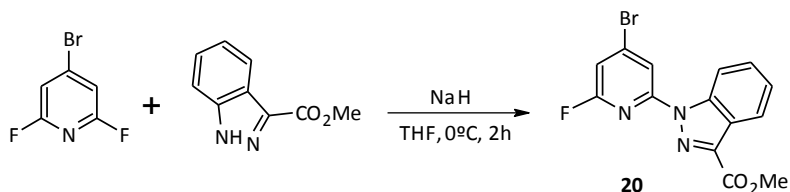
De modo análogo a la reacción puesta a punto para la introducción, se realizan algunas variaciones en la síntesis de esta familia con el fin de optimizar la reacción conforme a la necesidad de obtener fundamentalmente compuestos monosustituidos.

La reacción se lleva a cabo con 3-metoxicarbonilindazol empleando THF, una temperatura de 0°C y cantidad estequiométrica de piridina e indazol (1:1).

En estas condiciones se obtiene el derivado **20** como único producto con un 84 % de rendimiento (Esquema 16). Esta reacción destaca en que es selectiva para la obtención del derivado monosustituido, en comparación con la reacción equivalente con pirazol,

<sup>130</sup> M. Starck, P. Kadjane, E. Bois, B. Darbouret, A. Incamps, R. Ziesel, L.J. Charbonnière, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 9164.

en la que para obtener de forma mayoritaria el producto monosustituido equivalente (**7**) había que emplear un defecto de pirazol, 1:0,6 y, aun en estas condiciones se obtenía siempre el derivado disustituido que era necesario separar. Nuevamente, debido a la presencia del grupo ester se obtiene exclusivamente el regioisómero 1,3.



Esquema 16

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra la aparición de los multipletes correspondientes a los nuevos protones indazólicos en los que son evidentes sus acoplamientos, así como la señal característica de los protones del grupo metoxilo ( $-\text{OCH}_3$ ).

En la Figura 16 se muestran los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de la zona aromática correspondientes al ligando monopirazólico (**7**) y monoindazólico (**20**).

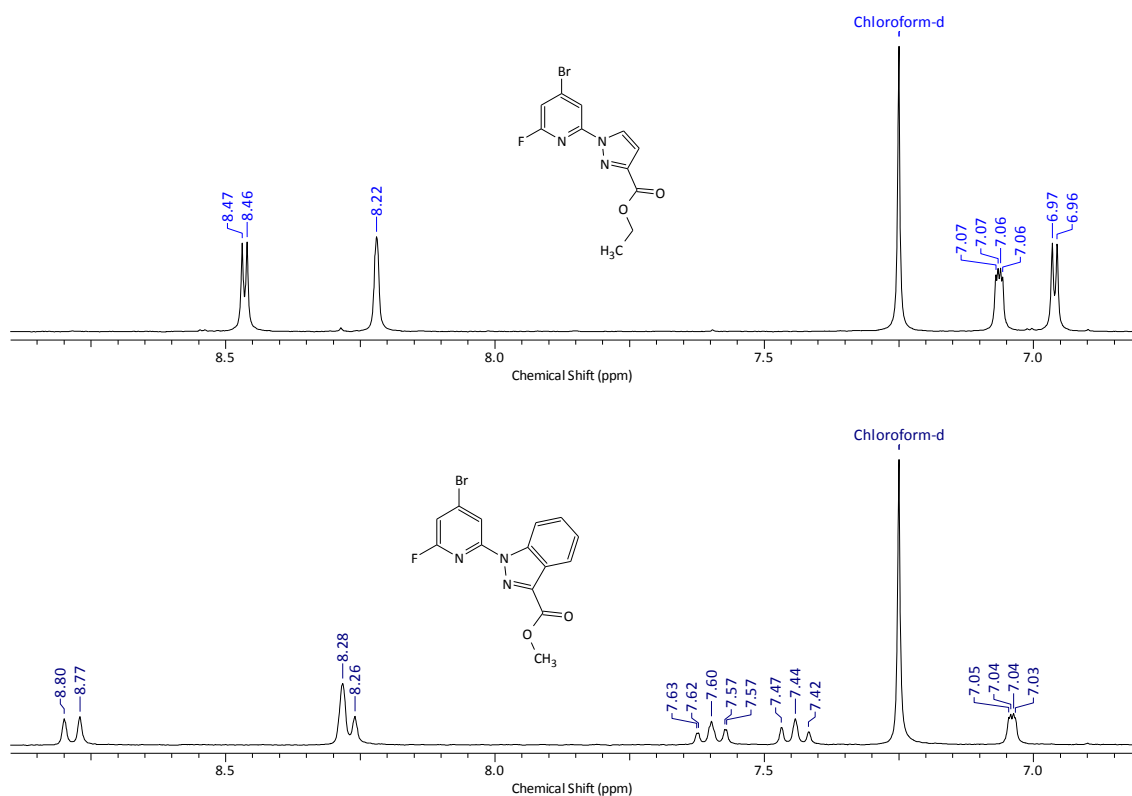


Figura 16.- Espectros del monopirazol y monoindazol en forma éster

Como se observa en la figura, el acoplamiento entre el átomo de flúor y el protón piridínico no produce cambios en su desplazamiento químico. De manera similar, un cambio de anillo heteroaromático no influye notablemente en el desplazamiento químico del otro protón de la piridina (8,22 ppm en pirazol y 8,28 ppm en indazol). Este hecho demuestra que no existe una marcada interacción entre el protón del anillo indazólico y el de la piridina.

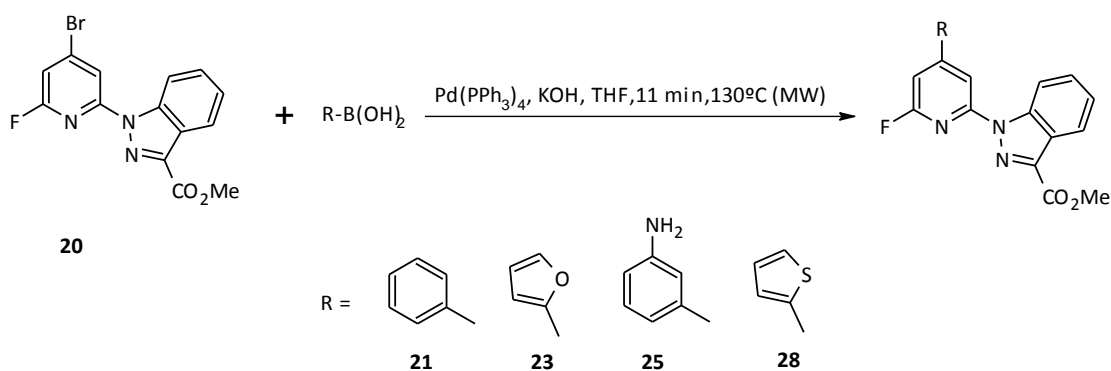
Respecto a su espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN hay dos señales muy claras de la presencia del producto que son los carbonos del grupo éster metílico (163,7 ppm para  $-\text{C}=\text{O}$  y 53,0 ppm para  $-\text{OCH}_3$ ).

Su espectro de masas confirma la estructura en la que aparece el patrón de picos moleculares isotópicos  $\text{M}^+$  y  $\text{M}^++2$  a 350 y 352 u.m.a. y que corresponden a la masa del producto **20**.

A partir de este producto se lleva a cabo la síntesis de los compuestos 4-sustituídos mediante un esquema similar al descrito para los derivados monopirazólicos.

### Reacción de Suzuki-Miyaura

El procedimiento general para la síntesis de estos nuevos ligandos se recoge en el Esquema 17. Los rendimientos de estas reacciones de acoplamiento sitúan entre el 70 y 80 %.



Esquema 17

En el caso del ligando **21**, su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra tres grupos de multipletes (8,28, 7,75 y 7,51 ppm) correspondientes a los cinco protones aromáticos presentes en la estructura.

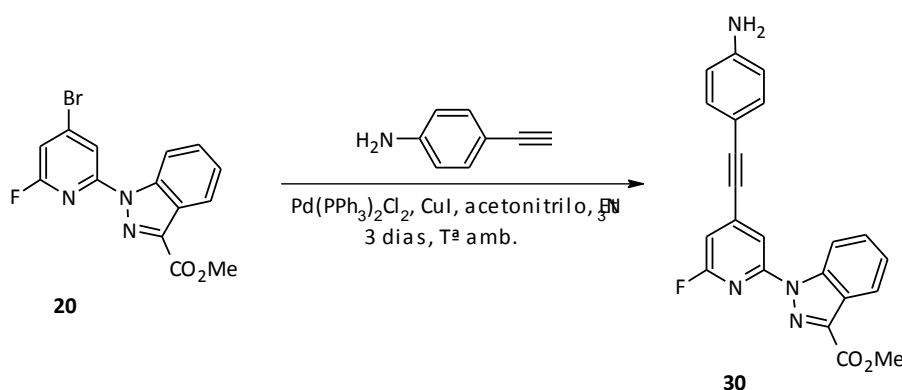
El ligando **23** muestra como señales más significativas los tres protones que forman el anillo de furano. Estas señales aparecen como dobles-dobletes debido a sus acoplamientos mostrando unos valores de desplazamiento de 7,58, 7,08 y 6,58 ppm.

Para el ligando **25** su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra la aparición de las señales aromáticas correspondientes a los cuatro protones de la estructura. Estas señales aparecen a 7,43, 7,30, 7,11 y 6,80 ppm con los multipletes característicos.

Finalmente, el ligando **28** muestra como señales características aquellas que pertenecen al grupo tienilo y que aparecen como dobles-dobletes a 7,59, 7,43 y 7,17 ppm.

### Reacción de Sonogashira

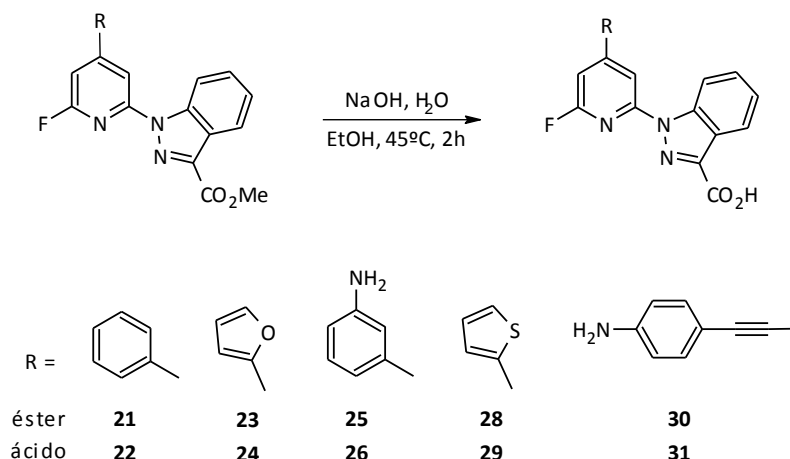
El procedimiento general para la síntesis de este ligando se recoge en el Esquema 18.



El compuesto **30** muestra de nuevo el sustituyente 4-aminofeniletinilo con dos dobles para el sistema *para*-disustituido y los carbonos cuaternarios del acetileno en su espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN a 88,3 y 91,2 ppm. El rendimiento de esta reacción es del 52 %, resultado muy similar al obtenido con su homólogo pirazólico.

### Reacción de hidrólisis

La etapa de hidrólisis de estos productos, con rendimientos en torno al 90 %, permite obtener los ligandos en forma de ácido carboxílico tal y como se muestra en el Esquema 19.

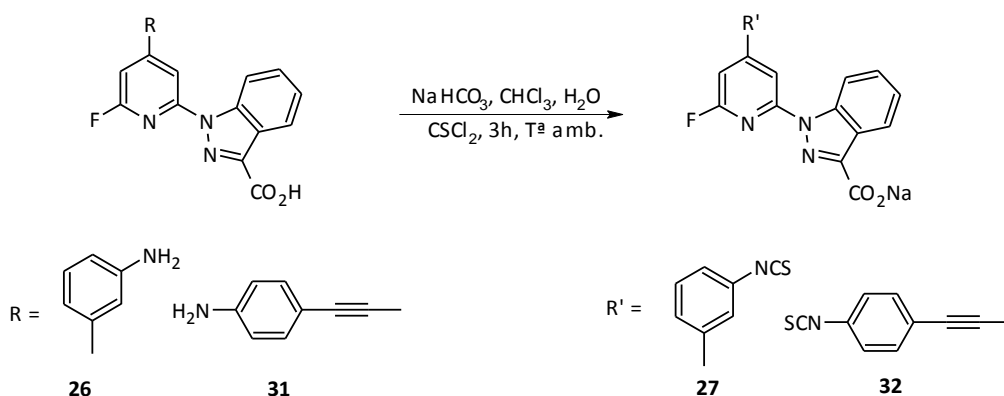


Esquema 19

La confirmación de la presencia de estos productos se realiza, principalmente, mediante la observación de la desaparición de la señal metoxilo (-OCH<sub>3</sub>) del grupo éster y la aparición del carbono del ácido carboxílico en torno a 153,0 ppm en todos los casos.

### Síntesis de los isotiocianatos

Para los derivados monoindazólicos, solamente los ligandos **26** y **31** poseen el grupo amino que puede ser transformado en el isotiocianato (Esquema 20) obteniéndose en ambos casos en su forma de sal sódica con excelentes rendimientos (95 %).



Esquema 20

Para llevar a cabo la caracterización del ligando **27**, éste es suficientemente soluble en metanol. Su espectro de <sup>1</sup>H-RMN por comparación con el de su precursor muestra un

desplazamiento de las señales aromáticas debido al cambio del grupo  $\text{-NH}_2$  por  $\text{-NCS}$ . Su espectro de masas confirma la estructura con una señal del pico molecular  $\text{M}^+$  a 412 u.m.a., además del espectro de infrarrojos que muestra la banda característica del grupo  $\text{-NCS}$  a  $2108\text{ cm}^{-1}$ .

En el caso del ligando **32** ha sido imposible registrar su espectro de RMN debido a su baja solubilidad. Se caracteriza mediante su espectro de masas, obteniéndose un pico molecular  $\text{M}^+$  a 437 u.m.a. que es indicativo de la presencia del producto, además del espectro de infrarrojo que muestra la banda característica del grupo  $\text{-NCS}$  a  $2096\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.2.3. Síntesis de ligandos monopirazólicos con restos iminodiacético

Como se ha discutido anteriormente, uno de los aspectos que pueden marcar el comportamiento de los ligandos antena en su aproximación al lantánido complejoado previamente al ICC, es la disposición y número de ligandos coordinantes sobre la antena. Un número muy bajo o una estructura con una geometría inadecuada puede conducir a una baja afinidad hacia el lantánido, lo que se traduce en su comportamiento luminiscente, mientras que un número de puntos de coordinación elevado puede conducir a la extracción del lantánido por competencia con la afinidad sobre el ICC y por consiguiente, a la lectura errónea de emisión luminiscente como consecuencia de la formación de complejo  $\text{AL(Ln)}$  y no exclusivamente al complejo  $\text{AL(Ln)ICC}$  sobre el sistema de reconocimiento de oligonucleótidos descrito (Figura 7).

En este sentido, los ligandos preparados hasta aquí o han sido productos simétricos derivados de la bispirazolilpiridina que presentan 3 átomos de nitrógeno y dos ácidos carboxílicos en su complejación con el lantánido, o derivados monosustituídos con solamente dos átomos de nitrógeno y un único ácido carboxílico.

Ambas estructuras pueden ser ligandos interesantes para la preparación de oligonucleótidos marcados, pero también se han considerado interesantes los derivados de los sistemas monosustituídos en los que el ácido carboxílico que pende del anillo de pirazol se transforma en un diácido derivado del ácido iminodiacético como se muestra en la siguiente estructura general (Figura 17).

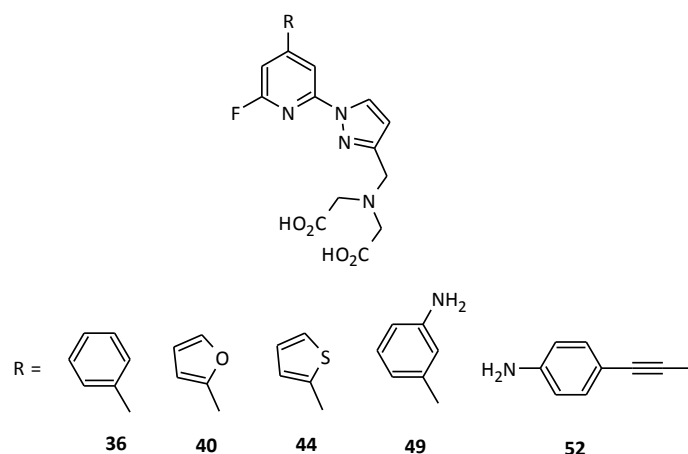


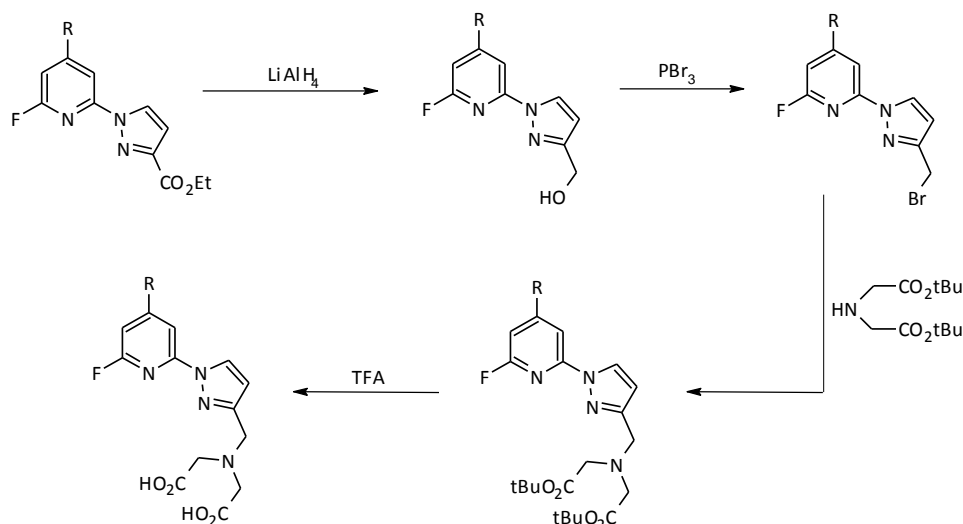
Figura 17.- Estructuras con restos iminodiacético propuestas para los derivados monosustituídos de la piridina

Este tipo de restos iminodiacético han sido muy empleados en la complejación de iones lantánidos y por ese motivo se ha llevado a cabo la preparación de esta nueva familia de ligandos.

Análogamente a los ligandos hasta ahora descritos, se pretende conseguir una serie de ligandos con distintos sustituyentes en la posición 4 de la piridina y un resto iminodiacético en el anillo pirazólico. Este tipo de ligandos presentan también la posibilidad, mediante modificación del resto iminodiacético, de que todos ellos con independencia del grupo que lleven en la posición 4 de la piridina y que no siempre permite la introducción de un grupo de anclaje isotiocianato, puedan disponer de este grupo para el marcaje del oligonucleótido.

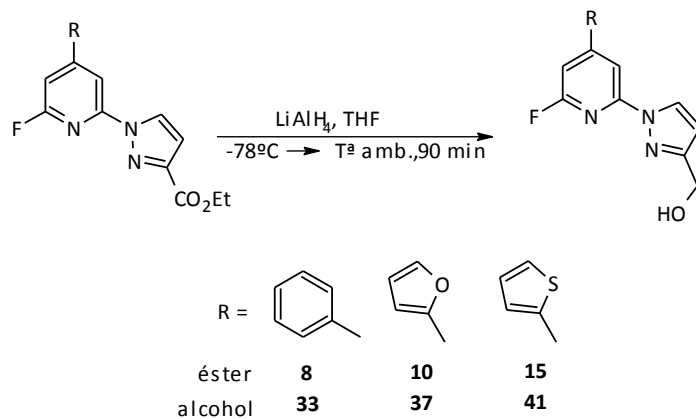
La preparación de estos ligandos se aborda siguiendo el procedimiento general que se muestra en el Esquema 21.





Esquema 21

A partir de los derivados monopirazólicos **8**, **10** y **15** preparados anteriormente, se lleva a cabo la reducción del grupo éster con LiAlH<sub>4</sub> en tetrahidrofurano (THF) según se muestra en el Esquema 22, obteniéndose estos productos con rendimientos en torno al 90 %.



Esquema 22

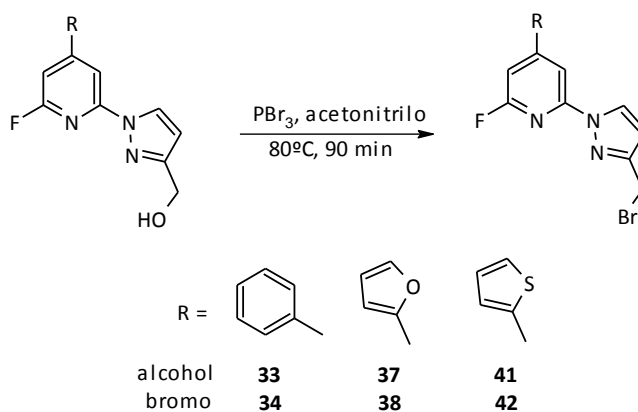
Sus espectros de <sup>1</sup>H-RMN confirman la reducción del grupo éster con la aparición de las señales correspondientes al grupo metileno del alcohol y un claro apantallamiento de los protones H-4 y H-5 del anillo del pirazol debido también a la presencia del grupo hidroximetilo en la nueva estructura (Tabla 3).

LIGANDO	$\delta$ protón 5-Pz (ppm)	$\delta$ protón 4-Pz (ppm)
<b>8</b>	8,55	6,98
<b>33</b>	8,45	6,46
<b>10</b>	8,48	6,54
<b>37</b>	8,40	6,44
<b>15</b>	8,52	6,96
<b>41</b>	8,42	6,45

Tabla 3.- Desplazamiento químico para los ligandos **33**, **37** y **41** con respecto a sus precursores

Los derivados bromados (**34**, **38** y **42**) se obtienen mediante el tratamiento de los alcoholes **33**, **37** y **41** con tribromuro de fósforo en acetonitrilo seco. La reacción llevada a cabo, inicialmente en éter etílico como se describe habitualmente, presenta problemas de reproducibilidad debido a las bajas solubilidades de los alcoholes. Por esta razón se elige el acetonitrilo como disolvente que además permite realizar la reacción a mayor temperatura facilitando la disolución del derivado hidroxilado, dando lugar a los productos con rendimientos que oscilan entre el 80 y el 90 %.

El Esquema 23 muestra el procedimiento general para la síntesis de estos productos.



Esquema 23

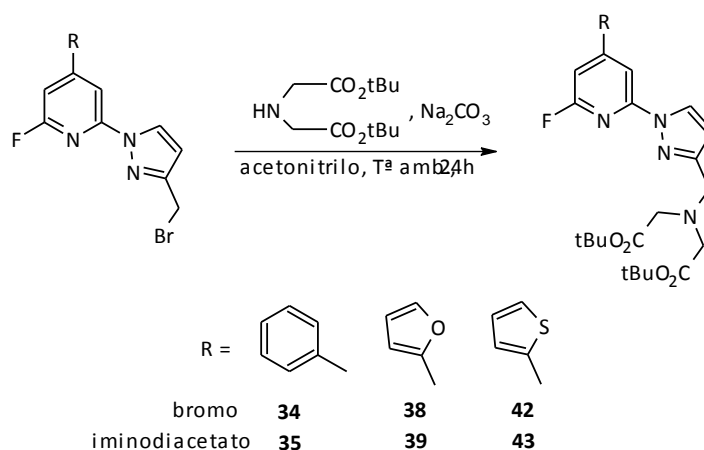
En la Tabla 4 se recogen los desplazamientos químicos de  $^1\text{H-RMN}$  más significativos, en la que se observa que el átomo de bromo influye en el desplazamiento químico del protón H-4 del pirazol y en los protones del grupo metileno, produciéndose en esos protones desapantallamiento y apantallamiento respectivamente.

LIGANDO	$\delta$ protón 5-Pz (ppm)	$\delta$ protón 4-Pz (ppm)	$\delta$ protones $-CH_2-$ (ppm)
<b>33</b>	8,45	6,46	4,79
<b>34</b>	8,45	6,54	4,55
<b>37</b>	8,40	6,44	4,77
<b>38</b>	8,41	6,57	4,55
<b>41</b>	8,42	6,45	4,79
<b>42</b>	8,42	6,53	4,56

Tabla 4.- Desplazamiento químico para los ligandos **34**, **38** y **42** con respecto a sus precursores

A partir del producto bromado se introducen los restos de iminodiacético en forma de éster de *tert*-butilo. Estos ésteres permiten la obtención de los ácidos carboxílicos en condiciones de ruptura ácida sin los inconvenientes que las reacciones de hidrólisis clásicas plantean para el aislamiento de los productos en medios acuosos a distintos pH, en los es habitual que precipiten junto con el diácido sales monocarboxílicas y dicarboxílicas, por lo que la ruptura en medio ácido facilita la obtención de los ácidos libres.

La preparación de los derivados que contienen el grupo iminodiacético (**35**, **39** y **43**) se realiza en acetonitrilo como disolvente y en presencia de carbonato sódico como se muestra en el Esquema 24. Esta reacción requiere condiciones suaves y mayor tiempo de reacción debido a la labilidad de los grupos *tert*-butilo, obteniéndose los compuestos con rendimientos que oscilan entre el 55 y el 85 %.



Esquema 24

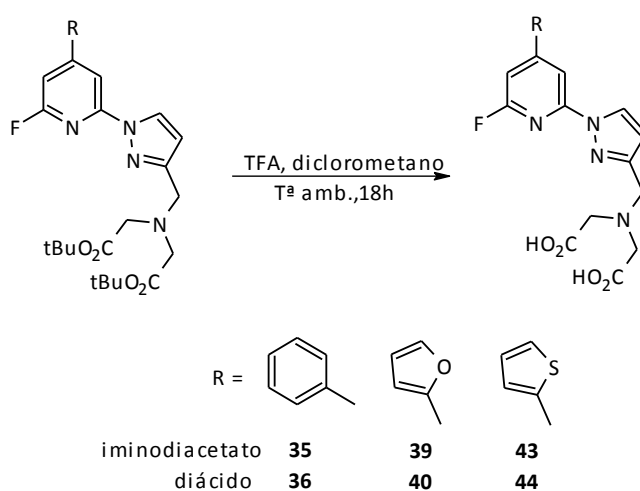
Los desplazamientos químicos de  $^1\text{H-RMN}$  más característicos se muestran en la Tabla 5. La introducción del grupo iminodiacético muestra un importante apantallamiento en los protones del grupo  $-\text{CH}_2-$  unido al anillo pirazólico. El resto de protones comunes a los tres compuestos apenas sufren el efecto de introducir el grupo iminodiacetato de *tert*-butilo.

LIGANDO	$\delta$ protón 5-Pz (ppm)	$\delta$ protón 4-Pz (ppm)	$\delta$ protón $-\text{CH}_2-$ (ppm)	$\delta$ protón $-\text{N-CH}_2-$ (ppm)
<b>34</b>	8,45	6,54	4,55	-----
<b>35</b>	8,42	6,54	4,03	3,49
<b>38</b>	8,41	6,57	4,55	-----
<b>39</b>	8,36	6,50	4,01	3,47
<b>42</b>	8,42	6,53	4,56	-----
<b>43</b>	8,38	6,52	4,03	3,49

Tabla 5.- Desplazamiento químico para los ligandos **34**, **38** y **42** con respecto a sus precursores

La ruptura de los ésteres *tert*-butílicos se realiza con ácido trifluoroacético en diclorometano como disolvente, dando lugar a los diácidos (**36**, **40** y **44**).

El procedimiento general para la obtención de estos productos se recoge en el Esquema 25.



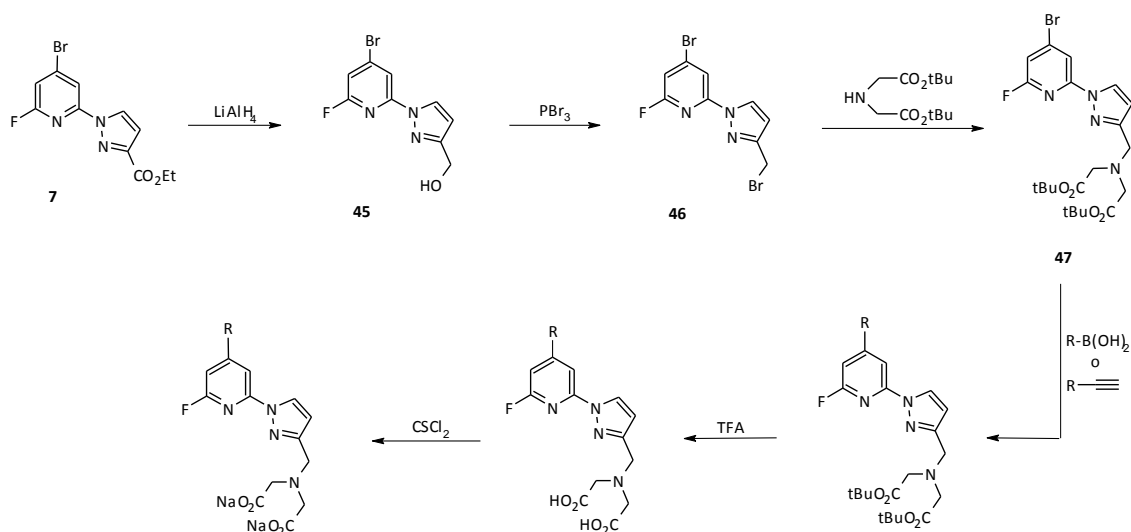
Esquema 25

Los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  muestran la desaparición de los protones *tert*-butílicos (1,45 ppm) y un ligero desapantallamiento del resto de los protones debido principalmente al cambio de disolvente (cloroformo por metanol), necesario para la disolución de estos compuestos.

Los compuestos **36**, **40** y **44** son interesantes sensibilizadores de la luminiscencia de los lantánidos. Sin embargo, ninguno de ellos posee un grupo susceptible de anclaje sobre el oligonucleótido, por lo que en caso de resultar interesantes en sus propiedades fotofísicas sería necesario abordar la síntesis de compuestos análogos pero dotados de grupos reactivos para la reacción de conjugación al oligonucleótido.

Dos grupos interesantes desde el punto de vista de la posibilidad de marcaje de oligonucleótidos son, como ya se ha mostrado anteriormente, los compuestos derivados de las reacciones de Suzuki y Sonogashira con los ácidos 3-aminofenil borónico y 4-aminofenilacetileno respectivamente.

Para la obtención de estos productos, se plantea un orden diferente en las etapas de síntesis debido a la presencia del grupo  $-\text{NH}_2$  en el anillo bencénico y que puede interferir en alguna de las etapas. En el Esquema 26 se muestra la secuencia general llevada a cabo.

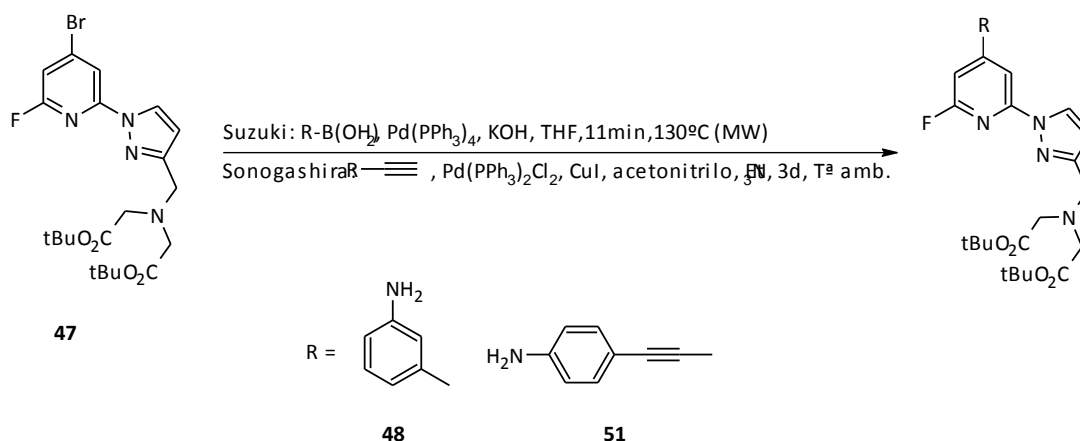


Esquema 26

Por tanto, se debe partir del producto **7** preparado según se recogía en el Esquema 10, y tras las reacciones de reducción (**45**), bromación (**46**) e introducción del derivado iminodiácetico (**47**) tal y como ya se ha descrito, se procede a la sustitución del átomo de bromo mediante las reacciones de acoplamiento cruzado.

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de los tres compuestos (**45**, **46** y **47**) muestran un comportamiento similar al obtenido con los ligandos que ya presentaban un grupo R (fenilo, furano y tiofeno) sobre la posición 4 de la piridina, y confirma tanto la estructura de estos intermedios como la poca influencia ejercida por el sustituyente en 4 del resto de la molécula.

La reacción de Suzuki-Miyaura para la sustitución por el 3-aminofenilo (**48**) y la reacción de Sonogashira para el caso del 4-aminofeniletinilo (**51**) se realizan mediante los procedimientos descritos anteriormente y que se muestran en el Esquema 27.



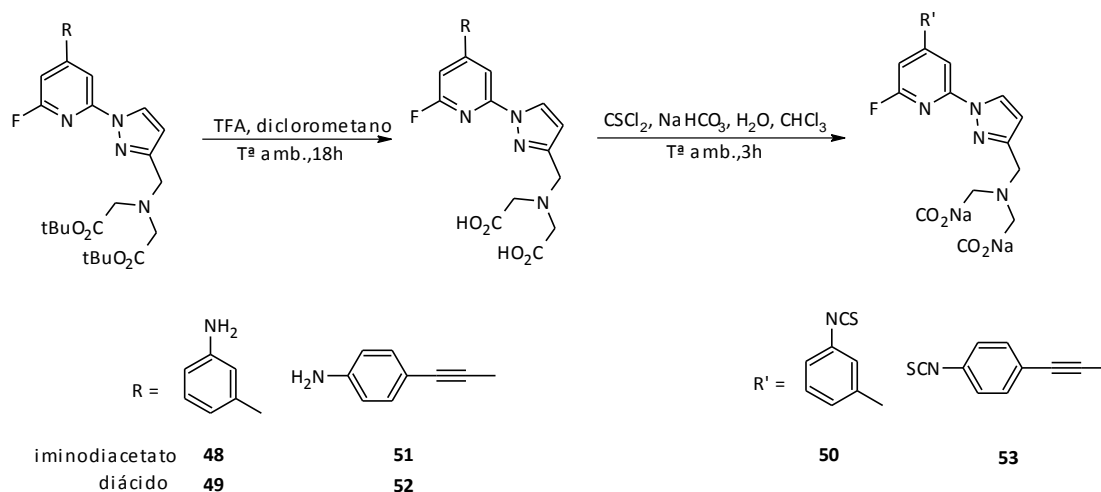
Esquema 27

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN muestran nuevamente que el sustituyente 4-aminofeniletinilo provoca un desapantallamiento de los protones H-4 y H-5 del anillo pirazólico y un apantallamiento en el protón H-5 de la piridina, mientras que el grupo 3-aminofenilo no produce desplazamientos significativos sobre estos protones aromáticos, como se observa en la Tabla 6.

LIGANDO	$\delta$ protón 5-Pz (ppm)	$\delta$ protón 4-Pz (ppm)	$\delta$ protón 3-Py (ppm)	$\delta$ protón 5-Py (ppm)
<b>47</b>	8,34	6,52	8,00	6,92
<b>48</b>	8,37	6,49	7,96	6,85
<b>51</b>	8,65	6,79	7,96	6,73

Tabla 6.-Desplazamiento químico de los ligandos **48** y **51** con respecto a su producto inicial **47**

La reacción de hidrólisis de los ésteres *tert*-butílicos con ácido trifluoroacético (**49** y **52**) y su posterior tratamiento tiosgenico, en idénticas condiciones a las ya descritas, conduce a los productos con sendos grupos isotiocianato en sus estructuras (**49** y **52**) y que se muestran en el Esquema 28.



Esquema 28

La confirmación de la presencia los productos resultantes de la hidrólisis se realiza, principalmente, mediante la observación de la desaparición de las señales del grupo *tert*-butilo.

Para llevar a cabo la caracterización de los isotiocianatos se realizan sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en metanol, que por comparación con el de sus precursores muestran un desplazamiento de las señales aromáticas debido al cambio del grupo  $-\text{NH}_2$  por  $-\text{NCS}$ . Sus espectros de masas confirman las estructuras con la presencia de los picos  $\text{M}^+$  a 486 u.m.a. (**50**) y 424 u.m.a. (**53**); y sus espectros de infrarrojos muestran las bandas características del grupo  $-\text{NCS}$  a 2110 y 2108  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente.

#### - Síntesis de ligandos con restos iminodiacético modificado

Otra aproximación a la disponibilidad de grupos de anclaje sobre los derivados de monopirazolilpiridina **33**, **37** y **41** descritos, es la introducción de un grupo reactivo en una parte común de la estructura monopirazólica. La Figura 18 muestra los ligandos objetivo de esta síntesis, en la que el punto de anclaje es nuevamente un grupo isotiocianato aunque ahora se encuentra unido a través de una modificación del ácido iminodiacético.

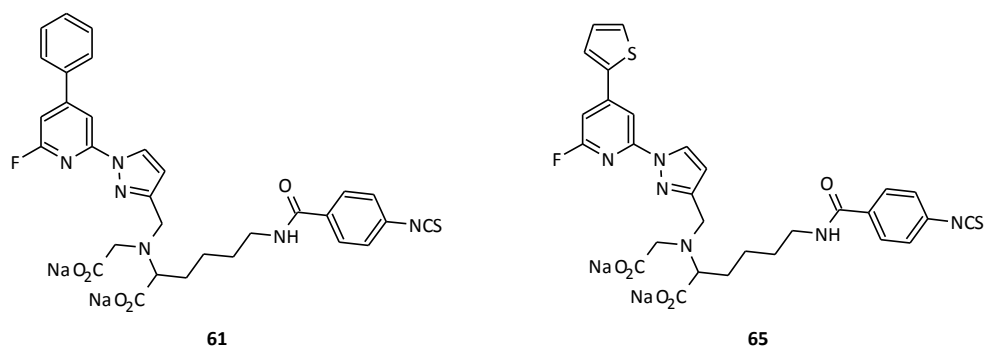


Figura 18.- Estructuras preparadas con el iminodiacetato modificado

Esta estrategia ya había sido ensayada en nuestro grupo de trabajo en la preparación de una sonda de marcaje para inmunoensayo de estructuras de bispirazolpiridina (**L41**, página 54), y consiste en la introducción sobre el derivado bromado (**34** y **42**) de un resto de iminodiacético modificado para formar la parte quelante de la estructura. En concreto, se utiliza el iminodiacetato modificado para conseguir una estructura que lleve incorporado el punto de anclaje sin afectar al cromóforo responsable de la luminiscencia ni a sus características de complejación. La Figura 19 muestra su estructura.

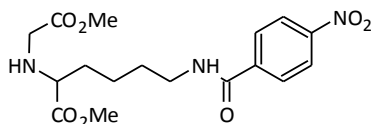
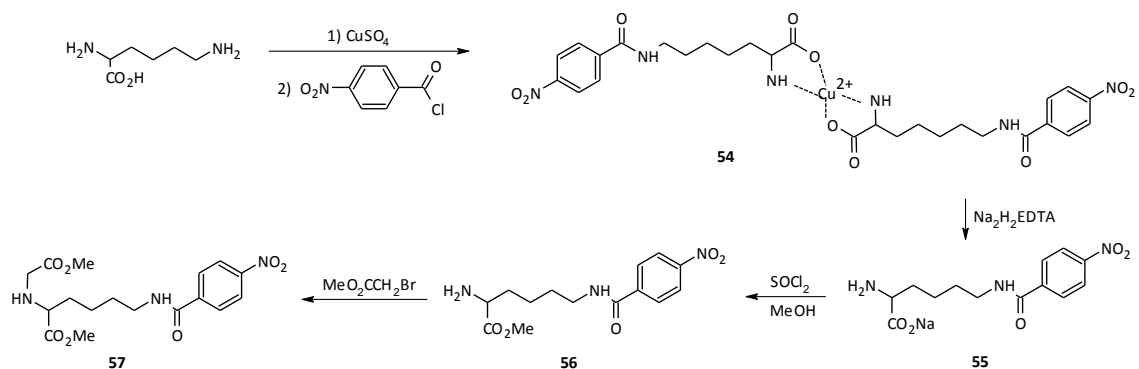


Figura 19.- Resto iminodiacetato modificado

Esta estructura presenta la ventaja de que su síntesis parte de un aminoácido natural L-lisina, a partir del cual es posible la introducción del grupo precursor del isotiocianato. Su síntesis se representa en el Esquema 29.

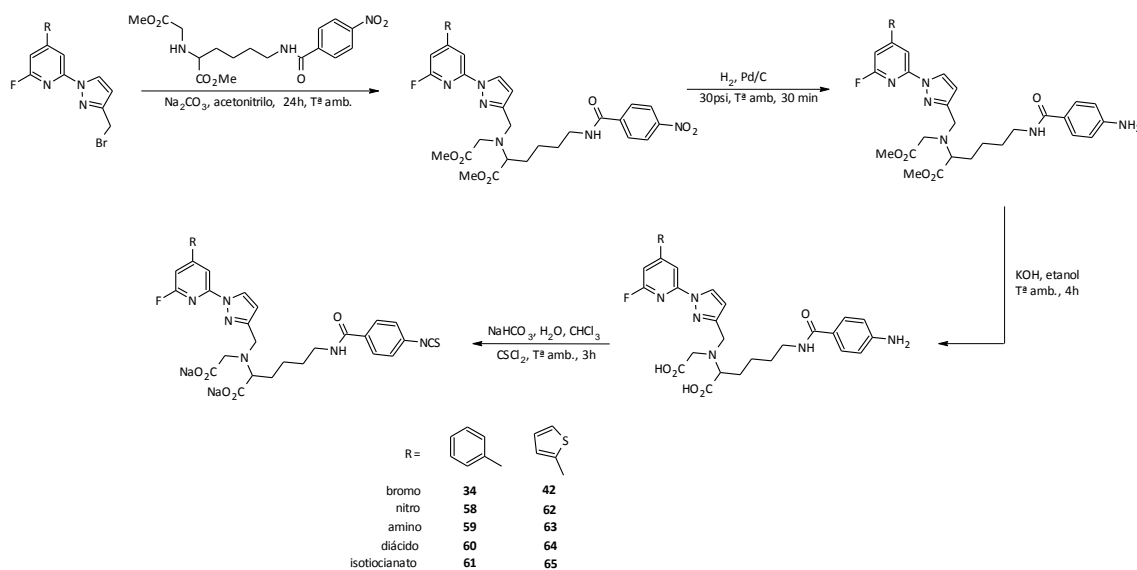




Esquema 29

La protección selectiva del grupo  $\alpha$ -amino de la lisina como un biquelato de Cu(II) permite la introducción del resto 4-nitrobenzoilo a través de la formación de una amida por reacción con su cloruro de ácido a través del grupo amino libre de la L-lisina. La formación del complejo de Cu(II) **54** transcurre con un 96 % de rendimiento. La eliminación del Cu(II) en **54** se realiza mediante su secuestro con la sal sódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA), dando lugar al aminoácido **55** con un rendimiento del 63 %. La reacción de esterificación con  $\text{SOCl}_2$  en metanol (**56**) y la alquilación del grupo amino libre con bromoacetato de metilo conduce al iminodiacetato modificado **57**.<sup>118</sup>

A partir de este iminodiacetato modificado, se prosigue la síntesis como en el caso de las introducciones de los ésteres *tert*-butílicos del ácido iminodiacético vistos hasta ahora, según se recoge en el Esquema 30.



Esquema 30

Se parte del derivado bromado (**34**, **42**) que mediante una sustitución con el iminodiacetato modificado, da lugar a los productos **58** y **62**.

La estructura de los derivados **58** y **62** se determinan de forma inequívoca por espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN, ya que aparecen las dos señales pirazólicas y la de los protones del grupo  $-\text{CH}_2-$  que están unidos a estos anillos, más apantalladas que en el los productos de partida (**34** y **42**), tal y como se muestra en la Tabla 7. Además los desplazamientos del nuevo grupo iminodiacetato confirman su incorporación a las estructuras **58** y **62**.

LIGANDO	$\delta$ protón 5-Pz (ppm)	$\delta$ protón 4-Pz (ppm)	$\delta$ protones $-\text{CH}_2-$ (ppm)
<b>34</b>	8,45	6,54	4,55
<b>58</b>	8,24	6,39	3,90
<b>42</b>	8,42	6,53	4,56
<b>62</b>	8,27	6,42	3,95

Tabla 7.- Desplazamiento químico de los protones del ligando **57** con respecto a su precursor **33**

La reducción del grupo  $-\text{NO}_2$  sobre los derivados **58** y **62** se lleva a cabo por hidrogenación catalizada con Pd/C. La hidrólisis posterior de los ésteres del producto **59** y **63** con KOH en etanol acuoso y su posterior tratamiento con ácido clorhídrico da lugar al ácido dicarboxílico (**60** y **64**). La adición de tiosfogeno sobre una mezcla de agua y cloroformo que contiene dicho carboxilato, conduce a la formación del producto deseado (**61** y **65**) con presencia del grupo isotiocianato que proporciona el punto de anclaje necesario al oligonucleótido.

La confirmación de la presencia los productos resultantes de la hidrólisis (**60** y **64**) se realiza, entre otras, mediante la observación de la ausencia de las señales del grupo  $-\text{OCH}_3$  de sus ésteres correspondientes.

Para llevar a cabo la caracterización los isotiocianatos se realizan sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en metanol, que por comparación con el de sus precursores muestran un desplazamiento de las señales aromáticas debido al cambio del grupo  $-\text{NH}_2$  por  $-\text{NCS}$ . Sus espectros de masas confirman las estructuras con los picos moleculares  $\text{M}^+$  a 661 u.m.a. (**61**) y 667 u.m.a. (**65**).

### 3.3. Síntesis de los ligandos sustituidos por 3-carboxiheterociclos y 5-aminoindazol

Todos los ligandos cuya síntesis se ha descrito hasta el momento constan de un anillo heterocíclico (pirazol o indazol) en la posición 2 de la piridina y un átomo de flúor en la posición 6 de dicho anillo, además de distintos sustituyentes sobre la posición 4 introducidos mediante reacciones de acoplamiento cruzado.

El motivo de sintetizar este tipo de ligandos era comprobar las propiedades fotofísicas de sus complejos con iones lantánidos sobre estructuras que aportan a la coordinación dos anillos heterocíclicos (piridina y pirazol o piridina e indazol) uno o dos ácidos carboxílicos y un átomo de flúor del que se espera pueda presentar un entorno hidrófobo en la complejación de estos iones. De este modo se trataría de que estos ligandos antena aportasen 3-4 centros de coordinación que complementen los aportados por el quelato portador del lantánido (ICC).

Tal y como se ha presentado, no todos los compuestos sintetizados tienen un grupo susceptible de servir de punto de anclaje con la conjugación con el oligonucleótido y la aproximación más general en este sentido implica la utilización de estructuras con dos ácidos carboxílicos (4 centros de coordinación potencial) derivadas del iminodiacético modificado.

Como se ha mostrado, el átomo de flúor es un elemento de fácil sustitución y la posición que ocupa es muy reactiva y versátil frente a la sustitución nucleófila, pudiendo ser empleada para la introducción de otros grupos o anillos heterocíclicos con el fin de intentar dotar al lantánido de un entorno de coordinación distinto al ensayado hasta ahora, y comprobar su efectividad en la luminiscencia de los lantánidos. Mediante la introducción de un anillo heterocíclico adicional se crearían ligandos que aportarían tres átomos de nitrógeno a la esfera de coordinación del metal, que unido a un ácido carboxílico podría permitir alojar y aislar con mayor efectividad al ion lantánido mejorando, previsiblemente, sus propiedades luminiscentes.

En este sentido se plantea una nueva familia de ligandos que se encuentran doblemente sustituidos por anillos heterocíclicos y en los que se estudiará la variación de sus propiedades fotofísicas a través, nuevamente, de la introducción de diferentes sustituyentes sobre la posición 4 de la piridina.

De modo general las estructuras cuya síntesis se aborda en este punto corresponden a la estructura general mostrada en la Figura 20.

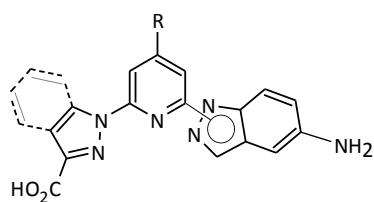


Figura 20.- Estructura general de los ligandos sintetizados

Esta serie de ligandos se caracteriza por presentar una estructura general que consta de un anillo pirazólico o indazólico con un sustituyente carboxilo en la misma posición relativa y un anillo indazólico dotado, en todos los casos, de un grupo amino en posiciones variables y que, en último término, sirve para su transformación en un grupo reactivo isotiocianato para el anclaje sobre la estructura del oligonucleótido. La posición 4, como en ocasiones anteriores, se funcionaliza según las amplias posibilidades que ofrecen las reacciones de acoplamiento cruzado.

Existen al menos dos isómeros de aminoindazol disponibles comercialmente, el 5- y el 6-aminoindazol. En este trabajo se describe el trabajo realizado con ambos isómeros y los resultados obtenidos en la síntesis de las estructuras recogidas en la Figura 21.

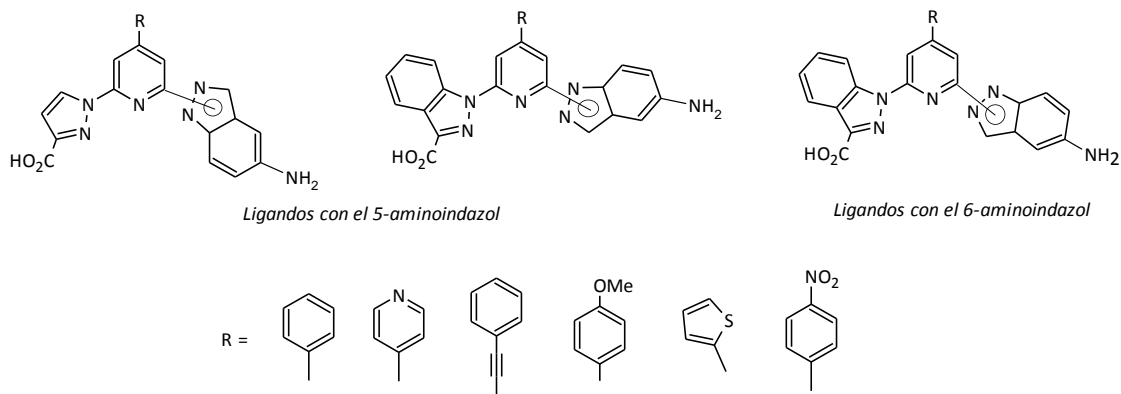


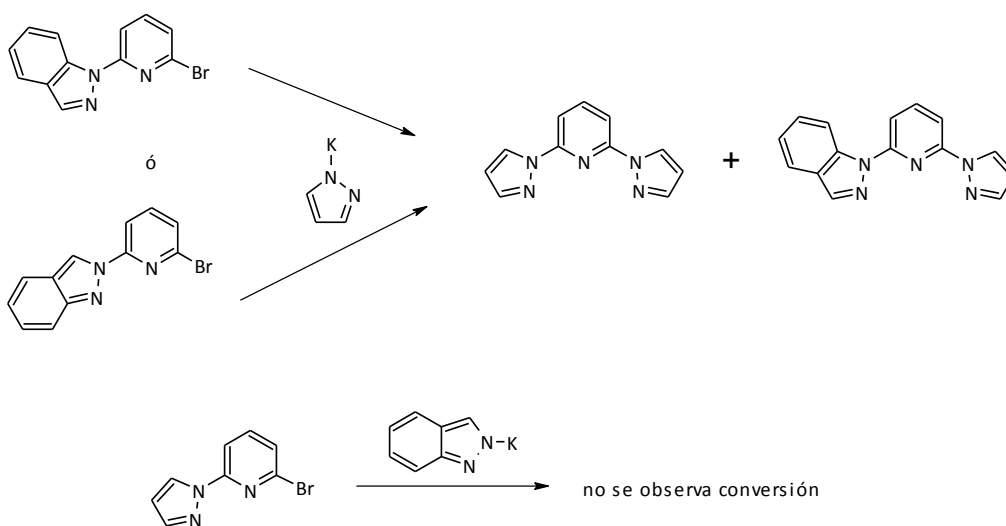
Figura 21.- Ligandos sintetizados con el 5- y 6-aminoindazol

Una de las incógnitas que este planteamiento sintético ofrece es la viabilidad de introducir dos anillos de naturaleza diferente sobre las posiciones 2 y 6 del anillo de piridina. Si ya el número de derivados monoheterocíclicos de la piridina, como los que se acaban de describir es extraordinariamente escaso,<sup>131</sup> el número de aproximaciones a la introducción de sistemas poliheterocíclicos no simétricos (heterociclos diferentes

<sup>131</sup> a) S.A.A. Zaidi, M. Shahjahan, K.S. Siddiqui, *Transition Met. Chem.*, **1993**, *18*, 51. b) D.M.T. Chan, K.L. Monaco, R. Li, D. Bonne, C.G. Clark, P.Y.S. Lam, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 3863.

sobre las posiciones 2 y 6 de la piridina) lo es más aún y los resultados descritos para su obtención, si bien no basados en la misma estrategia, muestran resultados inesperados.<sup>132</sup>

La síntesis descrita para la preparación de las piridinas no simétricas 2-(indazolil)-6-(pirazolil)piridina se describe en el Esquema 31.



Esquema 31

La reacción de la 2,6-dibromopiridina con un equivalente del indazolato sódico en condiciones energéticas de reacción propias de la sustitución de los átomos de Bromo, da una mezcla de los isómeros 2-(1-indazolil)-6-bromopiridina y 2-(2-indazolil)-6-bromopiridina. Sin embargo, y de modo inesperado, el tratamiento de cualquiera de ambos regioisómeros con un exceso de pirazolato sódico conduce a la misma mezcla de la que se pudieron aislar dos productos, la 2-(1-pirazolil)-6-(1-indazolil)piridina y el producto simétrico 2,6-bispirazolilpiridina.

Cuando la reacción se lleva a cabo en el orden contrario la 2-(1-pirazolil)-6-bromopiridina no reacciona con el indazolato sódico. Estos resultados muestran, en opinión de Halcrow y cols.,<sup>131</sup> en primer lugar que, la sustitución del segundo átomo de bromo sobre la 2-(azolil)-6-bromopiridina está desactivada frente a la de la propia 2,6-dibromopiridina de partida, que, en segundo lugar, el indazolato es peor nucleófilo que el pirazolato y, en tercero, que el grupo indazolil es un grupo saliente comparable con el bromo en las condiciones de reacción empleadas y que como se ha comentado son bastante energéticas, diglome a 130<sup>0</sup>C durante varios días.

<sup>132</sup> R. Pritchard, C.A. Kilner, M.A. Halcrow, *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 2484.

Muy recientemente Halcrow y cols. han descrito en el derivado bromado la doble sustitución indazólica, obteniendo los derivados asimétricos 2-(indazol-1-il)-6-(pirazol-1-il)piridina y 2-(indazol-2-il)-6-(pirazol-1-il)piridina, en los cuales no existen sustituyentes de ningún tipo en los heterociclos presentes (Figura 22).<sup>133</sup>

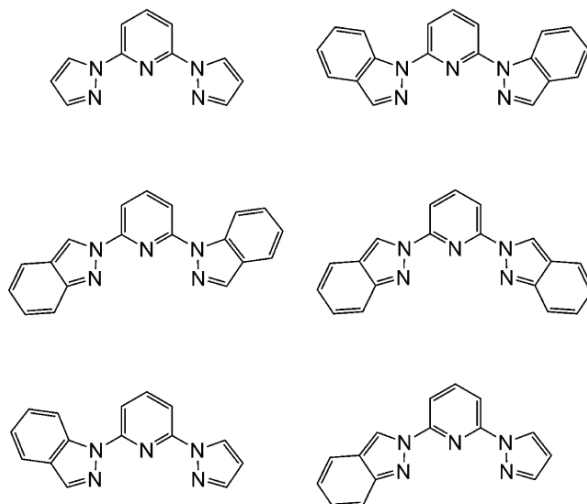


Figura 22.- Ligandos sintetizados por Halcrow y cols.

Aunque en el caso que nos ocupa la situación de partida es distinta, átomos de flúor en lugar de bromo, con condiciones de reacción mucho más suaves y pirazolatos e indazolatos sustituidos con grupos que presentan demandas electrónicas acusadas, se hace necesario comprobar el comportamiento de las piridinas monosustituidas frente a la sustitución del segundo átomo de flúor, y si el orden de introducción de los dos distintos heterociclos influye sobre el comportamiento de las reacciones a ensayar.

De modo similar y teniendo en cuenta que sobre la 2,6-difluor-4-bromopiridina se produce la introducción de tres sustituyentes distintos en tres etapas independientes, dos de sustitución nucleófila de los átomos de flúor y una reacción de acoplamiento cruzado, se abordará la síntesis combinando el orden de estas tres etapas de reacción con el fin de comprobar si todas ellas son viables y si hay variaciones en el rendimiento global de las piridinas trisustituidas.

<sup>133</sup> A. Santoro, L.J. Kershaw Cook, R. Kulmaczewski, S.A. Barrett, O. Cespedes, M.A. Halcrow, *Inorg. Chem.*, **2015**, *54*, 682.

### 3.3.1. Síntesis de ligandos sustituidos por 3-carboxipirazol y 5-aminoindazol

La primera síntesis que se aborda es la de los derivados del 5-aminoindazol. Este derivado indazólico se introducirá sobre la piridina y, en una primera serie de compuestos, el segundo heterociclo sobre la piridina será el 3-etoxicarbonilpirazol. La posición bromada en 4 será nuevamente funcionalizada, tal y como se ha descrito, mediante reacciones de Suzuki o Sonogashira.

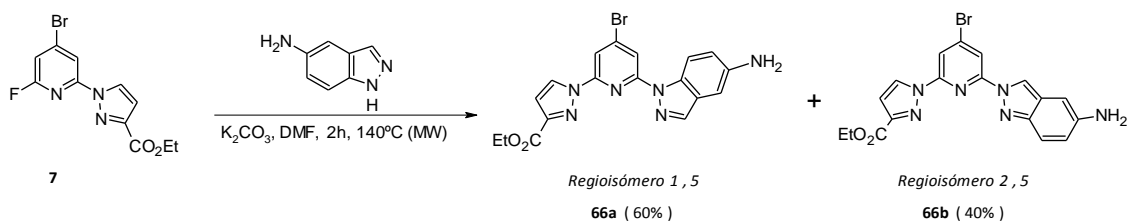
En una primera aproximación se emplea como producto de partida la 4-bromo-2-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-6-fluorpiridina (**7**) preparada anteriormente.

La sustitución del segundo átomo de Flúor se realiza, inicialmente, siguiendo el método descrito por Ziesel y cols.<sup>130</sup> Este autor describe condiciones de reacción más energéticas para la introducción de los anillos de indazol sobre la 4-bromo-2,6-difluorpiridina. Estas condiciones se deben a la menor reactividad del indazolato para la sustitución del átomo de flúor.

En este caso, para la sustitución del segundo átomo de flúor, se pusieron a punto las condiciones de reacción observándose que el hidruro sódico habitualmente empleado para la generación del indazolato no conducía a los productos esperados empleando disolventes como THF o DMF a distintas temperaturas (de 40 a 140<sup>o</sup>C).

De las pruebas llevadas a cabo y a la vista de estos resultados, se puso a punto la reacción empleando una base como el carbonato potásico (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) en DMF que favorece la formación del indazolato y su ataque sobre la posición fluorada, además del uso de microondas.

En el Esquema 32 se muestran las condiciones establecidas para la reacción en las que se obtiene una mezcla de los dos regioisómeros (1,5 y 2,5) originados por la tautomería del indazol, así como el porcentaje de cada uno de ellos en la mezcla.



Esquema 32

Estos resultados contrastan con los de Halcrow y cols. (Esquema 31) en los que la sustitución sobre la 2-bromo-6-(1-pirazolil)piridina de un indazol no era posible. No obstante, en este caso existen diferencias, el sustituyente halogenado de la piridina es ahora Flúor en lugar de Bromo y el pirazol se halla funcionalizado con un grupo éster.

A diferencia de lo que sucede con la introducción del 3-etoxicarbonilpirazol en el que la regioquímica observada es exclusivamente la 1,3, para el caso del 5-aminoindazol se obtiene una mezcla isómera correspondiente a los dos isómeros resultantes de la tautomería del indazol 1,5 y 2,5 (Figura 23), lo que indica que el par electrónico del átomo de nitrógeno del grupo  $\text{-NH}_2$  no favorece un tautómero sobre otro a diferencia del efecto ocasionado por el grupo carbonilo ( $\text{-C=O}$ ) sobre el 3-etoxicarbonilpirazol.



Figura 23.- Regioquímica 1,5 y 2,5 del 5-aminoindazolato

La separación de ambos productos es extremadamente difícil y, a pesar de las muchas combinaciones de eluyentes ensayadas, no se consiguen separar totalmente y solamente uno de ellos se logra aislar puro aunque en pequeña cantidad. Este producto permite la determinación y asignación de ambos isómeros.

En la Figura 24a se muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del producto aislado y que corresponde al isómero **66a**. En este espectro, la señal más desapantallada corresponde al protón H-5 del pirazol mientras que en la mezcla (Figura 24b), el protón más desapantallado aparece a 8,68 ppm y corresponde al protón H-3 del anillo de indazol, que es el único que aparece como singlete en el espectro. Este desapantallamiento sólo puede deberse a su proximidad con el anillo de piridina y por consiguiente se asigna a la estructura **66b**.

En el caso del espectro puro **66a**, el resto de las señales son las esperadas con el doblete del pirazol en posición H-4 a 7,04 ppm, mientras que las señales del indazol aparecen como un doblete a 8,37 ppm, un doble-doblete a aproximadamente 6,98 ppm acopladas entre sí con una constante orto, y un doblete con una constante meta a 6,95 ppm. El protón H-3 del indazol aparece como singlete a 8,01 ppm mientras que los protones H-3 y H-5 de la piridina aparecen acoplados entre sí a 8,08 y 8,13 ppm.

Este patrón de acoplamientos se observa de nuevo para el isómero **66b** en el espectro de la mezcla (Figura 24b).



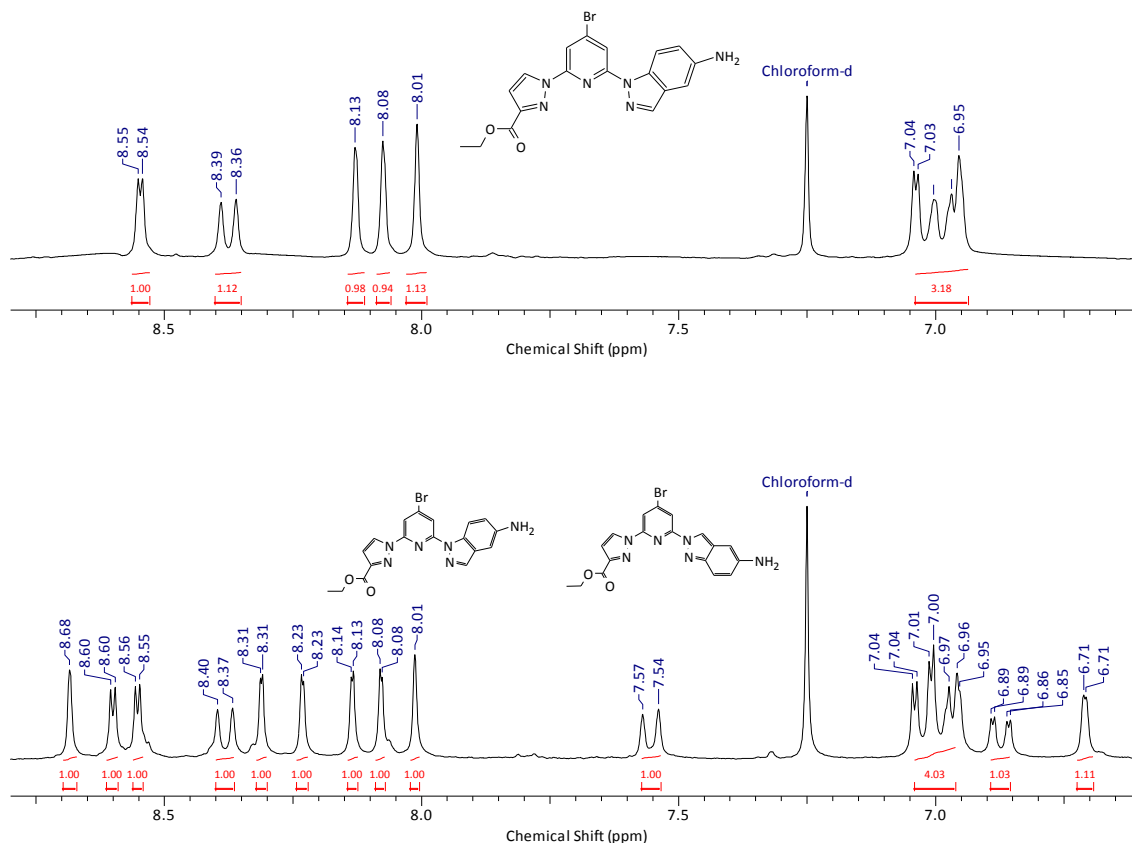


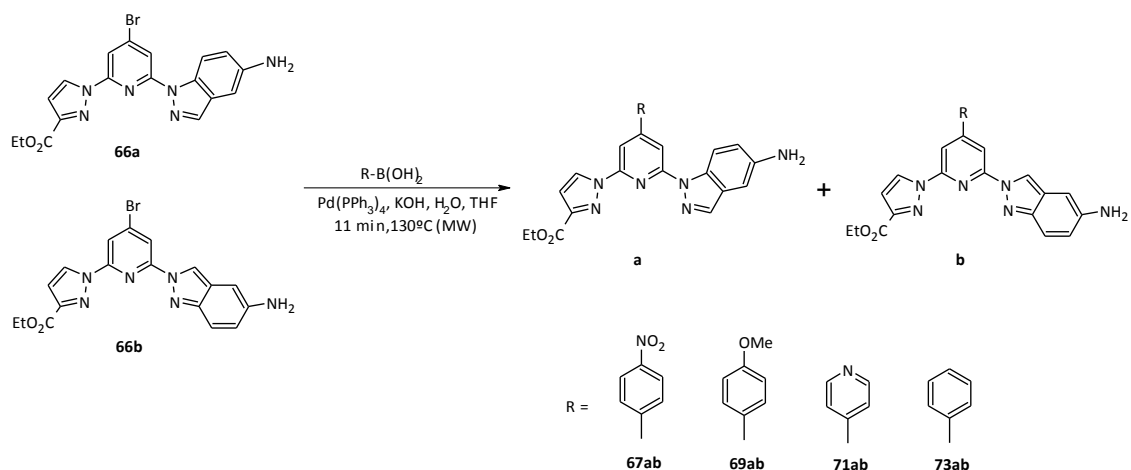
Figura 24.- (a) Espectro del isómero **66a** y (b) espectro de la mezcla isómera

Ante la imposibilidad de separar ambos isómeros, se lleva a cabo la reacción de Suzuki con la mezcla con el fin de comprobar si la separación es posible con el resultado de esta reacción.

### Reacción de Suzuki-Miyaura

Como sustituyentes para llevar a cabo esta reacción se emplean los ácidos borónicos correspondientes a los restos aromáticos 4-nitrofenilo (**67**), 4-metoxifenilo (**69**), piridilo (**71**) y fenilo (**73**).

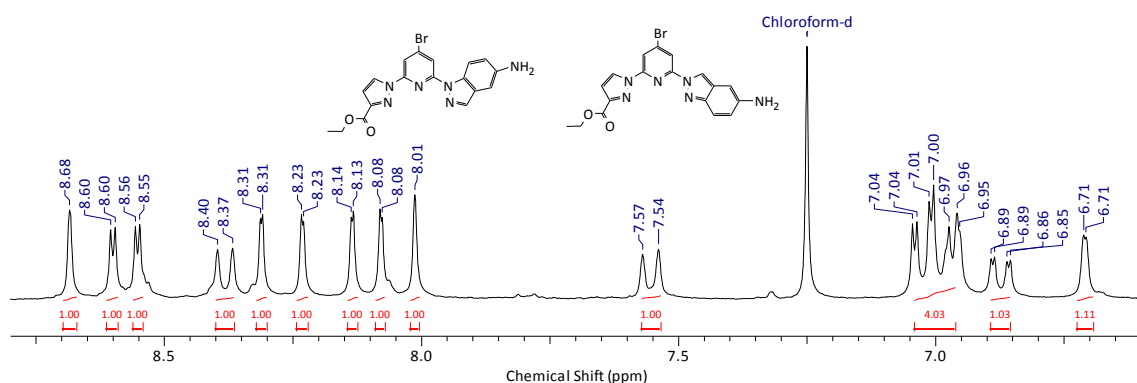
El procedimiento general para la síntesis de estos nuevos ligandos se recoge en el Esquema 33, obteniéndose en todos los casos la mezcla de los isómeros sustituidos en la posición 4.



Esquema 33

Estas reacciones, sin embargo, presentan rendimientos bajos ( $\approx 40\%$ ) comparados con los obtenidos cuando la reacción se realiza sobre solo uno de los isómeros.

En el caso de la mezcla isómera del ligando **67**, su espectro de  $^1\text{H-RMN}$  (Figura 25b) muestra, cuando se compara con el de la mezcla de partida (Figura 25a), la aparición de dos nuevos grupos de señales a 8,37 y 7,98 ppm correspondientes a los cuatro protones aromáticos del grupo *para*-nitrofenilo, además de observarse un ligero desapantallamiento de las señales correspondientes a los protones pirazólicos H-5 sobre ambas estructuras, así como el H-3 del indazol sobre el isómero **67b**.



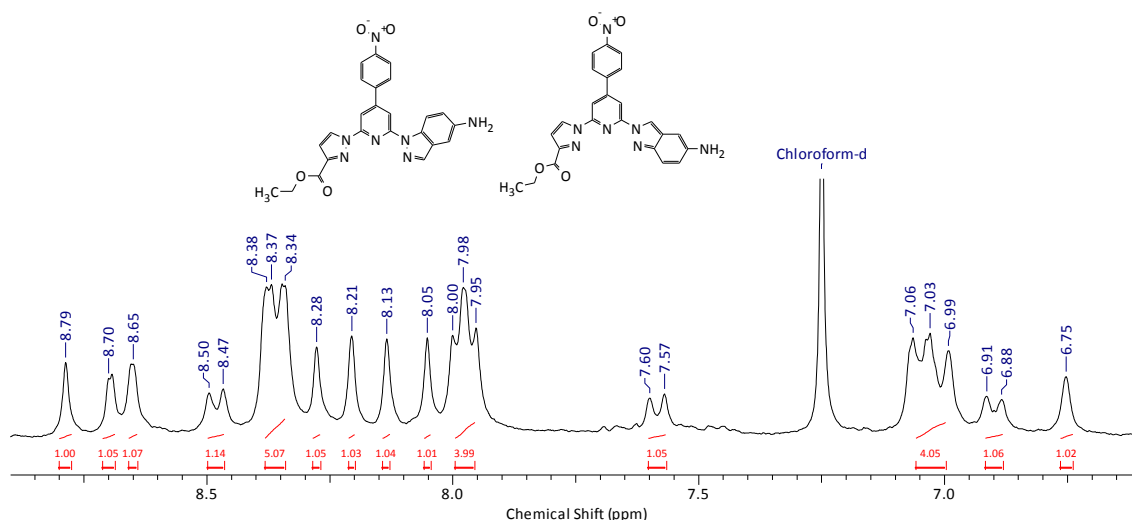


Figura 25.- (a) Espectro de la mezcla isómera de partida (**66ab**) y (b) espectro de la mezcla isómera de la reacción de Suzuki (**67ab**)

Su espectro de masas confirma la estructura con un pico molecular  $M^+$  a 469 u.m.a. correspondiente a la masa monoisotópica de ambos isómeros.

La mezcla isómera **69** muestra nuevamente como señales más significativas las de los cuatro protones aromáticos. Estas señales aparecen como dobletes situados a 7,82 y 7,03 ppm, esta vez más apantallados como consecuencia del grupo  $-OCH_3$ . Nuevamente, la presencia del núcleo aromático origina un desapantallamiento, aunque esta vez menos acusado, de las señales discutidas anteriormente correspondientes a **69ab**. Su espectro de masas confirma la estructura con el pico  $M^+$  a 454 u.m.a. correspondiente a la mezcla.

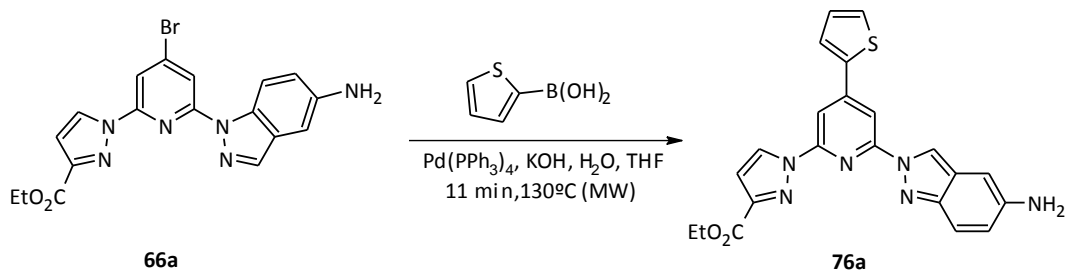
Para la mezcla **71** su espectro de <sup>1</sup>H-RMN muestra la aparición de las señales aromáticas correspondientes a los cuatro protones de la piridina introducida. Las dos señales para estos protones aparecen ahora a 8,74 y 7,66 ppm. El espectro de masas confirma de nuevo la estructura con el pico molecular  $M^+$  a 425 u.m.a.

Finalmente, la mezcla **73** muestra como señales características aquellas que pertenecen a los cinco protones del anillo aromático del fenilo y que aparecen como dos multipletes a 7,83 y 7,49 ppm (para dos y tres protones respectivamente). Su espectro de masas confirma la estructura con el pico molecular  $M^+$  a 424 u.m.a.

Con estas mezclas de isómeros obtenidas en la reacción de Suzuki tampoco fue posible obtener condiciones de separación para estos compuestos.

Como se ha comentado al principio de esta serie de ligandos, se consigue aislar una pequeña cantidad de isómero puro (**66a**) que se usa en la síntesis de los dos siguientes

productos. El primero de ellos corresponde al producto resultante de la reacción de Suzuki con el ácido 2-tienilborónico y que se muestra en el Esquema 34.



Esquema 34

La Figura 26 muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del producto de partida (**66a**) y del producto resultante de la reacción de acoplamiento (**76a**). En él aparecen las tres nuevas señales correspondientes a los tres protones del grupo tienilo a 7,74, 7,47 y 7,17 ppm, mientras que el resto de señales sufren un ligero desapantallamiento. Su espectro de masas confirma la estructura con la aparición del pico molecular  $\text{M}^+$  a 430 u.m.a. correspondiente a la masa monoisotópica del ligando.

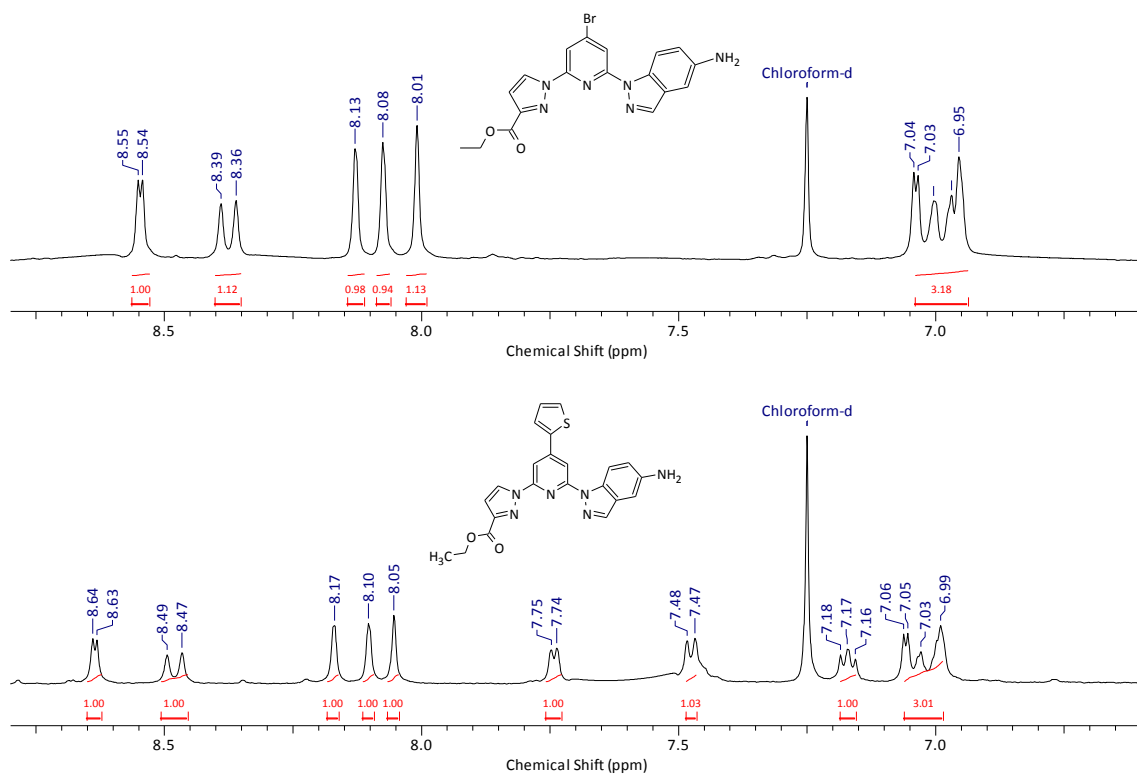
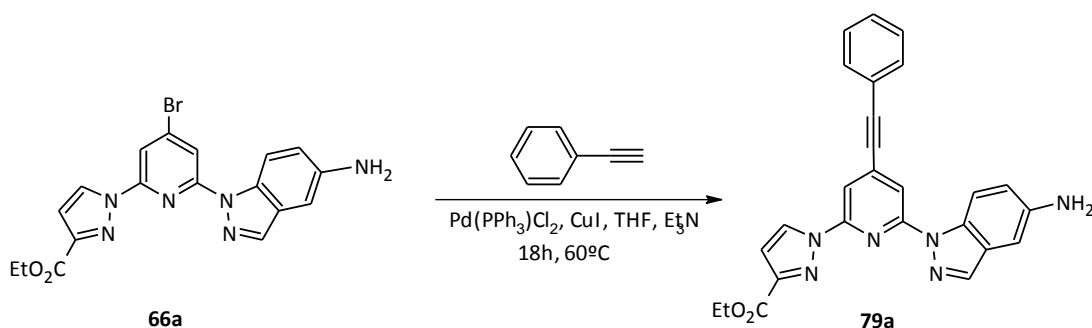


Figura 26.- (a) Espectro del producto de partida (**66a**) y (b) espectro del producto **76a**

### Reacción de Sonogashira

Para la síntesis de este ligando se emplea nuevamente el isómero **66a** que se pudo aislar como producto puro. El procedimiento general para la obtención de este ligando se recoge en el Esquema 35.

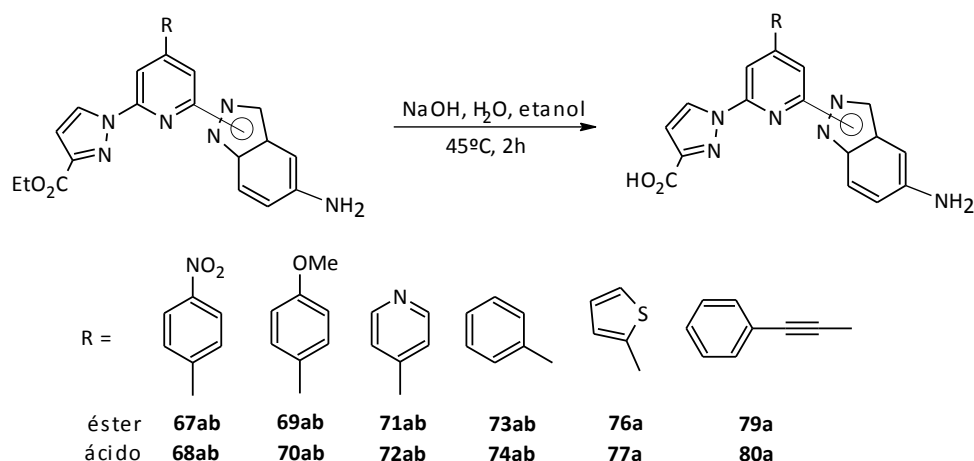


Esquema 35

Su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra claramente la aparición de las señales correspondientes al anillo aromático. Tres grupos de señales aromáticas aparecen a 7,99, 7,55 y 7,39 ppm, correspondientes a los protones del feniletinilo. Su espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN pone de manifiesto la presencia de los carbonos cuaternarios que están formando el triple enlace (91.9 y 91.2 ppm), y mediante su espectro de masas se confirma la existencia del producto al aparecer un pico  $\text{M}^+$  a 448 u.m.a.

### Reacción de hidrólisis

La etapa de hidrólisis de estos productos en las condiciones habituales (NaOH, agua y etanol a  $45^\circ\text{C}$ ) permite obtener los ligandos en forma de ácido carboxílico con rendimientos casi cuantitativos como se muestra en el Esquema 36.



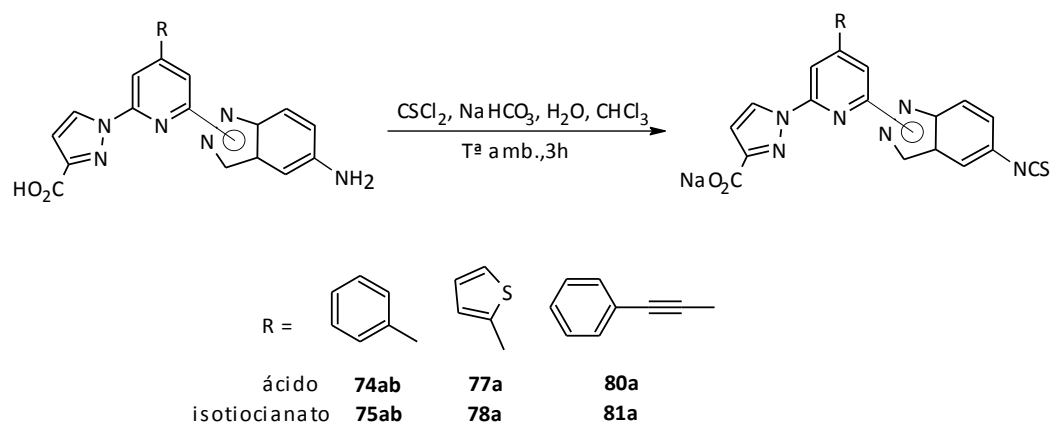
Esquema 36

La confirmación de las estructuras se lleva a cabo principalmente mediante sus espectros de masas y la desaparición de las señales de los protones del éster etílico en sus correspondientes espectros de  $^1\text{H-RMN}$ .

### Síntesis de los isotiocyanatos

Para los ligandos aminoácidos sólo se ha realizado la transformación del grupo amino en isotiocianato en el caso de los ligandos **74ab**, **77a** y **80a** debido a que presentan el mismo sustituyente (fenilo, tienilo y feniletinilo) en todas las familias sintetizadas hasta ahora (monopirazoles, monoindazoles y monoiminodiacetatos) con el fin de poder realizar una comparación del comportamiento en las reacciones de conjugación a un oligonucleótido si estos compuestos ofrecen buenos resultados en el estudio fotofísico.

El procedimiento general para llevar a cabo la síntesis de estos ligandos es el mismo descrito anteriormente (Esquema 37), y los rendimientos obtenidos son excelentes.



Esquema 37

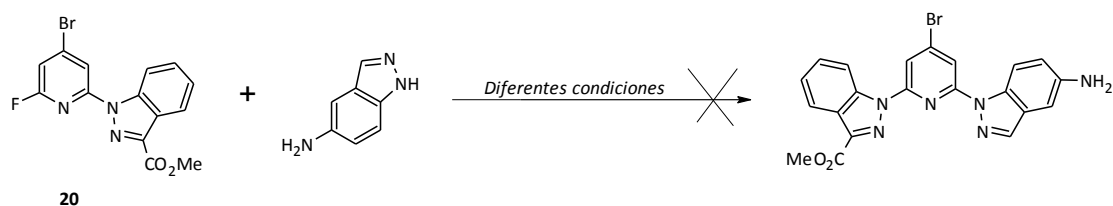
Estos ligandos (**75ab**, **78a** y **81a**) no son suficientemente solubles en metanol y sus espectros se registran en dimetilsulfóxido (DMSO). En todos los casos, los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN muestran como característica más reseñable el desplazamiento de las señales aromáticas debido al cambio del grupo  $-\text{NH}_2$  por  $-\text{NCS}$ . Sus espectros de masas confirman las estructuras con señales correspondientes al pico molecular  $\text{M}^+$  a 461, 467 y 485 u.m.a. respectivamente; y la aparición de una banda situada a 2102, 2100 y 2094  $\text{cm}^{-1}$  en sus respectivos espectros de infrarrojo, confirman la existencia del grupo  $-\text{NCS}$  en estos productos.

### 3.3.2. Síntesis de ligandos sustituidos por 3-carboxiindazol y 5-aminoindazol

Una vez sintetizados los sistemas poliheterocíclicos no simétricos en los que se ha introducido un anillo pirazólico y uno indazólico, se aborda la síntesis de sistemas en los que el anillo de pirazol es ahora un indazol.

La estrategia de síntesis para estos compuestos es análoga a la discutida anteriormente con la introducción consecutiva de los anillos de indazol éster, aminoindazol y reacciones de Suzuki o Sonogashira para la obtención de esta nueva familia de compuestos no simétricos.

Habida cuenta de que, análogamente a la sección anterior, se disponía de la 4-bromo-2-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)-6-fluorpiridina (**20**), se realiza una aproximación similar a la llevada a cabo para el monopirazol éster **7** (Esquema 38).



Esquema 38

En este caso no se lograron condiciones para la obtención del derivado disustituído. El empleo de distintos disolventes, bases y temperaturas, no condujo a cantidades significativas del compuesto buscado, lo cual nuevamente contrasta con los resultados de Halcrow y cols. (Esquema 31), el indazol no parece impedir la entrada del sustituyente como ocurría en el ejemplo del esquema y si lo hacía cuando el sustituyente es el anillo de 3-etoxicarbonilpirazol (Esquema 32), siendo estos resultados completamente opuestos a los descritos por este autor, aunque tal y como se ha comentado anteriormente hay diferencias entre este antecedente y lo desarrollado aquí (flúor en lugar de bromo y sustituyentes éster y amino en el pirazol e indazol respectivamente frente a heterociclos sin sustituir en el caso de Halcrow). Tampoco se observa en ninguno de los procesos puesto a punto el intercambio del heterociclo introducido en primer lugar.

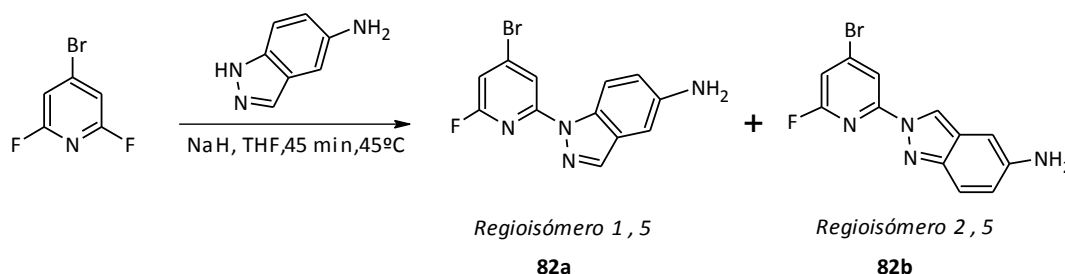
A modo de resumen, se intenta la sustitución del átomo de flúor en las mismas condiciones que las usadas para el resto de las sustituciones realizadas hasta el momento. Inicialmente, las condiciones de reacción son relativamente suaves debido a la alta reactividad de la base empleada (NaH), además del corto tiempo de reacción (2 horas) en el que transcurren estas reacciones. La reacción no progresa aumentando tiempos (2-18 horas) y temperaturas (25-140<sup>0</sup>C) de reacción.

Otro intento consiste en un cambio de disolvente y un ligero incremento de temperatura. Inicialmente, en toda la bibliografía las reacciones se llevan a cabo en DMF, pero la dificultad para su eliminación, como ya se ha comentado anteriormente, hace que se implementase el uso de THF como disolvente. En este sentido, la reacción para la introducción del 5-aminoindazol se realiza en las mismas condiciones que las descritas anteriormente pero usando, en esta ocasión, DMF como disolvente. En este caso el resultado es similar y la reacción no tiene lugar a pesar de dicho cambio.

Una tercera opción es llevar a cabo la reacción del mismo modo en el que se ha realizado la introducción del 5-aminoindazol en la síntesis que se acaba de describir (Esquema 32, página 95). Esta reacción tampoco conduce al/los producto/s de sustitución.



A la vista de estos resultados se decide probar el cambio en el orden de introducción de los sustituyentes. En el Esquema 39 se muestra el procedimiento para llevar a cabo la sustitución del primer átomo de flúor por el 5-aminoindazol usando THF como disolvente en lugar de DMF y con la modificación del tiempo de reacción.



Esquema 39

La reacción se sigue por cromatografía en placa fina (TLC) y se observa que se completa muy rápidamente, por lo que se puede concluir que la presencia del 3-metoxicarbonilindazol inhibe la sustitución del segundo átomo de flúor sobre el ligando **20**, sin que por el momento tengamos una justificación para este hecho.

Como sucedía con la introducción del 5-aminoindazol sobre **7** (Esquema 32, página 95), la reacción sobre la 4-bromo-2,6-difluorpiridina da como resultado una mezcla de los dos isómeros posibles (**82a** y **82b**).

Con el fin de llevar a cabo su separación, se realiza una purificación por cromatografía en gel de sílice y tras probar varios eluyentes, ambos isómeros presentan unos valores de R<sub>f</sub> muy próximos lo que su impide su separación mediante esta técnica.

A la vista de que el problema se repite como en la familia anterior, pero ahora en la primera reacción de la secuencia, se intenta una separación mediante HPLC preparativo, usando como fase móvil acetonitrilo y agua. El problema que aparece con este método de separación, es la baja solubilidad de la mezcla en estos eluyentes, por lo que debe añadirse una mínima cantidad de diclorometano, que no modifique significativamente la proporción de disolventes de la fase móvil, para favorecer su disolución.

A pesar de que el empleo de diclorometano se intenta reducir al mínimo, es necesario llevar a cabo la separación sobre muy poca cantidad de mezcla, por lo que el aislamiento de cantidades significativas de ambos isómeros requiere un elevado número de carreras cromatográficas y un elevado gasto de disolventes.

En la Figura 27 se presenta el cromatograma analítico de la mezcla. A pesar de su excelente separación, de su escalado a preparativo, sólo se obtienen pequeñas cantidades de uno de los isómeros por lo que, como en ocasiones anteriores, se decide continuar las siguientes etapas de síntesis con la mezcla.

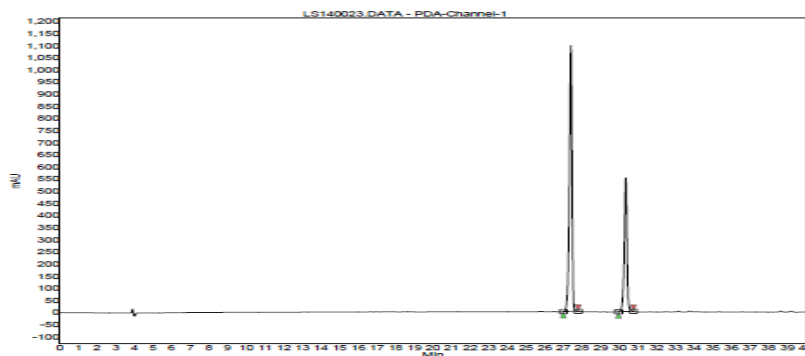
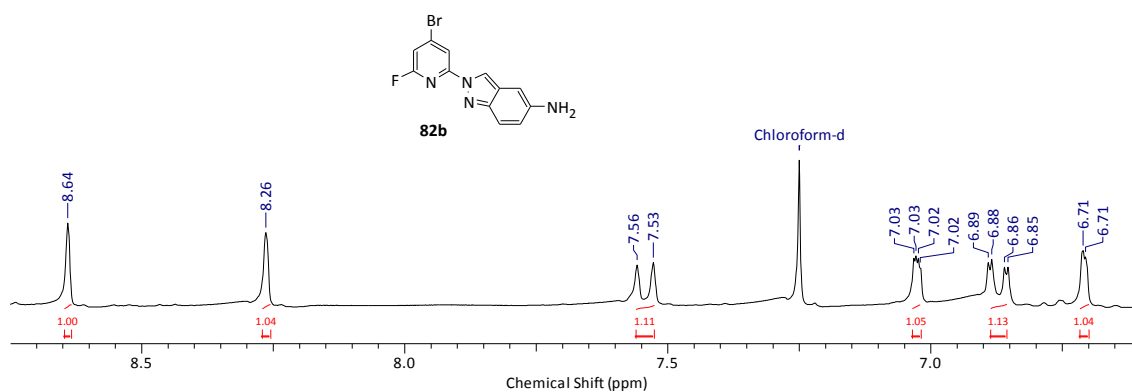


Figura 27.- Cromatograma HPLC analítico de los dos isómeros de la reacción

El aislamiento de uno de los productos permite la determinación y asignación de ambos isómeros. En la Figura 28 pueden observarse los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de la zona aromática para el caso de la mezcla **82ab**, así como el espectro de uno de los isómeros que se ha conseguido aislar mediante HPLC.



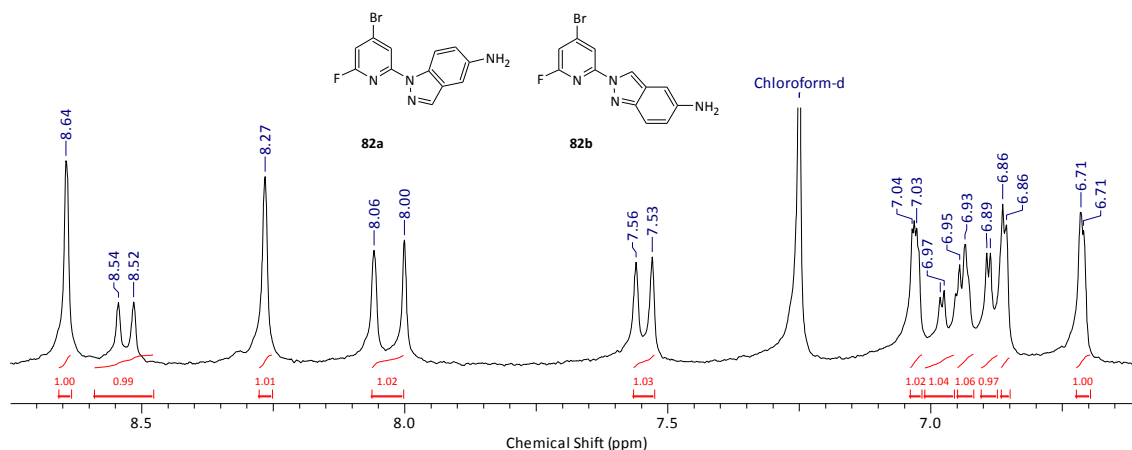


Figura 28.- (a) Espectro del isómero **82b** y (b) espectro de la mezcla isómera (**82ab**)

En la Figura 28a se muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del producto aislado y que corresponde al isómero **82b**. En esta figura la señal más desapantallada a 8,64 ppm corresponde al protón H-3 del indazol que aparece como un singlete. Este desapantallamiento se debe, como sucedía con su homólogo **66b**, a su proximidad al anillo de piridina y, por consiguiente, se asigna a la estructura **82b**. El resto de las señales del indazol aparecen claramente diferenciadas como un doblete a 7,54 ppm para el protón H-7, un doble-doblete a 6,87 ppm para el H-6 y un doblete a 6,71 ppm correspondiente al protón H-4, mientras que los protones H-3 y H-5 de la piridina aparecen a 8,26 y 7,02 ppm.

En el espectro de la mezcla **82ab** (Figura 28b) se pueden observar perfectamente resueltas las señales del otro isómero como un doblete a 8,53 ppm del protón H-7, un singlete a 8,06 ppm del protón H-3, un doble-doblete a 6,98 ppm para el H-6 y un doblete a 6,87 ppm para el protón H-4, mientras que los protones de la piridina aparecen a 8,00 y 6,94 ppm.

En este caso el producto aislado corresponde al isómero contrario (2,5) al obtenido para los derivados pirazol indazol (1,5), que se aísla puro en la sección 3.3.1, Figura 24a, página 97.

En el caso del espectro de la mezcla, se observa claramente que el isómero que siempre se obtiene en mayor proporción ( $\approx 70\%$ ) es el que se ha conseguido aislar mediante HPLC (**82b**), por lo que la regioquímica mayoritaria de esta reacción es la 2,5; mientras que en el caso de la sustitución sobre el derivado monopirazólico **7**, la mezcla obtenida estaba constituida por aproximadamente un 50 % de ambos isómeros.

Una vez obtenido el producto **82ab**, surgen dos posibles vías para continuar la síntesis: realizar en primer lugar la sustitución del segundo átomo de flúor mediante la

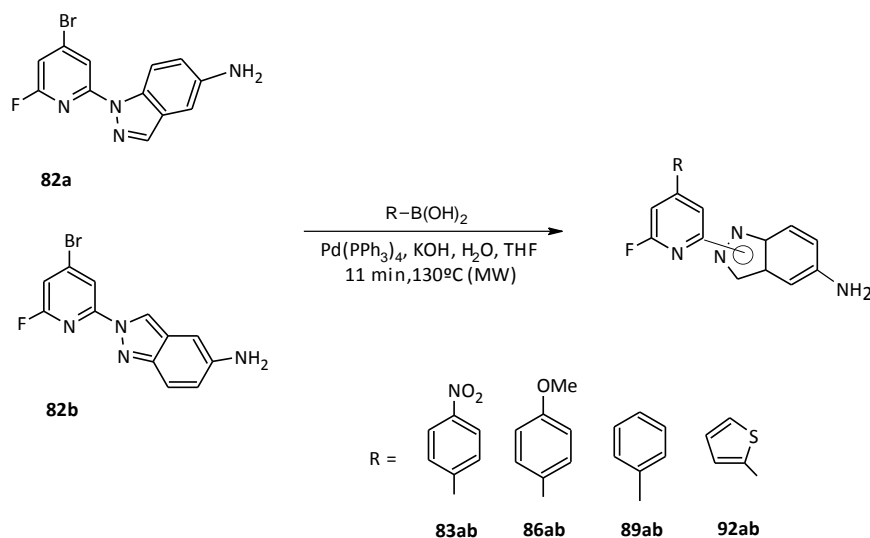
introducción del 3-metoxicarbonilindazol, o llevar a cabo las reacciones de Suzuki o Sonogashira en la posición 4 de la piridina.

A la vista de las dificultades encontradas para la introducción del 5-aminoindazol sobre el derivado monoindazólico **20**, aunque ahora se trataría de invertir el orden de introducción de los grupos, se decide abordar la preparación de estos compuestos introduciendo este segundo indazol (3-metoxicarbonilindazol) después de hacer las correspondientes reacciones de Suzuki o Sonogashira sobre la posición 4.

### Reacción de Suzuki-Miyaura

Como sustituyentes para llevar a cabo esta reacción se emplean los ácidos borónicos correspondientes a los restos aromáticos fenilo, 4-metoxifenilo, 4-nitrofenilo y tienilo.

El procedimiento general para la síntesis de estos nuevos ligandos se realiza sobre la mezcla de isómeros **82ab** y los productos se obtienen con rendimientos aproximadamente del 40 %. Su síntesis se muestra en el Esquema 40.



Esquema 40

Ninguna de las mezclas obtenidas (**83ab**, **86ab**, **89ab** y **92ab**) pudieron ser resueltas cromatográficamente.

Para la mezcla **83ab** su espectro de  $^1\text{H-RMN}$  muestra la aparición de las señales aromáticas correspondientes al grupo *para*-nitrofenilo. Las dos señales para estos protones aparecen a 8,35 y 7,89 ppm, mientras que el resto de las señales de la

estructura no sufren un desapantallamiento muy acusado. Su espectro de masas confirma la estructura con un pico molecular  $M^+$  a 350 u.m.a.

La mezcla **86ab** muestra de nuevo como señales más significativas las de los cuatro protones aromáticos y los protones su grupo  $-OCH_3$ . Estas señales aparecen a 7,70, 7,03 y 3,88 ppm respectivamente, esta vez con un desapantallamiento menos acusado. El espectro de masas confirma de nuevo la estructura con un pico molecular  $M^+$  a 335 u.m.a.

En el caso de la mezcla del ligando **89**, su espectro de  $^1H$ -RMN (Figura 29) muestra dos nuevos grupos de multipletes (7,73 y 7,50 ppm) correspondientes a cinco protones aromáticos del grupo fenilo introducido, además de observarse un desapantallamiento de todas las restantes, efecto que ya ha sido observado para la sustitución del átomo de bromo por el grupo fenilo.

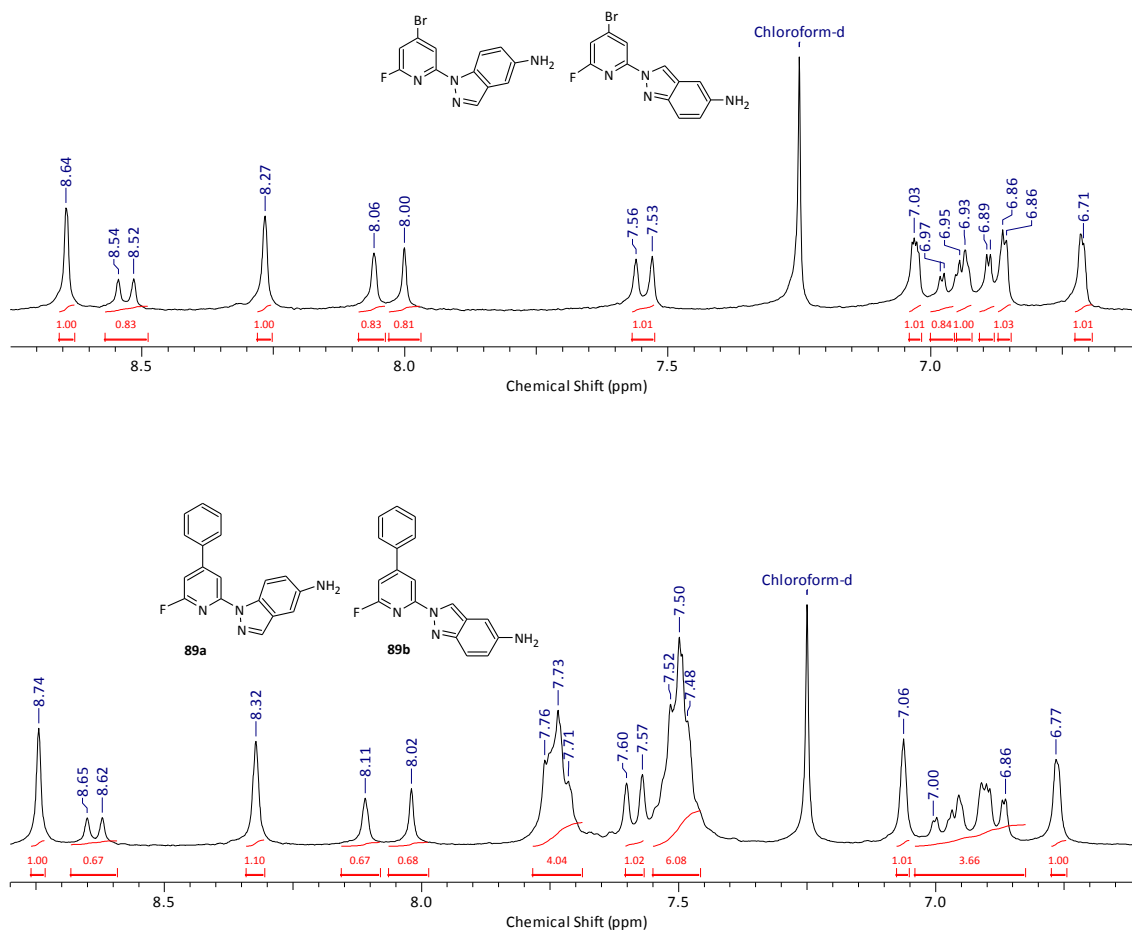


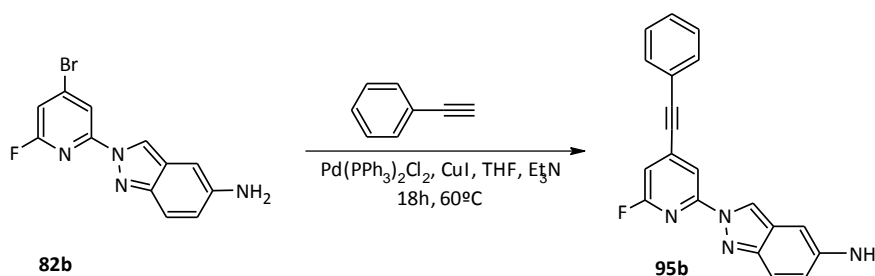
Figura 29.- (a) Espectro de la mezcla isómera de partida (**82ab**) y (b) espectro de la mezcla isómera de la reacción de Suzuki (**89ab**)

Su espectro de masas confirma la estructura con un pico molecular  $M^+$  a 305 u.m.a.

Finalmente, la mezcla **92** muestra como señales características aquellas que pertenecen al anillo tienilo y que aparecen como multipletes correspondientes a los tres protones a 7,60, 7,44 y 7,15 ppm. El espectro de masas nuevamente confirma su estructura con el pico molecular  $M^+$  a 311 u.m.a.

### Reacción de Sonogashira

Para la síntesis de este ligando se emplea la fracción del isómero puro que se consigue aislar mediante la separación por HPLC (**82b**). El producto de la reacción (Esquema 41) se obtiene con un 40 % de rendimiento.



Esquema 41

Su espectro  $^1\text{H-RMN}$  muestra claramente la aparición de dos grupos de señales correspondientes al anillo aromático (Figura 30) a 7,56 y 7,40 ppm, mientras que el resto de las señales sufren diferentes desplazamientos. Uno de los protones de la piridina y el protón H-7 del indazol sufren un desapantallamiento situándose ahora a 8,57 y 7,99 ppm respectivamente; el protón H-3 del indazol se apantalla hasta situarse en 8,59 ppm, y los protones de la piridina y el H-6 del indazol aparecen como un multiplete centrado a 6,97 ppm. Su espectro  $^{13}\text{C-RMN}$  pone de manifiesto la presencia de los carbonos cuaternarios que están formando el triple enlace (91,9 y 91,2 ppm), y el espectro de masas confirma la estructura con el pico molecular  $M^+$  a 328 u.m.a.

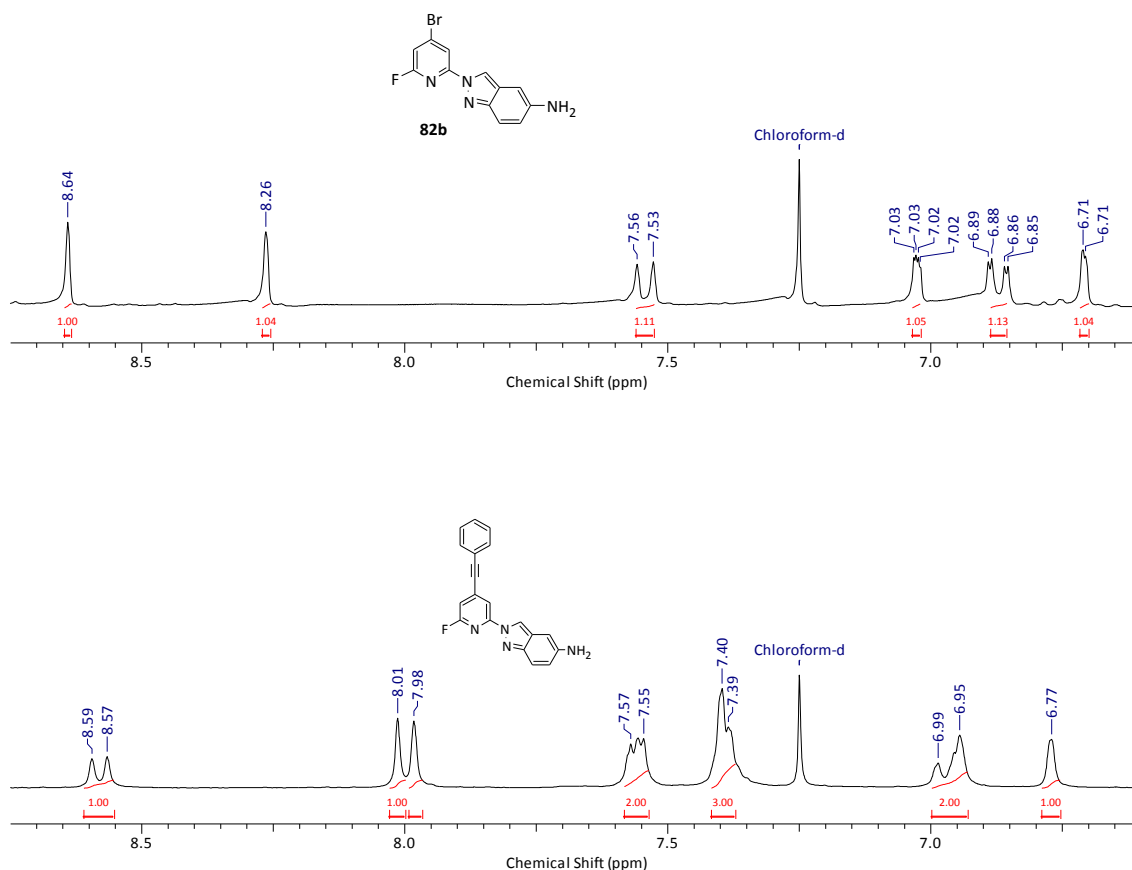
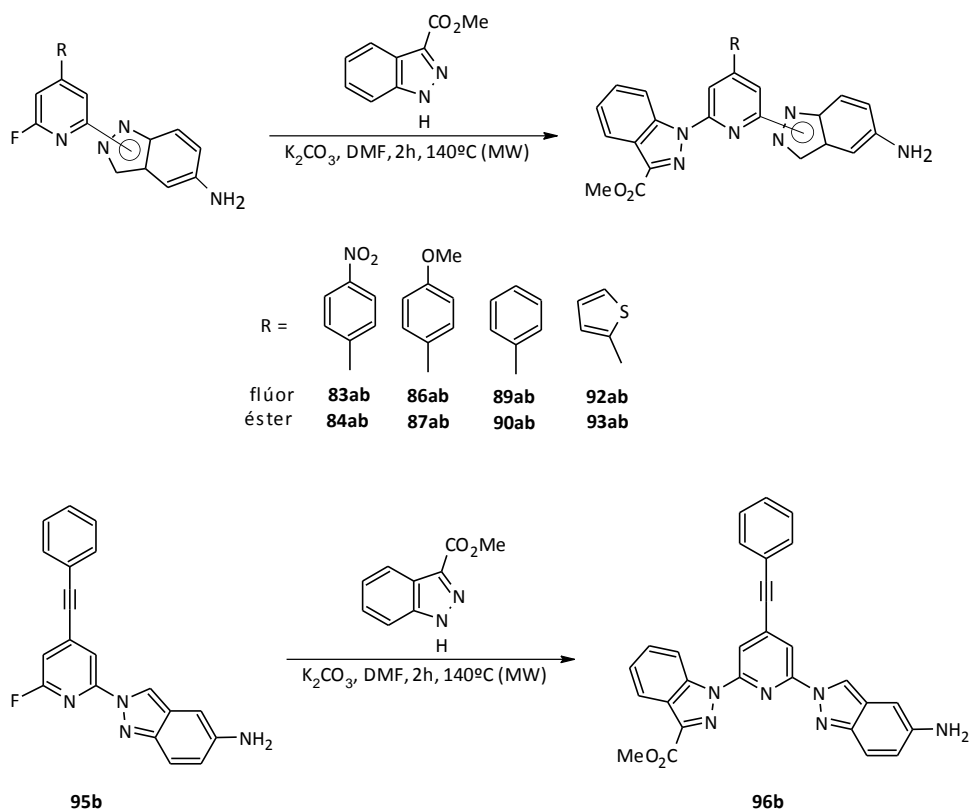


Figura 30.- (a) Espectro del producto de partida (**82b**) y (b) espectro del producto resultante de la reacción de Sonogashira (**95b**)

### Reacción de sustitución del átomo de flúor por 3-metoxicarbonilindazol

Una vez realizadas las reacciones de acoplamiento para la sustitución del átomo de bromo por los diferentes sustituyentes (**83ab**, **86ab**, **89ab**, **92ab** y **95b**), se lleva a cabo la sustitución del átomo de flúor por el 3-metoxicarbonilindazol.

Estas reacciones se realizan en las condiciones puestas a punto para la obtención de **66ab** en la sustitución del átomo de flúor con el 5-aminoindazol. Las reacciones transcurren empleando carbonato potásico como base en DMF (Esquema 42), y en todos los casos el flúor se sustituye satisfactoriamente con rendimientos en torno al 45%.



Esquema 42

En todos los casos sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN muestran nuevos grupos de multipletes correspondientes a los cuatro protones aromáticos del grupo indazólico introducido, además de observarse la señal de los protones del grupo  $-\text{OCH}_3$  del éster. Sus espectros de masas confirman la existencia de los productos buscados con la aparición de sus correspondientes picos moleculares  $\text{M}^+$ .

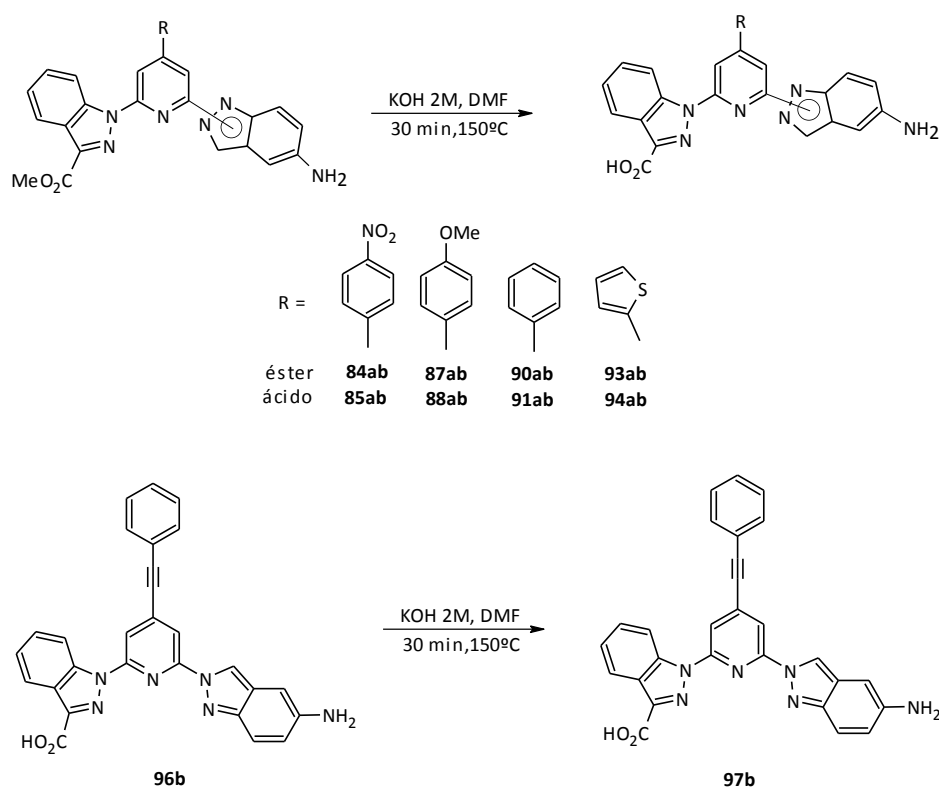
### Reacción de hidrólisis

Hasta el momento, las condiciones empleadas para la reacción de hidrólisis son el calentamiento a  $45^\circ\text{C}$  del producto con hidróxido sódico en agua y etanol, pero en el caso de tener que hidrolizar un éster metílico de un indazol estas condiciones no dan resultados satisfactorios.

Tras sucesivos intentos de hidrólisis se establecen nuevas condiciones de reacción más energéticas que implican un cambio a hidróxido potásico en mayores concentraciones (2M) y un cambio de disolvente que permita alcanzar mayores temperaturas de reacción. De este modo, se elige la DMF porque mejora la solubilidad de los productos y permite elevar la temperatura de reacción.



La hidrólisis de estos productos (Esquema 43), en estas nuevas condiciones da lugar a los ácidos carboxílicos con excelentes rendimientos (87-97 %).



Esquema 43

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN en metanol muestran la desaparición de los grupos metoxilo del éster (4,11 ppm), y sus espectros de masas confirman las estructuras.

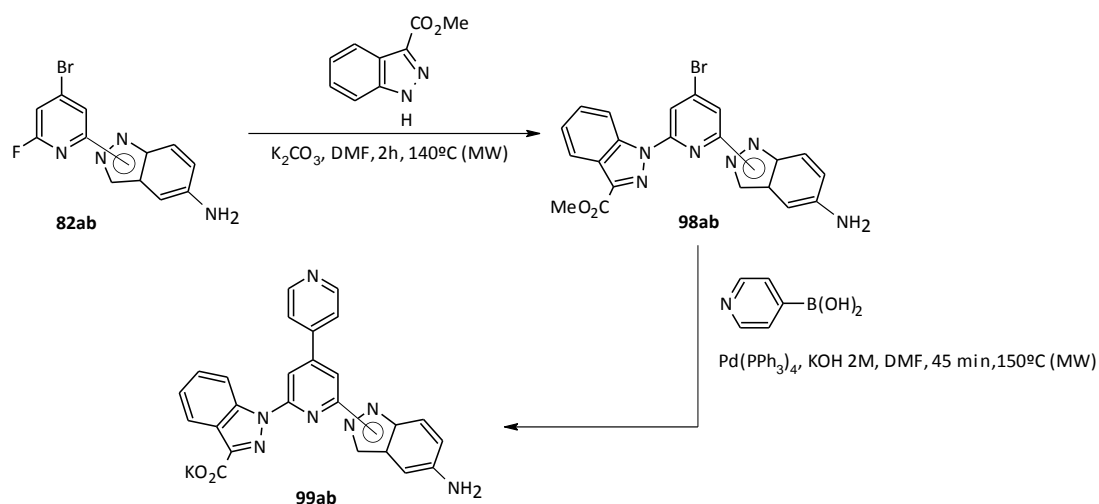
Tal y como se ha discutido, la ruta sintética seguida hasta el momento da como resultado la preparación de los productos objeto de este trabajo.

Para estudiar todas las alternativas posibles e intentar optimizar una metodología sintética definitiva, es imprescindible comprobar si existe la posibilidad de llevar a cabo la síntesis introduciendo el segundo anillo indazólico (3-metoxicarbonilindazol) en la mezcla isómera **82ab** como paso previo a la reacción de acoplamiento necesaria para la sustitución del átomo de Bromo. Este comportamiento se ha comprobado viable en la preparación de otra serie de ligandos con restos aminopirazol<sup>134</sup> y junto con los productos preparados en esta memoria, estas aproximaciones a ligandos de piridina

<sup>134</sup> Arturo Gamonal Ruiz-Crespo. Tesis doctoral UAM, 2015.

trisustituidos para el análisis de secuencias de oligonucleótidos, han sido protegidos mediante patente,<sup>135</sup> lo que ha retrasado la publicación de estos resultados.

En el Esquema 44 se muestra la alternativa desarrollada a modo de prueba para obtener el producto con el sustituyente piridilo que aún falta por preparar para completar esta familia de productos.



Esquema 44

Partiendo de nuevo de la mezcla **82ab**, se realiza la sustitución nucleófila del átomo de flúor de la posición 6 en las mismas condiciones que las usadas para introducir otros derivados indazólicos, dando como resultado la mezcla de isómeros del producto **98ab** con un rendimiento del 87 %.

De modo análogo a lo presentado en los casos anteriores, su espectro de <sup>1</sup>H-RMN muestra la aparición de las señales relativas a los protones aromáticos del 3-metoxicarbonilindazol, así como la señal de los protones del grupo –OCH<sub>3</sub> correspondientes a su éster metílico (4,11 ppm). Su espectro de masas confirma la estructura con el pico molecular M<sup>+</sup> a 463 u.m.a.

El siguiente paso, como se indica en el esquema, consiste en la reacción de Suzuki con la única diferencia de que es necesario un mayor tiempo de reacción.

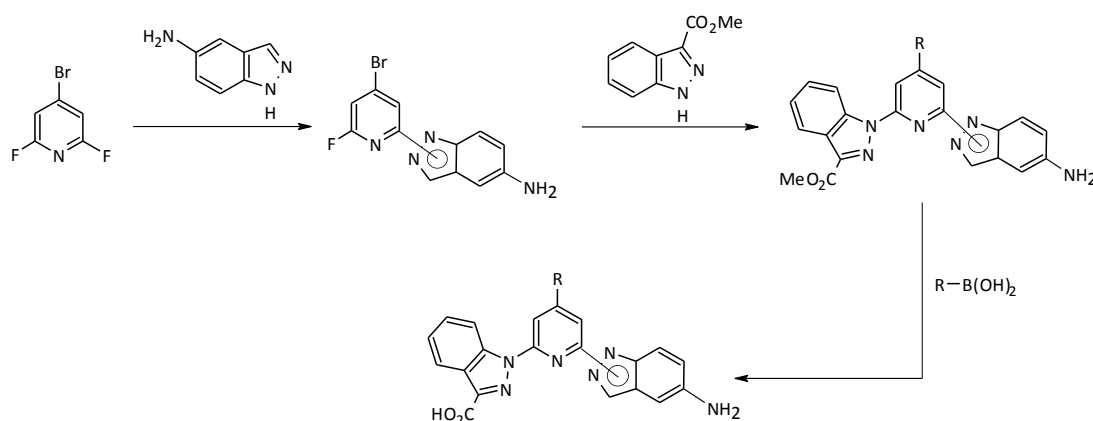
Con el fin de intentar reducir las etapas de síntesis y a la vista de los resultados obtenidos una vez optimizadas las reacciones de hidrólisis (Esquema 43, página 112), se establecen unas nuevas condiciones para llevar a cabo la reacción de Suzuki. Estas

<sup>135</sup> Rodríguez-Ubis, J.C., Brunet Romero, E., Juanes Recio, O., Lebon, E., Galán Fernández, L., Gamonal Ruiz-Crespo, A., *Compuestos Orgánicos para la Sensibilización de la Luminiscencia de Lantánidos en Dispositivos On-Off con Aplicaciones Bioanalíticas*. Solicitud P201331583, **2014**.

condiciones consisten en el uso de hidróxido potásico (2M) y DMF como disolvente, para de esta manera intentar realizar de manera simultánea la reacción de acoplamiento y la hidrólisis del éster metílico.

El espectro de  $^1\text{H-RMN}$  de la mezcla isómera **99ab** muestra las señales del sustituyente piridilo (9,02, 8,51 y 7,62 ppm), y su estructura se confirma con su espectro de masas que presenta un pico molecular  $\text{M}^+$  a 446 u.m.a.

Como conclusión y ante la ventaja ofrecida por la reacción de Suzuki puesta a punto, y que permite llevar a cabo la misma con la hidrólisis concomitante del grupo éster, esta secuencia de reacciones se considera la óptima (Esquema 45) para la obtención de los derivados de piridina 2,4,6-trisustituídos no simétricos.



Esquema 45

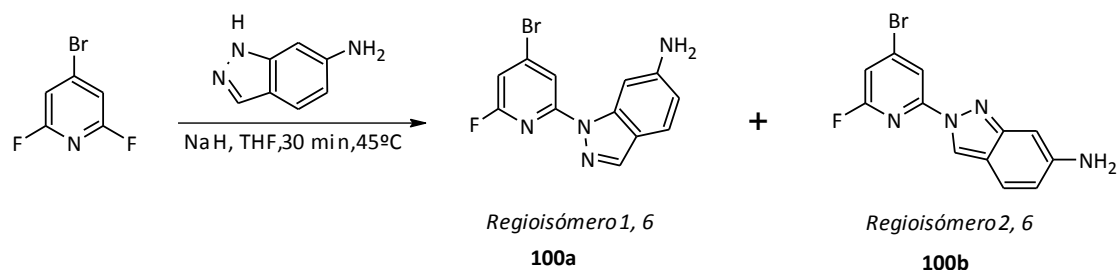
En las síntesis descritas, solamente en casos puntuales se han conseguido isómeros puros de ligandos pirazol-indazol de tipo 1,5 con sustituyentes tiofeno (**78a**) y feniletinilo (**81a**) en la posición 4 de la piridina, y de un ligando indazol-indazol de tipo 2,5 con el sustituyente feniletinilo (**97b**). A partir de estos resultados y con el fin de intentar la obtención de estructuras de piridinas trisustituídas con un grupo aminoindazol como isómeros únicos con la mayoría de los sustituyentes, se plantea como objetivo sintético final de esta memoria el empleo del 6-aminoindazol como alternativa a los derivados discutidos hasta el momento.

### 3.4. Síntesis de los ligandos sustituidos por 3-carboxiindazol y 6-aminoindazol

Como se ha comprobado hasta el momento, existe una gran dificultad para obtener una separación óptima de los isómeros de las familias que presentan un resto 5-aminoindazol, tanto en los productos que consideramos iniciales como en los productos finales de cada etapa.

La necesidad de que exista dicho grupo amino para dotar de un posible punto de anclaje a estos ligandos antena plantea, como objetivo de este capítulo, el cambio del 5-aminoindazol por el isómero 6-aminoindazol para comprobar si los nuevos productos obtenidos presentan una mayor facilidad de separación en alguna de las etapas de la síntesis.

Como se ha visto, la introducción del 5-aminoindazol cuando ya existía el 3-metoxicarbonilindazol sobre el anillo de piridina no podía llevarse a cabo y era necesario invertir el orden de las sustituciones. Por tanto, con el 6-aminoindazol se tiene en cuenta este comportamiento, por lo que se sigue el mismo procedimiento que en la familia anterior y que se muestra en el Esquema 46.



Esquema 46

Nuevamente la reacción consiste en la sustitución de uno de los átomos de Flúor, usando como base hidruro sódico en THF. La reacción se sigue por cromatografía en placa fina (TLC) y se observa que se completa prácticamente de modo instantáneo, al igual que sucedía con el isómero 5-aminoindazol.

La presencia del grupo amino ( $-NH_2$ ) en el anillo de indazol origina de nuevo la mezcla de los dos isómeros posibles 1,6 y 2,6 (**100a** y **100b**) con un rendimiento del 60 %, estando en una proporción aproximada cada uno de ellos del 50 %.

En este caso, sin embargo, la mezcla es perfectamente separable y ambos productos son diferentes en cuanto a su color. El producto **100a** presenta color blanco, mientras que **100b** presenta un color amarillo intenso.

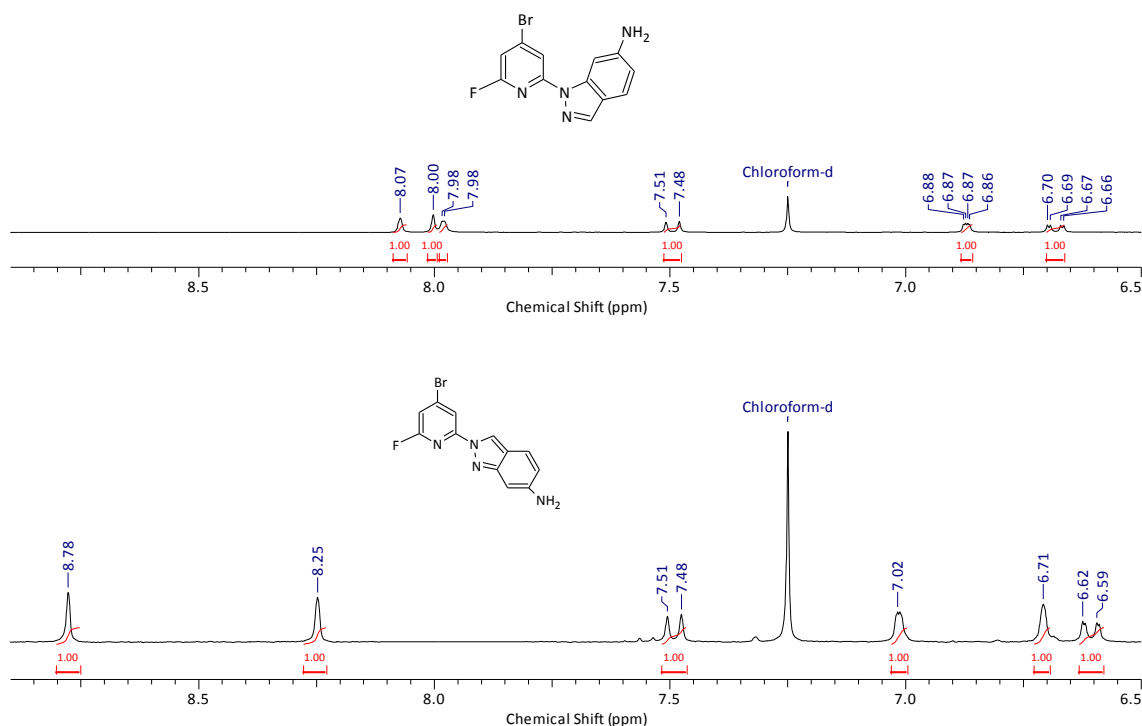


Figura 31.- (a) Espectro del producto **100a** y (b) espectro del producto **100b**

En la Figura 31a se muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para el producto **100a**. La asignación de dicho espectro a este producto se realiza en base a los desplazamientos y acoplamientos de las señales. La ausencia de una señal muy desapantallada indica que no existe el protón H-3 del indazol, por lo que el producto sin ninguna duda es el isómero 1,6. El resto de señales para el grupo indazólico son a 8,00 ppm un singlete para el protón H-3, dos dobletes a 7,98 y 7,49 ppm para los protones H-7 y H-4 respectivamente, y un doble-doblete para el protón H-5 a 6,69 ppm. Los protones correspondientes a la piridina aparecen a 8,07 y 6,87 ppm.

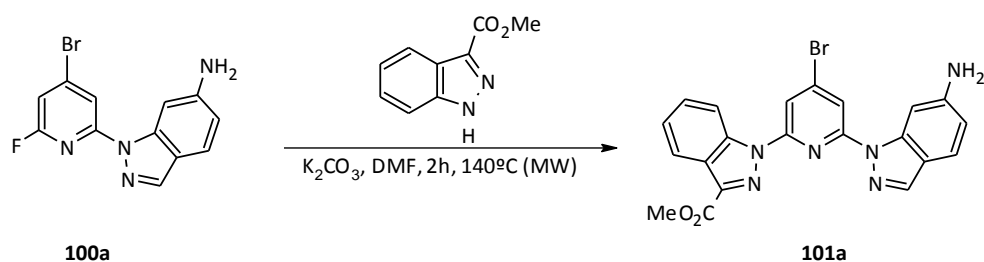
El espectro para el producto **100b** se muestra en la Figura 31b. En ella se observa una señal muy desapantallada a 8,78 ppm que corresponde al protón H-3 del indazol y que confirma inequívocamente que es el isómero 2,6. El resto de las señales del indazol aparecen a 7,49 ppm como un doblete para el caso del protón H-4, a 6,71 ppm un singlete para el protón H-7 y a 6,60 ppm un doble-doblete para el protón H-5. Los protones de la piridina aparecen a 8,25 y 7,01 ppm.

Una vez separados ambos isómeros y perfectamente caracterizados, se procede a la síntesis de los ligandos con cada uno de ellos de manera independiente para, posteriormente, poder estudiar sus propiedades fotofísicas.

### 3.4.1. Síntesis de los 6-amino-1-indazolil derivados

Como ya se ha visto, la introducción del segundo grupo indazólico (3-metoxicarbonilindazol) seguido de la reacción de Suzuki, usando DMF como disolvente y KOH (2M) como base, da lugar a la síntesis de esta familia de productos.

Por tanto, en primer lugar se realiza la sustitución del átomo de Flúor por el 3-metoxicarbonilindazol partiendo del isómero **100a**, como se muestra en el Esquema 47, dando lugar al producto **101a** con un rendimiento del 90 %.



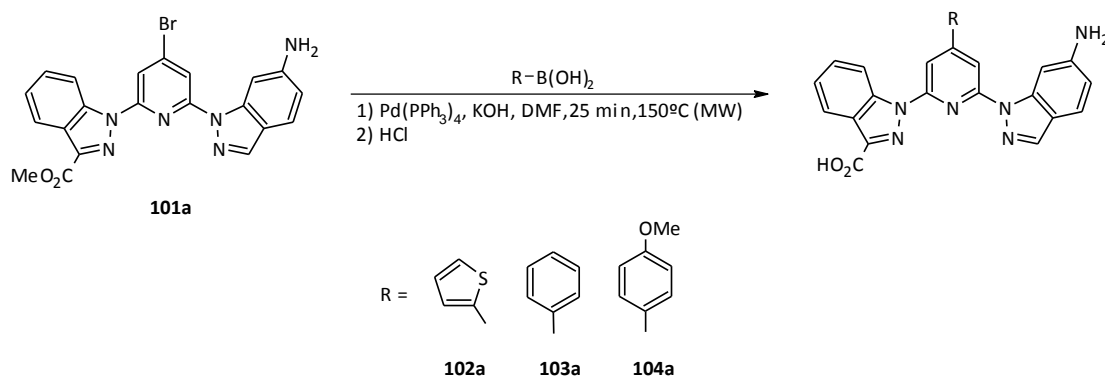
Esquema 47

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra la aparición de nuevos multipletes del 6-aminoindazol. A 8,67 y 8,29 ppm aparecen dos dobletes que corresponden a los protones H-7 y H-4 respectivamente, los protones H-5 y H-6 aparecen como multipletes a 7,58 y 7,43 ppm, mientras que los protones del grupo  $-\text{OCH}_3$  aparecen a 4,10 ppm. El resto de las señales correspondientes al 6-aminoindazol y el protón H-5 de la piridina apenas sufren variaciones en su desplazamiento, siendo único protón afectado por la sustitución el protón H-3 de la piridina que ahora se sitúa a 7,97 ppm. Su espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN muestra la aparición de los carbonos del éster metílico a 163,7 ppm ( $-\text{C}=\text{O}$ ) y 53,0 ppm ( $-\text{OCH}_3$ ).

El espectro de masas confirma la estructura mediante la aparición del pico molecular  $\text{M}^+$  a 463 u.m.a.

A partir del producto **101a** se realizan las reacciones de acoplamiento tipo Suzuki que, con las nuevas condiciones que se pusieron a punto en el capítulo anterior, permite llevar a cabo la hidrólisis de manera simultánea.

El procedimiento general se muestra en el Esquema 48, permitiendo obtener los correspondientes productos con rendimientos próximos al 90 %.



Esquema 48

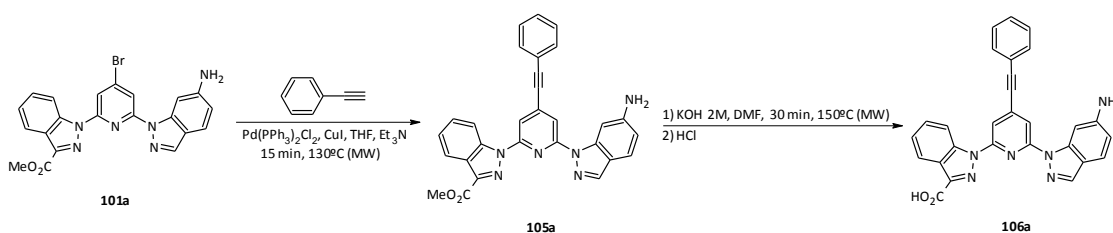
El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del producto **102a** muestra tres nuevos grupos de señales a 7,86, 7,62 y 7,29 ppm correspondientes a los tres protones del grupo tienilo y la ausencia de los protones del grupo  $-\text{OCH}_3$ , que confirma la hidrólisis simultánea a la reacción de Suzuki. El resto de señales apenas sufren variaciones a excepción del protón H-5 de la piridina que se sitúa a 8,21 ppm. Su espectro de masas confirma la estructura con la aparición de un pico molecular  $\text{M}^+$  a 491 u.m.a.

Para el producto **103a**, su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra nuevos multipletes a 7,35, 7,24 y 7,15 ppm correspondientes a los cinco protones del fenilo. El resto de señales sufren ligeros desplazamientos, siendo para el caso del protón H-7 del indazol éster (7,73 ppm) y el protón H-5 del 6-aminoindazol (7,28 ppm) las señales que más varían. De nuevo en este producto, se observa la desaparición del grupo metoxi del indazol y mediante su espectro de masas se confirma la estructura con la aparición de un pico molecular  $\text{M}^+$  a 485 u.m.a.

Por último, para el ligando **104a** su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN confirma el producto mediante la aparición de tres nuevos grupos de señales correspondientes a los cuatro protones aromáticos y a los tres protones del grupo  $-\text{OCH}_3$  del sustituyente introducido. Estas señales aparecen a 7,23, 6,57 y 3,81 ppm respectivamente, mientras que para el resto de señales se produce un gran desplazamiento en el caso de los protones de la piridina (7,78 y 8,98 ppm para el protón H-3 y el H-5 respectivamente), para los protones H-4 y H-7 del grupo indazol éster (7,89 y 8,17 ppm respectivamente)

y para el protón H-7 del 6-aminoindazol (7,21 ppm), así como la ausencia del grupo metoxi del indazol. Su espectro de masas de nuevo confirma la estructura con la aparición de un pico molecular  $M^+$  a 515 u.m.a.

El último ligando que se sintetiza para completar esta la familia de los derivados que contiene al 6-amino-1-indazol es el resultante de la reacción de Sonogashira que se obtiene con un rendimiento para la primera etapa del 67 % y un 95 % en su transformación en ácido carboxílico (Esquema 49).



Esquema 49

En esta ocasión, y con el fin de reducir el tiempo de reacción, la primera etapa de síntesis para la obtención del producto **105a** se lleva a cabo en el microondas, pasando de 18 horas a 15 minutos y mejorando su rendimiento.

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para el producto intermedio **105a** muestra la aparición de nuevos multipletes situados a 8,03, 7,55 y 7,42 ppm con apenas variación del resto de las señales. Su espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN presenta como señales características las de los carbonos cuaternarios correspondientes al triple enlace situadas a 91,9 y 91,2 ppm.

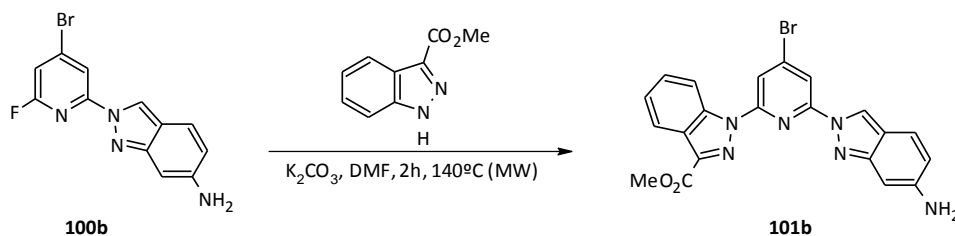
La reacción de hidrólisis, en las condiciones indicadas en el esquema, permite obtener el producto **106a** cuyo espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra la desaparición del éster metílico, y su espectro de masas muestra un pico molecular  $M^+$  a 471 u.m.a. confirmando su estructura.

### 3.4.2. Síntesis de 6-amino-2-indazolil derivados

La síntesis de la serie de ligandos que contienen el isómero 6-amino-2-indazol se realiza de manera idéntica a la descrita a lo largo de este punto para el caso del isómero 1,6.



En primer lugar se realiza la sustitución del átomo de flúor con el 3-metoxicarbonilindazol en las mismas condiciones que las usadas con el isómero 6-amino-1-indazol (**100a**), dando lugar al producto **101b** con un rendimiento del 95 % (Esquema 50).

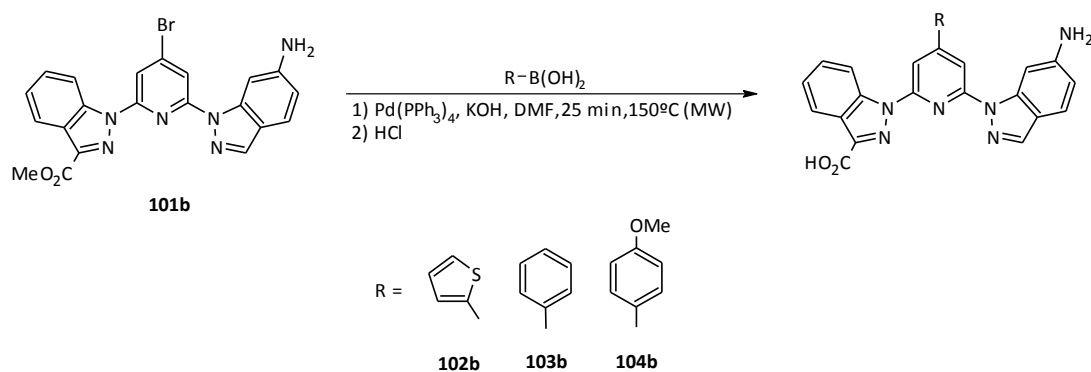


Esquema 50

El espectro de  $^1H$ -RMN de este producto muestra la aparición nuevas señales correspondientes al grupo 3-metoxicarbonilindazol. A 8,76, 8,31, 7,68 y 7,50 ppm aparecen los multipletes correspondientes a los protones H-7, H-4, H-5 y H-6 respectivamente y a 4,11 ppm la señal del grupo  $-OCH_3$ . El resto de señales para el 6-amino-2-indazol se sitúan a 8,89 ppm para el protón H-3, a 7,58 ppm para el protón H-4, a 6,78 ppm para el H-7 y 6,66 ppm para el H-5; mientras que los protones de la piridina se sitúan a 8,35 y 7,46 ppm para los protones H-5 y H-3 respectivamente. El espectro de  $^{13}C$ -RMN confirma la sustitución del átomo de flúor por el grupo 3-metoxicarbonilindazol mediante las señales del grupo  $-C=O$  y  $-OCH_3$  a 163,7 y 53,0 ppm, respectivamente. Su espectro de masas confirma la estructura **101b** con el pico molecular  $M^+$  a 463 u.m.a.

De manera análoga al procedimiento seguido con el derivado del 6-amino-1-indazol (**101a**), se llevan a cabo las síntesis de los productos correspondientes al este isómero 2,6. A partir del producto **101b** se realizan en primer lugar las reacciones de acoplamiento tipo Suzuki/hidrólisis.

El procedimiento general se muestra en el Esquema 51, permitiendo obtener los correspondientes productos con rendimientos próximos al 85 %.



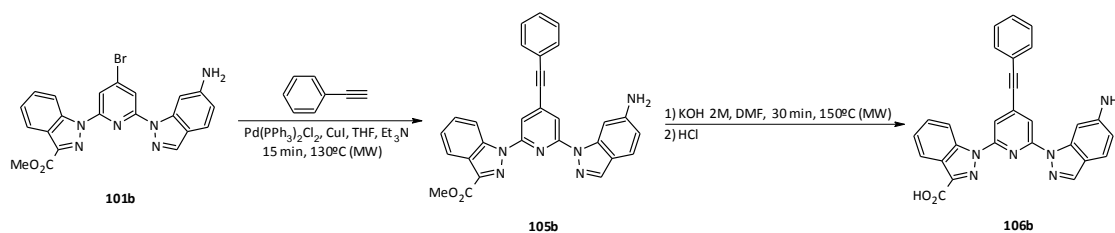
Esquema 51

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del producto **102b** muestra tres nuevos grupos de señales a 8,04, 7,88 y 7,30 ppm correspondientes a los tres protones del grupo tienilo y la ausencia de los protones del grupo  $-\text{OCH}_3$ , que confirma la hidrólisis simultánea a la reacción de Suzuki mientras que las otras señales del sistema sufren ligeras variaciones ( $\approx 0,1$  ppm). Su espectro de masas confirma la estructura con la aparición de un pico molecular  $\text{M}^+$  a 491 u.m.a.

Para el producto **103b**, su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra nuevos multipletes a 7,94, 7,59 y 7,38 ppm correspondientes a los cinco protones del fenilo. El resto de señales sufren ligeros desplazamientos, siendo los protones H-3 y H-7 del indazol éster (9,07 y 6,52 ppm respectivamente) y el protón H-5 de la piridina (8,19 ppm) las señales que más varían. De nuevo en este producto, se observa la desaparición del grupo metoxi del indazol y mediante su espectro de masas se confirma la estructura con la aparición de un pico molecular  $\text{M}^+$  a 485 u.m.a.

Por último, para el ligando **104b** su espectro de  $^1\text{H}$ -RMN confirma el producto mediante la aparición de tres nuevos grupos de señales correspondientes a los cuatro protones aromáticos y a los tres protones del grupo  $-\text{OCH}_3$  del sustituyente introducido. Estas señales aparecen a 7,94, 7,15 y 3,86 ppm respectivamente, mientras que para el resto de señales apenas se producen desplazamientos a excepción, igual que en el caso anterior, de los protones H-3 y H-7 del 6-amino-2-indazol (9,06 y 6,52 ppm respectivamente) y el protón H-5 de la piridina (8,16 ppm), así como la ausencia del grupo metoxi del indazol. Su espectro de masas de nuevo confirma la estructura con la aparición de un pico molecular  $\text{M}^+$  a 515 u.m.a.

El último ligando que se sintetiza para completar esta la familia de derivados que contiene al 6-amino-2-indazol es el resultante de la reacción de Sonogashira que se obtiene con un rendimiento para la primera etapa del 80 % y un 95 % en su transformación en ácido carboxílico (Esquema 52).



Esquema 52

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN para el producto intermedio **105b** muestra la aparición de nuevos multipletes situados a 7,54 y 7,40 ppm con apenas variación del resto de las señales, a excepción del protón H-5 de la piridina (8,13 ppm). Su espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN presenta como señales características las de los carbonos cuaternarios correspondientes al triple enlace situadas a 91,9 y 91,2 ppm.

La reacción de hidrólisis, en las condiciones indicadas en el esquema, permite obtener el producto **106b** cuyo espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra la desaparición del éster metílico, y su espectro de masas muestra un pico molecular  $\text{M}^+$  a 471 u.m.a. confirmando su estructura.

Una vez sintetizados los productos representados de manera general en la Figura 32, se procede al estudio de sus propiedades fotofísicas con los iones lantánidos (Eu y Tb). Los complejos se han analizado por espectroscopia de absorción y de emisión permitiendo esta última, conocer las propiedades luminiscentes de los complejos formados en cada caso.

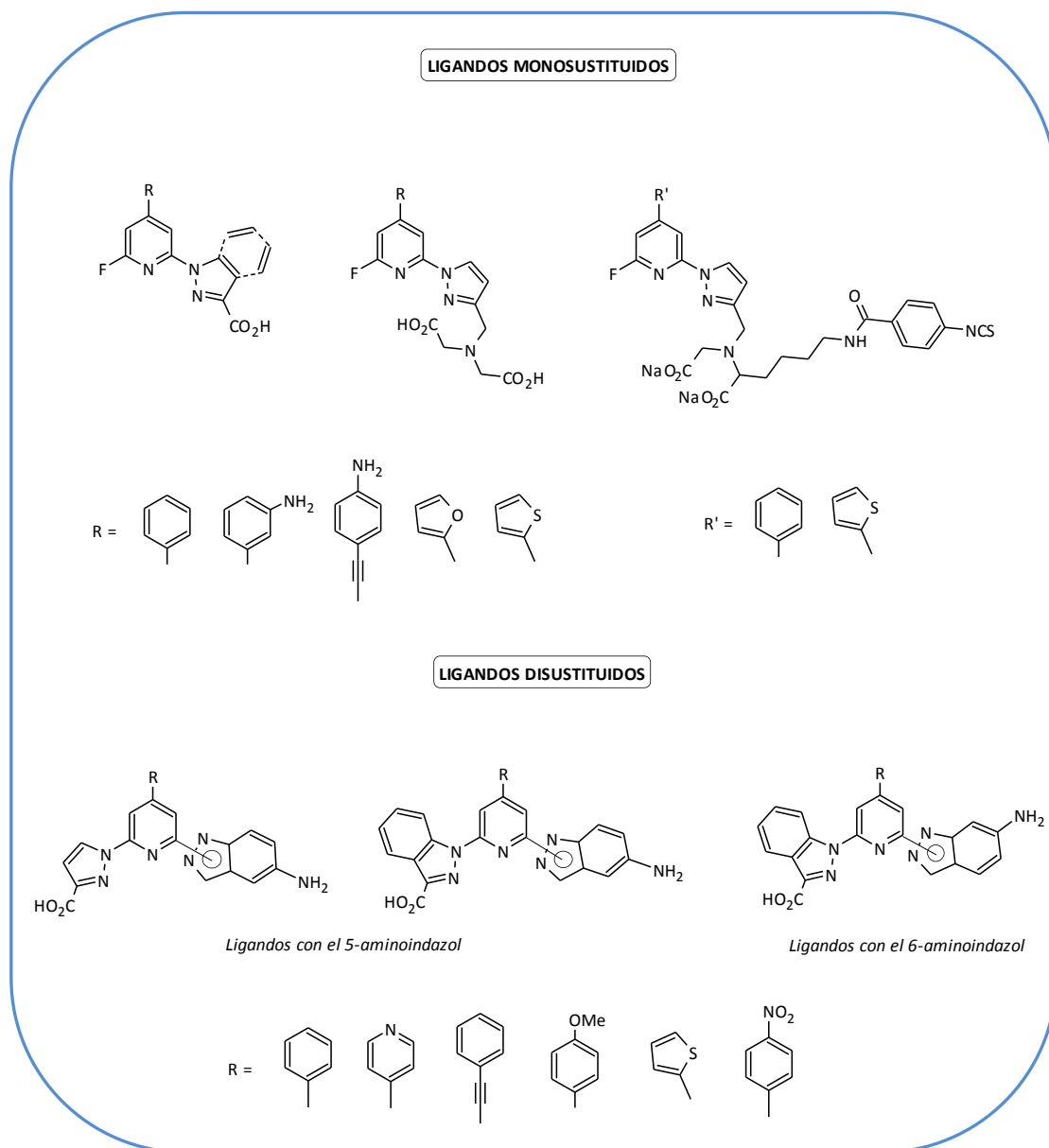


Figura 32.- Ligandos sintetizados y usados posteriormente para realizar el estudio fotofísico

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ESTUDIO DE COMPLEJACIÓN

---



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. COMPLEJACIÓN

---

Los ligandos cuya síntesis se ha abordado en este trabajo tienen como unidad heterocíclica común la piridina, a la cual se han unido uno o dos anillos heteroaromáticos (pirazoles y/o indazoles) y en los que hay presentes uno o dos ácidos carboxílicos y/o un grupo amino ( $-NH_2$ ) susceptible de ser transformado en un grupo isotiocianato ( $-NCS$ ) para llevar a cabo reacciones de conjugación a un oligonucleótido.

La posición 4 de la piridina ha sido sustituida mediante reacciones de acoplamiento tipo Suzuki-Miyaura o Sonogashira. Estos sustituyentes, junto con el tipo de heterociclo de cinco miembros introducido (pirazol o indazol), son los principales responsables de las diferentes propiedades de emisión de los iones lantánidos que se van a estudiar a lo largo de este capítulo. Estos estudios servirán tanto para evaluar la naturaleza del cromóforo en su función sensibilizadora, como el efecto del número de heterociclos y de funciones carboxílicas presentes en las diferentes estructuras. Aquellos que muestren mejores resultados o que puedan parecer interesantes desde el punto de vista estructural se ensayarán en las reacciones de conjugación que se presentarán más adelante.

Las características de los ligandos preparados (ligandos antena, AL) no son, tal y como se ha discutido, las óptimas para la complejación de lantánidos en complejos AL:Ln, 1:1. El objetivo es disponer de un cromóforo adecuado para la sensibilización del lantánido, pero no un entorno de coordinación que aisle el ion complejado, ya que el ion viene previamente coordinado con un ligando (ligando portador del ion lantánido, ICC) de la suficiente estabilidad aunque no con todas las posiciones de coordinación ocupadas, y debe de permitir la aproximación del ligando antena. Además no se pretende poner en juego un equilibrio entre los diferentes ligandos presentes, ICC y AL, que permita la migración del metal desde el ligando portador hacia el ligando antena.

Uno de los aspectos que pueden marcar el comportamiento de los ligandos antena frente al ligando portador del lantánido (ICC) es la disposición y número de posiciones coordinantes sobre la antena, por lo que establecer un método lo suficientemente amplio y general que sea válido para todos los ligandos que se han diseñado es complicado por diferentes motivos: i) un número muy bajo o una estructura con una geometría inadecuada puede conducir a una baja afinidad hacia el lantánido, a pesar de que puede tratarse de un buen cromóforo, mientras que un número de puntos de coordinación elevado puede conducir a la extracción del lantánido sobre el ICC y a la lectura de la emisión del lantánido como consecuencia del complejo AL(Ln) y no al

complejo AL(Ln)ICC sobre el sistema de reconocimiento de oligonucleótidos descrito; ii) los ligandos sintetizados están poco preparados para una complejación óptima en soluciones acuosas debido a su baja estabilidad; iii) el lantánido debe de participar como complejo previo no emisivo para evitar la confusión entre la emisión intrínseca del lantánido y la emisión del complejo formado con el ligando objeto de estudio; y iv) las propiedades pueden variar en el caso de aquellos ligandos que contienen el grupo –NCS ya que el ligando que finalmente sensibiliza en las reacciones de conjugación es la tiourea resultante de su reacción con un grupo amino que posee el oligonucleótido.

A la vista de todos estos aspectos, existe gran dificultad para modelar un método de estudio general que establezca con precisión el posible comportamiento de todos los ligandos en el sistema final, por lo que el objetivo de estos estudios es la comparación de sus propiedades en función de los distintos sustituyentes presentes en cada familia de compuestos e intentar determinar cuáles de ellos pueden tener aplicación en el desarrollo del proyecto ACUSEP.

En este capítulo se describen las diferentes aproximaciones realizadas a lo largo de este trabajo, conforme avanzaban los procedimientos sintéticos desarrollados. En este sentido los resultados obtenidos no siempre abarcan la totalidad de los ligandos finalmente disponibles.

Los ligandos y sus complejos se han estudiado mediante espectrofotometrías de absorción y excitación/emisión en modo fosforescencia, usando en todas las medidas concentraciones de ligando  $10^{-5}$ M. Los espectros de emisión de los complejos se realizan en modo fosforescencia, con un tiempo de retardo entre el pulso de luz y la medida. Estos espectros se registran utilizando como longitud de onda de excitación el valor de la longitud de onda de absorción de menor energía, obteniéndose en todos los casos los espectros de emisión característicos de los iones en estudio, con emisiones principales en torno a 615 nm para el caso del Eu(III) y 545 nm para el caso del Tb(III) (Figura 33).

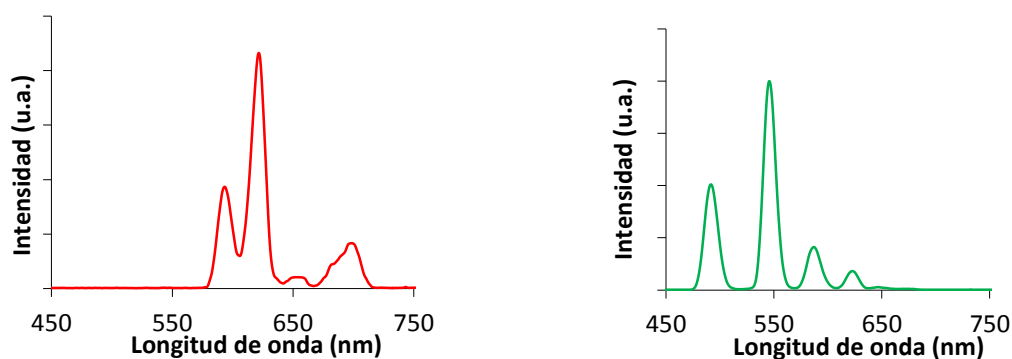


Figura 33.- Espectros de emisión característicos para Eu(III) y Tb(III)



#### 4.1. Estudio de complejación por formación de sus complejos con $\text{Ln}(\text{OTf})_3$

La primera aproximación para el estudio de la complejación con los lantánidos  $\text{Eu}(\text{III})$  y  $\text{Tb}(\text{III})$  de los diferentes ligandos preparados se basa en la preparación de sus complejos a partir de las sales triflato. La formación de los complejos se realiza mediante la adición de un equivalente de la sal del lantánido y tres del ligando correspondiente (1:3), usando acetonitrilo como disolvente y calentando a reflujo.

Con el fin de poder estudiar las propiedades de cada ligando preparado e intentar determinar cuál es el mejor en cada familia, se realiza un estudio comparativo en función de los distintos sustituyentes sobre la posición 4 de la piridina.

##### 4.1.1. Ligandos monopirazólicos

Los ligandos de la familia de los monopirazoles que se estudian mediante esta primera metodología aparecen representados en la Figura 34.

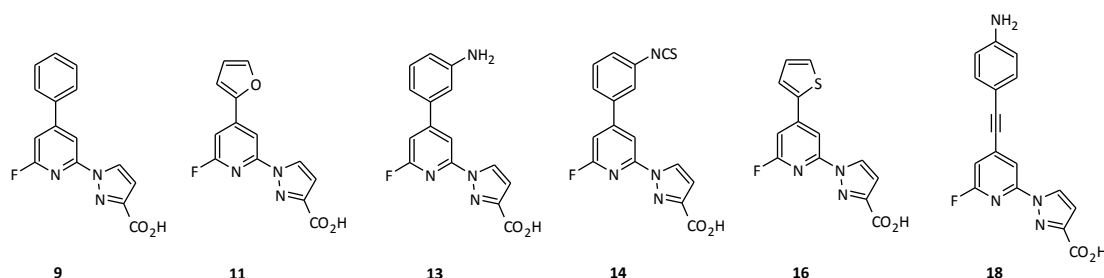


Figura 34.- Ligandos monopirazólicos estudiados mediante la complejación con triflatos

En el caso del compuesto **9**, su espectro de ultravioleta no muestra variaciones significativas con respecto a los de los complejos de  $\text{Eu}(\text{III})$  y  $\text{Tb}(\text{III})$  obtenidos, esto podría ser debido a que la coordinación no varía de modo significativo la naturaleza electrónica del ligando, aunque también podría indicar que no hay formación significativa del complejo en solución. Los espectros de emisión son los característicos para  $\text{Eu}(\text{III})$  y  $\text{Tb}(\text{III})$ , sin embargo, los espectros de excitación no son coincidentes con los de absorción. Los máximos de excitación aparecen desplazados hacia el rojo respecto a los de absorción. Estos resultados apuntan a que, en disolución, el complejo formado no es suficientemente estable, siendo la especie predominante el ligando

libre que domina el espectro de ultravioleta de estos complejos. A pesar de esta baja estabilidad se puede confirmar la existencia de complejo en la disolución ya que sí se observa la característica sensibilización del ligando hacia ambos lantánidos. No es posible, sin embargo, evaluar el grado de formación del complejo ni su estequiometría. Aunque la emisión de ambos complejos es importante, siendo la del Tb(III) cuatro veces superior a la observada para el Eu(III).

En el caso de **11** el comportamiento es muy similar para el complejo de Eu(III). Se observa también emisión para este ion por excitación del ligando y en este caso el espectro de ultravioleta del ligando muestra un hombro que coincide con el máximo de excitación del complejo. Para este ligando no se observa, sin embargo, emisión clara del complejo de Tb(III), el espectro de excitación observado es muy diferente del espectro de ultravioleta y la emisión de terbio producida parece debida fundamentalmente a la excitación directa del ion y no a la del complejo formado que aunque aparece por encima de 300 nm no es significativa, tal y como se muestra en la Figura 35.

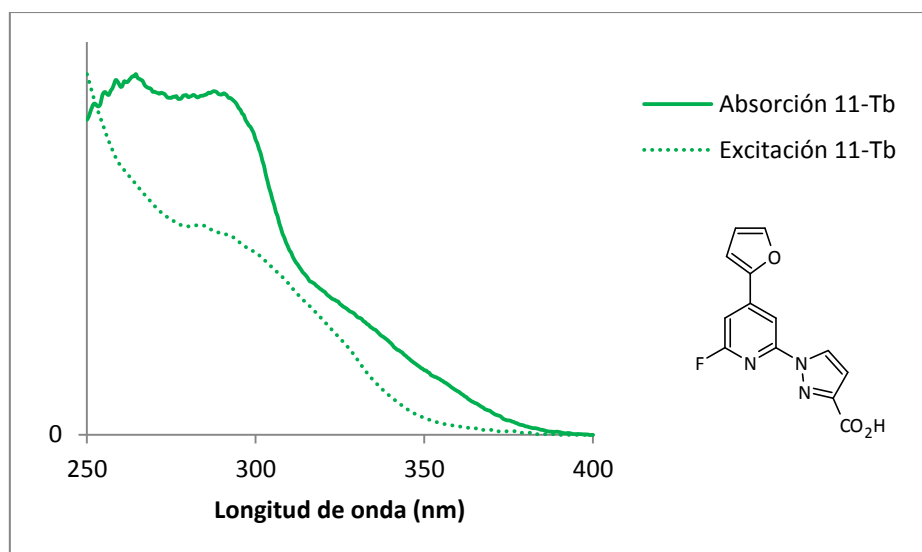


Figura 35.- Espectros de absorción y de excitación para el ligando **11** con Tb(III)

En el caso del ligando **13**, precursor con un grupo amino de una primera sonda isotiocianato para el marcaje de oligonucleótidos, no se observa claramente sensibilización por parte de este ni para Eu(III) ni para Tb(III). Las intensidades obtenidas son bajas y sus espectros de excitación parecen corresponder a la excitación directa del ion. Estos resultados pueden ser debidos a la presencia del grupo  $-NH_2$ , presencia que es descrita en algunos casos como responsable de un proceso de transferencia electrónica fotoinducida (PET) desde el par de electrones no compartidos

del grupo amino hacia el ion lantánido, provocando la extinción de la fluorescencia (Figura 36).<sup>136</sup>

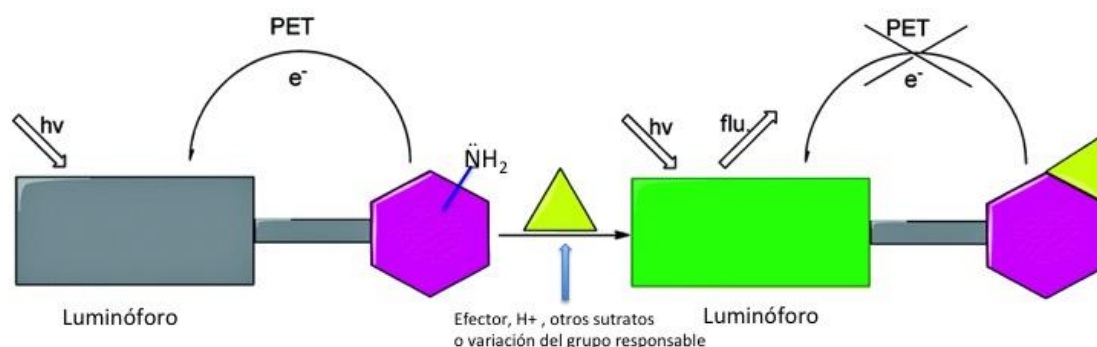


Figura 36.- Fenómeno de transferencia electrónica fotoinducida (PET)

Cuando este grupo amino se transforma en la función isotiocianato (**14**) se observan espectros de ultravioleta perfectamente coincidentes con los correspondientes a los de excitación y la intensidad obtenida en el caso del complejo con Tb(III) es buena y similar a la del ligando fenil sustituido **9**. Ahora el grupo -NCS no provoca el proceso PET y de nuevo se observa el proceso de sensibilización esperado. En el caso del complejo de Eu(III), sin embargo, la emisión no se recupera y la señal observada es muy baja y similar a la observada para el amino derivado.

En el caso del ligando **16** se observa un mejor comportamiento para el Eu(III). Tanto sus espectros de ultravioleta como los correspondientes a la excitación coinciden aunque no existen prácticamente variaciones de desplazamiento, como se observa en la Figura 37. En el caso del Tb(III), el espectro de excitación no coincide totalmente con el ultravioleta, se observa una baja intensidad de emisión y esta parece provenir de la excitación directa del Tb(III) puesto que la longitud de onda corresponde a un valor demasiado bajo (286 nm) para el complejo.

<sup>136</sup> A. Prasanna de Silva, D.B. Fox, T.S. Moody, S.M. Weir, *Pure Appl. Chem.*, **2001**, 73, 503.

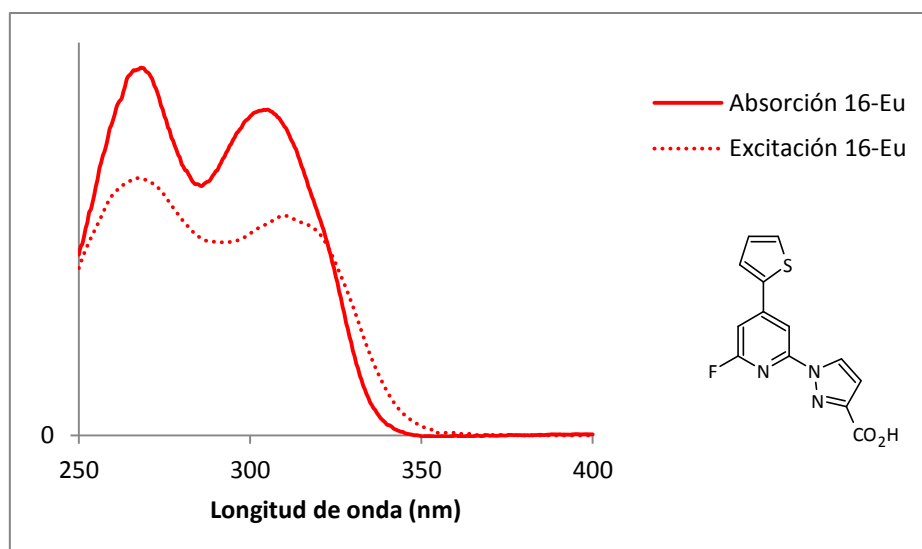


Figura 37.- Espectros de absorción y de excitación para el ligando **16** con Eu(III)

En el caso del último de los ligandos monopirazólicos (**18**), los espectros de ultravioleta no tienen correspondencia con los espectros de excitación obtenidos y éstos, además, son muy diferentes entre sí para el Eu(III) y el Tb(III). En el caso del Tb(III), la emisión observada es muy intensa aunque su espectro de excitación claramente podría deberse a la excitación directa del ion. En el caso del Eu(III) aparece un máximo de excitación a 347 nm que no es posible justificar a la vista del su espectro de absorción. La formación de complejos con estequiometría más compleja o la existencia del grupo amino que antes se había propuesto como responsable de fenómenos de tipo PET podrían estar detrás de este tipo de comportamiento anómalo.

A la vista los resultados obtenidos se puede concluir que el grupo fenilo, ya sea sin sustituyentes como en **9** o con un sustituyente isotiocianato (**14**) es el mejor de todos, resultando también especialmente interesante el sustituyente tienilo (**16**) para la sensibilización del Eu(III). En la Tabla 8 se recogen los resultados relativos a los complejos formados con los ligandos anteriores.

	INTENSIDAD DE EMISIÓN (u.a.)					
	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>18</b>
<b>Eu(III)</b>	99,5	116,0	12,3	11,9	40,6	56,2
<b>Tb(III)</b>	477,4	30,0	17,0	478,1	15,2	726,0

Tabla 8.- Intensidades de los complejos de Eu(III) y Tb(III)

#### 4.1.2. Ligandos monoindazólicos

Los ligandos de la familia de los monoindazoles que se estudian mediante esta metodología se muestran en la Figura 38.

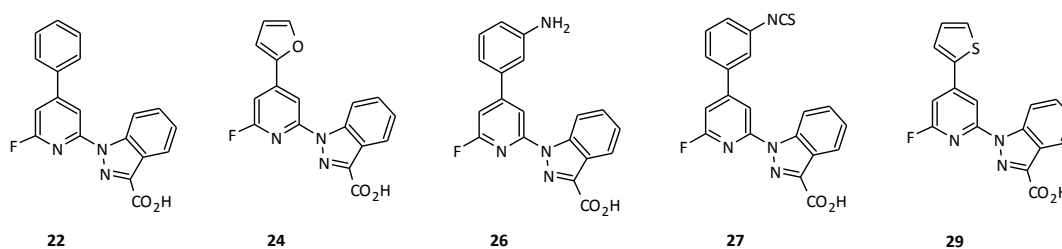


Figura 38.- Ligandos monoindazólicos estudiados mediante la complejación con triflatos

Como característica más reseñable de esta familia respecto de los sistemas pirazólicos es el desplazamiento del máximo de absorción de más baja energía a longitudes de onda más altas, desde  $\approx 300$  a 320-330 nm, lo que los hace especialmente interesantes en su aplicación ya que el desplazamiento a mayores longitudes de onda abarata el equipamiento para llevar a cabo el análisis al evitar fuentes de excitación y accesorios necesarios cuando se trabaja en el rango ultravioleta. En la Tabla 9 se recogen los datos de emisión de los complejos estudiados.

	INTENSIDAD DE EMISIÓN (u.a.)				
	22	24	26	27	29
Eu(III)	8	58	474	17	20
Tb(III)	124	365	425	736	351

Tabla 9.- Intensidades de los complejos de Eu(III) y Tb(III)

En el caso de **22** los espectros de emisión son intensos para el Tb(III) siendo los espectros de excitación concordantes con sus correspondientes de absorción (Figura 39).

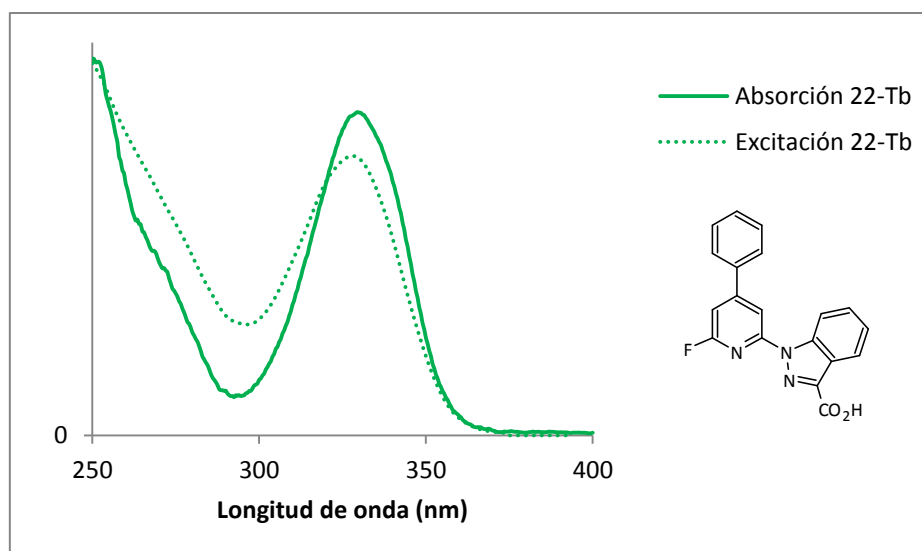


Figura 39.- Espectros de absorción y de excitación para el ligando **22** con Tb(III)

En el caso del ligando **24** el comportamiento es similar al caso anterior, siendo mejor sensibilizador también para el ion Tb(III) con una intensidad tres veces superior al derivado que presenta el sustituyente fenilo.

El ligando **26** muestra nuevamente un comportamiento similar en cuanto a la coincidencia entre el espectro de ultravioleta y de excitación pero en este caso, a diferencia del derivado monopirazólico, no se observa extinción de la emisión por el grupo  $-NH_2$ , siendo en esta ocasión especialmente intensa la emisión de ambos complejos, Eu(III) y Tb(III) superando el primero a la emitida por el Tb(III). Resulta significativa la diferencia observada entre estos complejos y sus equivalentes con el anillo de pirazol en lugar de indazol. La diferencia podría justificarse por los niveles excitados de ambos ligandos/complejos que se traduce, como se ha visto, en un desplazamiento de sus máximos de absorción/excitación hacia el rojo al pasar del pirazol al indazol. Estos diferentes niveles de energía serían los responsables de que la transferencia electrónica fotoinducida pueda ocurrir hacia el ligando pirazol pero esta desactivación de producirse en el caso del ligando indazólico, no se daría con tanta eficacia lo que provoca la emisión de ambos complejos.

Para el caso del ligando **27** el comportamiento en ultravioleta y en excitación es de nuevo similar. Los espectros de emisión de Eu(III) y Tb(III) son sin embargo de muy distinta intensidad, la excelente emisión de Eu(III) observada en el caso del amino derivado se extingue prácticamente en el caso de la presencia del grupo  $-NCS$  (de  $\approx 500$  a 18 u.a.), mientras que en el caso del Tb(III) se duplica la intensidad (de 400 a 800 u.a.).

Finalmente, el sustituyente tienilo (**29**) sigue el mismo patrón de comportamiento observado en el resto de la serie, con espectros coherentes con la excitación sobre el ligando, longitudes de onda de excitación alrededor de 328 nm y una intensidad mucho mayor para el complejo de Tb(III).

A la vista los resultados para estos ligandos indazólicos se puede concluir que este anillo favorece la estabilidad de los complejos en disolución y altera notablemente los niveles de energía como se comprueba por la ausencia de efecto PET para el complejo con el ligando amino (**26**), que se convierte en contraste con los ligandos monopirazólicos en el mejor de la serie, tanto para Eu(III) como para Tb(III). Sin embargo y desde el punto de vista del producto que podría emplearse para la conjugación sobre oligonucleótidos el compuesto (**27**) muestra un excelente comportamiento para Tb(III), siendo el mejor entre los ligandos de esta serie.

#### 4.1.3. Ligandos iminodiacético

Una vez estudiados los ligandos monopirazólicos y monoindazólicos, se estudian los ligandos con restos iminodiacético, con el fin de continuar con el estudio comparativo de sus homólogos y comprobar si siguen el mismo comportamiento tanto a nivel de sustituyente como de intensidad de emisión.

Los ligandos de la familia de los iminodiacéticos que se estudian mediante esta metodología se muestran en la Figura 40.

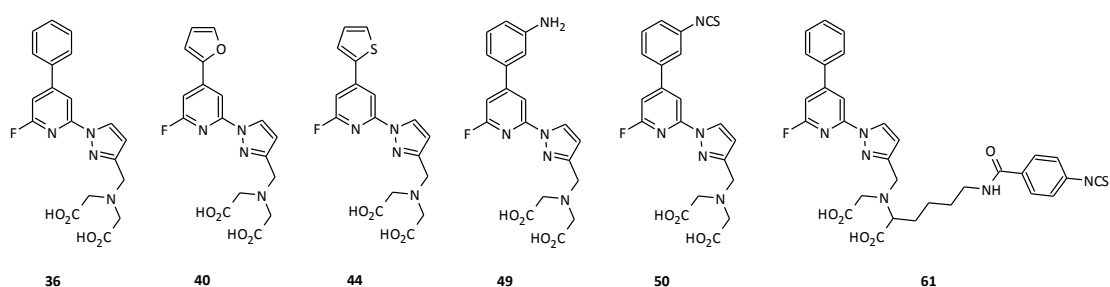


Figura 40.- Ligandos monopirazólicos con restos iminodiacéticos estudiados mediante la complejación con triflatos

Esta familia de compuestos comparte el anillo de pirazol unido al de piridina, sin embargo, el grupo carboxilato es ahora un diácido derivado del iminodiacético. La estequiometría de los complejos formados no tiene porqué ser la misma que en el

resto de los derivados monoácido discutidos hasta el momento, sin embargo, y con el fin de establecer las mismas condiciones y poder comparar resultados, los complejos se hacen también con una relación ligando/metal (3:1).

Los espectros de ultravioleta de todos los complejos formados son muy similares para ambos lantánidos, Eu(III) y Tb(III), sin embargo, éstos difieren notablemente de sus espectros de excitación, en los que los máximos de excitación observados aparecen a longitudes de onda superiores a los máximos de absorción de los complejos (ver ejemplo del ligando **40** en la Figura 41). Como se ha discutido en alguno de los casos anteriores para los complejos con monoácidos, la disolución de los complejos estudiados posee un porcentaje de ligando libre sin complejar que domina su espectro de absorción, aunque en el espectro de fosforescencia si se observa la emisión del lantánido provocada por la excitación del ligando. La existencia de complejos de estequiometrias variables o complejos polinucleares podría estar en el origen de este comportamiento aunque, como se ha mencionado, los datos presentados aun desconociendo la estequiometria, se espera que sirvan para evaluar que ligandos pueden resultar mejores para su posible aplicación final.

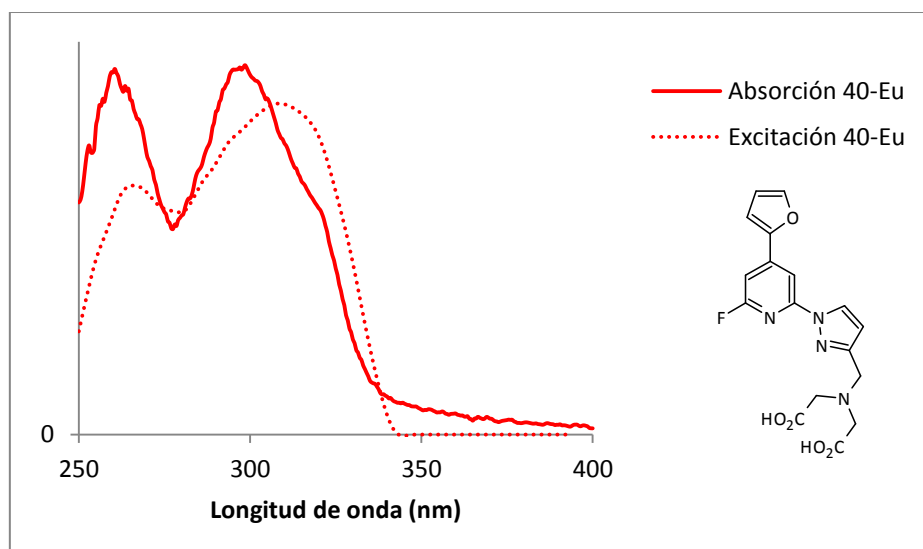


Figura 41.- Espectros de absorción y de excitación para el ligando **40** con Eu(III)

Todos los complejos muestran máximos de excitación en el entorno de los 300-315 nm, como corresponde y se había observado en los ligandos con un anillo de pirazol. Las intensidades de emisión observadas para los complejos de Eu(III) y Tb(III) se muestran en la Tabla 10.



	INTENSIDAD DE EMISIÓN (u.a.)					
	36	40	44	49	50	61
Eu(III)	284	57	449	12	91	210
Tb(III)	671	2,5	20	10	-----*	191

\* Los primeros ensayos de hibridación se han realizado con Eu(III) y en el caso de este compuesto no hay datos recogidos sobre su complejo de Tb(III).

*Tabla 10.- Intensidades de los complejos de Eu(III) y Tb(III)*

De nuevo, al igual de lo que ocurría en el caso de ligando pirazólico monoácido, el ligando 3-aminofenil sustituido **49** no presenta buena sensibilización del lantánido, lo que varía cuando el grupo se transforma en isotiocianato en el que la intensidad se recupera en el complejo de Eu(III) estudiado. Este fenómeno, justificado como un efecto de desactivación de tipo PET, contrasta con el hecho de que este fenómeno no se produce al variar el anillo de pirazol por indazol, en el que el nivel excitado del ligando no resulta tan accesible a la cesión electrónica por parte del grupo amino.

De los ligandos estudiados el sustituyente que presenta mejores resultados es el fenil sustituido (**36**) y es coincidente con los resultados obtenidos para su homólogo monoácido proporcionando una buena emisión para ambos lantánidos, el sustituyente tienilo (**44**) de nuevo presenta mejor sensibilización para el caso del Eu(III), resultado que de nuevo parece también corroborarse para el sustituyente furano en el que en ambos casos resulta mejor para el Eu(III).

En el caso de los productos con grupos –NCS, que podrían ser ensayados directamente en reacciones de hibridación, ambos dan buenas emisiones para el caso de Eu(III) y en el caso del ligando **61**, con un resto amino modificado para dotarlo de un punto de anclaje sobre el oligonucleótido, también presenta buenos resultados para Tb(III). Resulta interesante destacar que la emisión sensibilizada por el grupo fenilo en **36** (284 u.a.), se mantiene en unos márgenes aceptables cuando la modificación estructural para disponer de un grupo –NCS se dispone alejada del cromóforo **61** (219 u.a.), mientras que la introducción del grupo isotiocianato sobre el grupo fenilo del cromóforo **50** (91 u.a.), tiene un efecto electrónico sobre los niveles de energía lo que se traduce en una variación significativa, a la baja, en su capacidad sensibilizadora. Esta observación confirma que los presentes estudios tienen interés a nivel comparativo pero no permiten evaluar la que será la respuesta en el sistema definitivo, en el que hay que tener en cuenta que el grupo finalmente unido al sistema cromofórico será el grupo tiourea.

A modo de resumen general y a la vista de estos resultados obtenidos con los complejos formados con los triflatos de lantánidos y los estudios de emisión realizados

en acetonitrilo, los datos apuntan que los mejores sustituyentes para la sensibilización, tanto de Eu(III) como de Tb(III), son el grupo fenilo y el tienilo.

Sin embargo, estos estudios del sistema ligando/triflato de lantánido en acetonitrilo se alejan mucho de lo que será finalmente el ensayo biológico, tanto en medio, como en la estequiometría de los complejos. La utilidad del estudio apunta, como se ha comentado, a ciertos sustituyentes como más efectivos; sin embargo, se estudian y presentan a continuación otros métodos que pretenden aproximarse al estudio de los complejos en condiciones más similares al que será el sistema real, disolventes práticos como el agua o etanol y complejos de lantánido ya formados con ligandos coordinantes, más similares a lo que sería el complejo ICC-Ln(III), no coordinativamente saturados.

#### 4.2. Estudio de complejación mediante formación de complejos ternarios

El complejo ICC que se empleará en el sistema biológico como portador del ion lantánido y que no es fluorescente se recoge en la Figura 42.

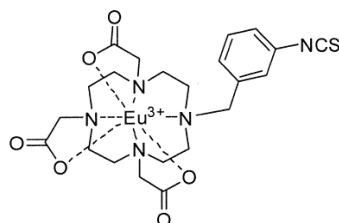


Figura 42.- Estructura del Complejo portador del lantánido (ICC)

Este compuesto cumple con los requisitos de no ser fluorescente, tener una estabilidad cinética razonable de sus complejos de lantánidos y no saturar la esfera de coordinación en torno al ion. De las pruebas realizadas en el proyecto ha sido el que mejores resultados ha dado en su conjugación sobre oligonucleótidos y el que, unido a los correspondientes oligonucleótidos, se empleará en los ensayos de hibridación del proyecto ACUSEP.

La generación y estudio de complejos ternarios de lantánidos con dos ligandos distintos y complementarios no es muy abundante en la bibliografía. Un primer ejemplo de este tipo de sistema se describió para la determinación de derivados fenólicos como el ácido salicílico y sulfosalicílico<sup>137</sup> y a partir de éste, se desarrolló un método para la determinación de salicilato en plasma basado en su complejo ternario con Tb(III) y EDTA.<sup>138</sup> El diflusinal también forma complejos ternarios luminiscentes con Tb(III) y EDTA y ha sido aplicado para el desarrollo de inmunoensayos muy sensibles basados en amplificación enzimática con lantánidos,<sup>139</sup> y en su determinación en suero u orina.<sup>140</sup> Este sistema también se ha descrito para un ensayo inmunológico de la  $\alpha$ -fetoproteína.<sup>141</sup>

Peter G. Sammes y cols. fueron los primeros en introducir el concepto de ligando "apantallante" para la sensibilización del Eu(III) en solución acuosa mediante la cooperación de un ligando apantallante y otro sensibilizador en un nuevo sistema homogéneo.<sup>142</sup> El sistema se basaba en un ligando apantallante como el EDTA o el (1,7-diaza-4,10,13-trioxaciclohexadecano-1,7-diacetato) y ligandos sensibilizadores derivados de fenantrolina (Figura 43).

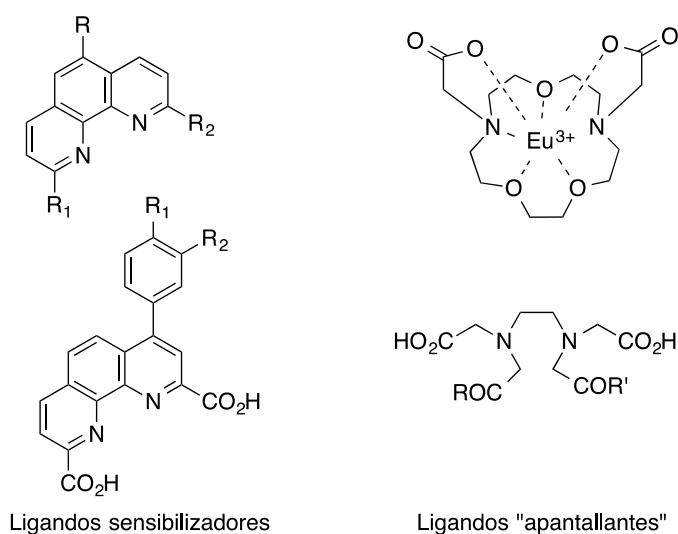


Figura 43.- Sistema de sensibilización de lantánidos basado en complejos ternarios entre dos ligandos diferentes (Sammes y cols.)

<sup>137</sup> a) N.S. Poluektov, L.A. Alakaeva, M.A. Tischenco, *Zh. Anal. Khim.*, **1973**, 28, 1621. b) R.M. Dagnall, R. Smith, T.S. West, *Analyst*, **1967**, 92, 358.

<sup>138</sup> M.P. Bailey, B.F. Rocks, *Anal. Chim. Acta*, **1987**, 201, 335.

<sup>139</sup> H. Yu and E.P. Diamandis, *Clin. Chem.*, **1993**, 39, 2108.

<sup>140</sup> P.C. Ioannou, E.S. Lianidou y D.G. Konstantinos, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 300, 237.

<sup>141</sup> C.J. Veiopoulou, E.S. Lianidou, P.C. Ioannou y C.E. Efstathiou, *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 335, 177.

<sup>142</sup> J. Coates, P.G. Sammes y R.M. West, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1996**, 1283.

Muy recientemente, Harry B. Gray describe una metodología basada en la misma idea, pero mediante la formación de complejos de lantánidos con éteres corona<sup>143</sup> con los que desarrolla detección de esporas bacterianas mediante el empleo de ácido dipicolínico (DPA).<sup>144</sup> La Figura 44 muestra el complejo caracterizado y empleado en este tipo de estudios.

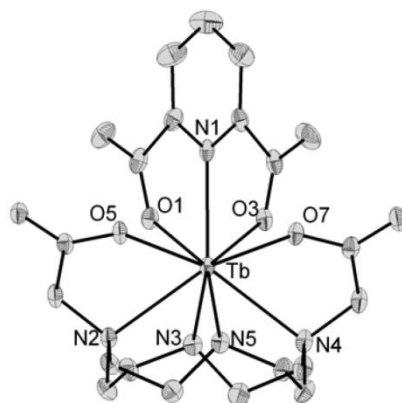


Figura 44.- Estructura del complejo ternario con éteres corona descrito por Gray y cols.

A la vista de estos antecedentes, a continuación se presentan los resultados de los diferentes métodos ensayados y que se basan en la formación de complejos ternarios en los que se usan como ligandos “apantallantes” derivados de poliazacoronas con restos de ácidos carboxílicos, estructuras quelantes de EDTA y por último éteres corona.

#### 4.2.1. Complejos ternarios con poliazacoronas DO<sub>2</sub>A y DO<sub>3</sub>A

Habida cuenta de la estructura macrocíclica de la Figura 42 empleada para el desarrollo del método de hibridación, se desarrolla un método similar al descrito por Sammes con la introducción de un ligando macrocíclico apantallante sobre la base de la tetraazacorona recogida en la Figura 45.

<sup>143</sup> J.P. Kirby, M.L. Cable, D.L. Levine, H.B. Gray y A. Ponce, *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, 5750.

<sup>144</sup> a) M.L. Cable, J.P. Kirby, K. Sorasaene, H.B. Gray y A. Ponce, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 1474; b) M.L. Cable, J.P. Kirby, D.J. Levine, M.J. Manary, H.B. Gray, A. Ponce, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 9562.

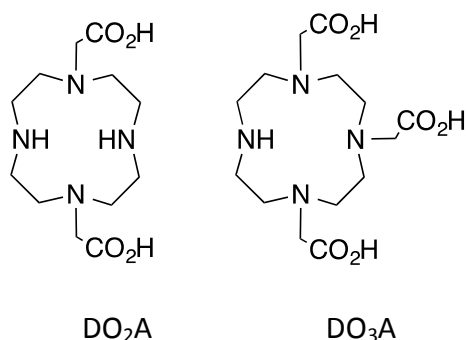
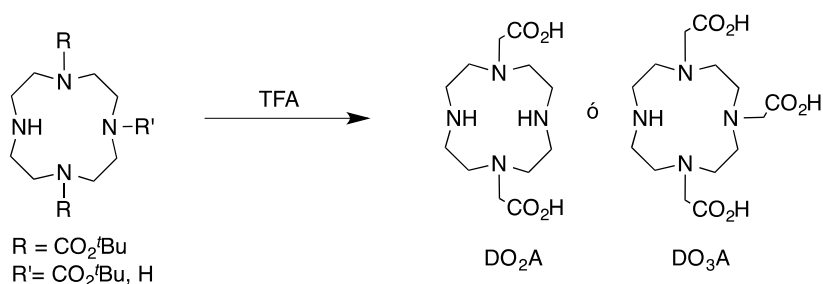


Figura 45.- Estructuras derivadas de 1,4,7,10-tetraazaciclododecano empleadas en el estudio

Los macrociclos utilizados son el DO<sub>3</sub>A, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético y DO<sub>2</sub>A, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,7-diacético. Estos macrociclos cumplen los requisitos básicos para un ligando receptor puesto que i) la cantidad de DO<sub>n</sub>A en concentraciones micromolares es próxima a la unidad, ii) tienen puntos adyacentes abiertos para la coordinación que no inhiben a los ligandos objeto de estudio, iii) los DO<sub>n</sub>A pueden ser modificados químicamente con diversos grupos para desarrollar nuevas estructuras e incorporar polímeros, y iv) los complejos formados con ellos eliminan la acción desactivante del agua sobre la luminiscencia.

Los macrociclos comercialmente disponibles son los derivados del DO<sub>3</sub>A (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacetato de *tert*-butilo) y del DO<sub>2</sub>A (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,7-diacetato de *tert*-butilo). La ruptura en medio ácido de sus esteres da lugar a los ácidos carboxílicos (Esquema 53).<sup>145</sup>



Esquema 53

La formación de los complejos se lleva a cabo mediante el procedimiento seguido por Kirby y cols.<sup>143</sup> en el que inicialmente se prepara una disolución de LnCl<sub>3</sub> y DO<sub>n</sub>A (1:1) en agua a pH a 6 que se consigue mediante la adición de hidróxido de tetrabutilamonio

<sup>145</sup> J. Huskens, *J. Inorg. Chem.*, **1997**, *36*, 1495.

(TBAOH). A continuación se añade el ligando (equimolar) disuelto en agua y se ajusta el pH a 8 con TBAOH. Los ligandos inicialmente estudiados se muestran en la Figura 46.

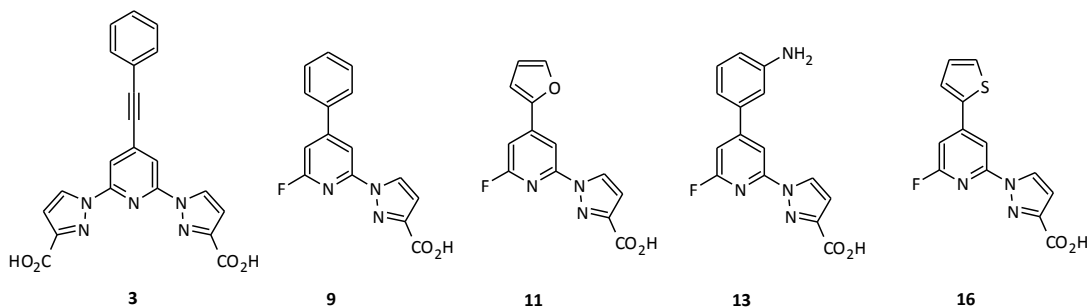


Figura 46.- Ligandos estudiados mediante la complejación con  $DO_{nA}$

En primer lugar se estudiaron los complejos formados con el macrociclo  $DO_3A$  por ser el más similar al ICC empleado para la conjugación de oligonucleótidos y que también presenta tres ácidos carboxílicos que intervienen en la coordinación y formación del quelato.

Los espectros de ultravioleta de los complejos preparados no muestran desplazamientos significativos de los máximos de longitud de onda correspondientes al cromóforo antena con respecto a los del ligando libre.

Estos resultados pueden indicar la no formación de los complejos o que en caso de producirse esta complejación, no se altera significativamente la disposición electrónica del ligando antena. Para confirmar estos resultados, se lleva a cabo el estudio de espectrofotometría de emisión.

A excepción del ligando bipirazólico (**3**), en ningún caso se observa la formación del complejo con Tb(III). En el caso de los complejos con Eu(III), las intensidades observadas son bajas en todos los casos y para el complejo con **13** la longitud de onda de excitación principal no corresponde ninguna absorción significativa del complejo, aparece situada a un valor que no es propio de los pirazoles (273 nm) por lo que en este caso tampoco se produce la complejación esperada con Eu(III).

A la vista de los resultados obtenidos, una explicación a este comportamiento podría ser que o bien el complejo  $Ln(III)DO_3A$  formado no muestra, en las condiciones de complejación ensayadas, posiciones de coordinación accesibles para la complejación del lantánido con los ligandos ensayados o que, como en el caso del ligando bipirazólico diácido **13**, la emisión observada corresponde a un complejo con este ligando en el que se habría producido un intercambio del Eu(III) entre ambos ligandos.

A la vista de estos resultados y teniendo en cuenta los resultados positivos obtenidos por Sammes con ligandos “apantallantes” basados en diazacoronas con dos ácidos carboxílicos, se intenta optimizar el método mediante un cambio de macrociclo, con un menor número de brazos quelantes, con el fin de disminuir la afinidad entre la azacorona y el lantánido, aumentando la accesibilidad del ligando antena y mejorar la estabilidad de los complejos que se forman. El macrociclo empleado es el DO<sub>2</sub>A (Figura 45) que presenta dos ácidos carboxílicos que intervienen en la coordinación y formación del quelato.

Este estudio se lleva a cabo con los ligandos **3**, **9** y **11** con el fin de comprobar si se produce una mejora en el método y se puede ampliar al resto de ligandos sintetizados.

En los espectros de absorción de los complejos tampoco, en esta ocasión, existe un cambio en los máximos de longitud de onda con respecto a los ligandos libres.

Para todos los complejos de estos ligandos la intensidad de emisión es muy baja respecto a la observada en el método anterior para los mismos ligandos. Solamente en el caso del ligando **3** se observa emisión significativa para su complejo de Eu(III), sin embargo, el máximo de excitación aparece a una longitud de onda anormalmente elevada (343 nm) si se compara con los máximos de absorción de los complejos de Eu(III) y Tb(III) y el de excitación de éste último (304 nm), por lo que no es posible asegurar que la emisión observada provenga de la simple excitación del ligando.

Los complejos con el ligando **9**, muestran espectros de emisión para ambos lantánidos pero su intensidad es muy baja, lo que parece indicar que los complejos se forman en muy baja concentración y la estabilidad conseguida en estas condiciones no es lo suficientemente elevada.

Para el último de los ligandos estudiados mediante este método (**11**), no se observa emisión de Eu(III) o Tb(III), lo que parece confirmar la baja estabilidad de los complejos obtenidos mediante este método.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Sammes para sistemas basados en el mismo principio, aunque ni el tamaño de la corona ni sus átomos donadores son los mismos. Además el sistema cromóforo empleado en su caso son derivados diácido de 1,9-dicarboxifenantrolinas, cuya disposición de los carboxilos y grupos coordinantes nitrogenados hacen que la disposición de estos grupos sea probablemente más favorable a la generación de los complejos ternarios.

A la vista de los resultados obtenidos mediante este método de formación de complejos con los macrociclos DO<sub>n</sub>A, se pone de manifiesto la dificultad para formar y estudiar estos modelos de interacción lantánido/antena en medio acuoso, ya que los resultados son muy variables ya sea por la baja emisión observada resultado de la ausencia de complejos o por la inestabilidad de los mismos.

Estos resultados contrastan con los llevados a cabo en los sistemas biológicos mediante el concepto de la aproximación para formar el quelato luminiscente entre antena e ICC. En las pruebas de concepto llevadas a cabo y que se presentarán en el siguiente capítulo de esta memoria, el anclaje de la antena y el ICC a sus correspondientes oligonucleótidos provoca la aproximación de los mismos mediante el oligonucleótido complementario a ambos, lo que favorece la interacción entre ambos fragmentos y desencadena el mecanismo de sensibilización luminiscente.

En los modelos de complejación ensayados hasta aquí, la formación del complejo se debe de producir por interacción directa entre el ligando y el lantánido y no dirigida por ningún efector externo, como es el caso de la interacción de bases nucleicas. En estas condiciones y a la concentración a la que se estudian estas interacciones, la afinidad entre ambas especies, antena e ICC, no es suficiente para vencer los factores entrópicos en las disoluciones empleadas.

A la vista de estos resultados se plantea seguir con las diferentes aproximaciones de complejos ternarios descritas en la literatura que permiten una interacción más eficaz entre lantánido y ligando (ver discusión pag. 138-139).

La siguiente aproximación llevada a cabo se basa en el empleo del lantánido en forma de complejos con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

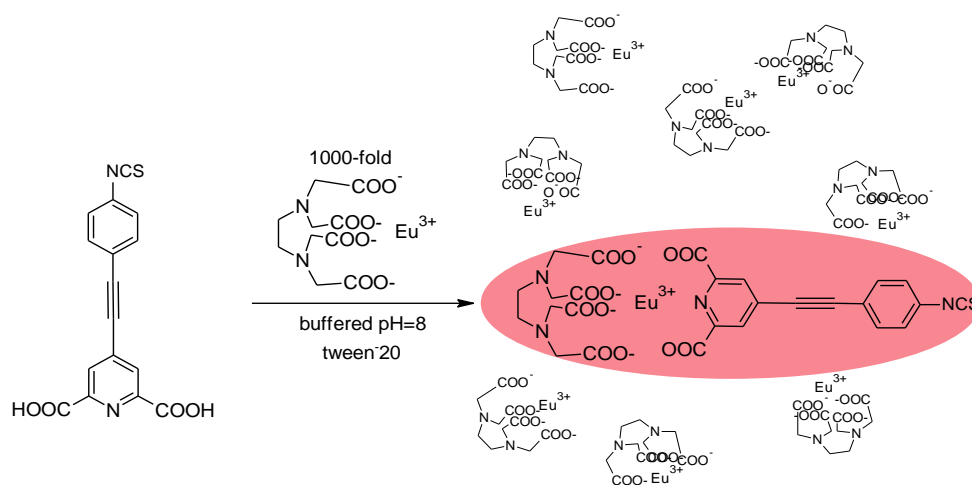
#### 4.2.2. Complejos ternarios con EDTA

Los resultados obtenidos en el estudio de los complejos formados con triflatos de lantánidos muestran que no en todos los casos se forman los complejos y que, o bien la formación de los mismos no es total en todos los casos o que la estequiometría buscada (ligando:lantánido, 3:1) no siempre se consigue. A la vista de estos resultados y ante el distinto comportamiento de los diferentes ligandos estudiados, se hace necesaria la puesta a punto de un método para el estudio sistemático de las propiedades de sensibilización del cada vez más numeroso grupo de ligandos sintetizados, ya que no es viable la derivatización de todos ellos y su estudio de marcaje sobre secuencias de oligonucleótidos y posterior hibridación. En este sentido se trata de desarrollar un método sencillo y rápido para la evaluación de los procesos de transferencia de energía.

Se expone a continuación la segunda de las aproximaciones llevadas a cabo y que, intentando imitar lo que sería el sistema ternario (ICC/Ln/AL) cuya prueba de concepto se persigue en el análisis de secuencias de oligonucleótidos, consiste en la utilización de un buen complejante de lantánidos como es el ácido etilendiaminotetraacético



(EDTA) en su forma de quelato y como portador del ion lantánido en la emisión sensibilizada por el ligando antena según se expone en el Esquema 54.



Esquema 54

El fenómeno de la luminiscencia de lantánidos sensibilizada por un cromóforo depende de la energía intercambiada entre el ligando y el ion, lo cual depende a su vez de la energía del gap entre el estado triplete más bajo del ligando y el nivel emisor del ion.<sup>146</sup> El nivel del estado triplete del ligando debe encontrarse no muy por encima del nivel emisor del ion, de lo contrario una alta energía del gap hace que disminuya la superposición entre el espectro del donador y del aceptor.<sup>147</sup> En ocasiones la presencia de agentes sinérgicos, como surfactantes que protejan el sistema complejante de su entorno o coligandos como el óxido de trioctilfosfina (TOPO) que contribuye a completar la esfera de coordinación del ion central, pueden cambiar significativamente las propiedades luminiscentes del complejo ternario puesto que, los procesos de transferencia de energía pueden ser más eficientes cuando el estado triplete del coligando se encuentra entre el estado triplete de absorción del ligando y el nivel de resonancia del ion.<sup>148</sup>

Estos requisitos pueden favorecerse usando ligandos fuertes, que protejan al complejo de las degradaciones de energía, y agentes sinérgicos adecuados que puedan favorecer la formación<sup>149</sup> y protección de los complejos.<sup>150</sup> Los agentes sinérgicos más usados son surfactantes como el Tween-20 y TOPO.<sup>151</sup>

<sup>146</sup> S. Sato, M. Wada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1970**, *43*, 1955.

<sup>147</sup> N. Arnaud, E. Vaquer, J. Georges, *Analyst*, **1998**, *123*, 261.

<sup>148</sup> B. Yan, H.J. Zhang, S.B. Wang, J.Z. Ni, *J. Photochem. Photobiol. A*, **1998**, *116*, 209.

<sup>149</sup> R. Brennetot, J. Georges, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2000**, *56*, 703.

A la vista de que el uso del EDTA parece ser útil para crear una esfera de coordinación óptima y que favorece la estabilidad de los complejos formados, en este nuevo método se emplea este coligando para llevar a cabo el estudio de los ligandos sintetizados.

Este método surge a partir de provechosas discusiones con uno de los grupos participantes del proyecto europeo ACUSEP, dentro del cual se enmarca el presente trabajo. Los resultados llevados a cabo en colaboración con el Grupo de Bioquímica de la Universidad de Turku (Finlandia), responsable entre otras tareas de la selección de secuencias de ADN bacteriano y la puesta a punto de los métodos de conjugación e hibridación de oligonucleótidos, se basan en una comparación con un ligando de referencia empleado para el marcaje de oligonucleótidos con el ion Europeo y que está basado en un derivado ya conocido del ácido dipicolínico (DPA).

En una primera aproximación se desarrolla un método que emplea como medio un tampón de Tris (pH = 8), al que se le añade Tween-20 (agente surfactante). El coligando Ln(III)-EDTA (50 mM) se prepara disolviendo Ln(III)Cl<sub>3</sub> y EDTA en agua en una proporción 1:1, mientras que la antena se disuelve en una pequeña cantidad de DMF y se diluye hasta la concentración final en el tampón. Una vez preparadas las disoluciones, se realizan las mezclas de Ln(III)-EDTA y ligando antena para obtener diversas proporciones con el fin de comparar el comportamiento de los ligandos en diferentes relaciones de concentración relativa Ln(EDTA) / AL. La concentración inicialmente propuesta fue una relación AL /Eu(EDTA) 1:1000, con la que se pretende aumentar la señal sensibilizada por el ligando antena aumentando la probabilidad de encuentro entre ambas unidades dado el desfavorable medio acuoso en el que se realizan las medidas (Esquema 54).

Los resultados obtenidos para este ligando de referencia se recogen en la Tabla 11 y cuyas condiciones se expresan como relación de equivalentes AL:Ln.

	INTENSIDAD ( $\lambda_{exc} = 330 \text{ nm}$ )				
	CONDICIONES INICIALES		NUEVAS CONDICIONES		
	1:1	1:1000	1:100	1:2500	1:5000
<b>Eu(III)</b>	-----*	54,5	6,1	129,4	652,1
<b>Tb(III)</b>	-----*	0,5*	-----*	-----*	-----*

\* No se observan señales o son muy débiles sobre el ruido de fondo del instrumento

Tabla 11.- Resultados obtenidos para el ligando de referencia

<sup>150</sup> G.A. Crosby, *Mol. Cryst.*, **1966**, 1, 37.

<sup>151</sup> a) N. Arnaud, J. Georges, *Analyst*, **1999**, 124, 1075. b) N. Arnaud, J. Georges, *Analyst*, **2000**, 125, 1487.

En las condiciones inicialmente propuestas (relación 1:1000), se observa emisión tanto con Eu(III) como con Tb(III), pero las intensidades obtenidas presentan valores muy bajos, sobre todo en el caso del Tb(III). Hay que señalar que el ligando de referencia posee muy bajas capacidades de sensibilización para el terbio, como así se ha comprobado en numerosos derivados de ácidos dipicolínicos.

Con el fin de intentar mejorar el método, y sabiendo que es necesario un exceso de lantánido, se realiza un estudio consistente en la variación de las concentraciones para encontrar aquella que da lugar a una mayor intensidad de emisión.

En la tabla anterior también se muestran los resultados para las distintas concentraciones ensayadas (nuevas condiciones). Se observa que la mayor intensidad se obtiene cuando la concentración de lantánido usada es 5000 veces mayor (5 mM) para el caso del Eu(III), mientras que para el Tb(III) no se obtiene emisión a prácticamente ninguna de ellas por lo que se puede concluir que: i) la concentración óptima mediante la cual se obtiene la máxima emisión es 5 mM de Ln(III)-EDTA y ii) este ligando de referencia no sensibiliza la emisión de Tb(III).

Una vez optimizado el método se lleva a cabo el estudio con los otros ligandos propuestos (Figura 47).

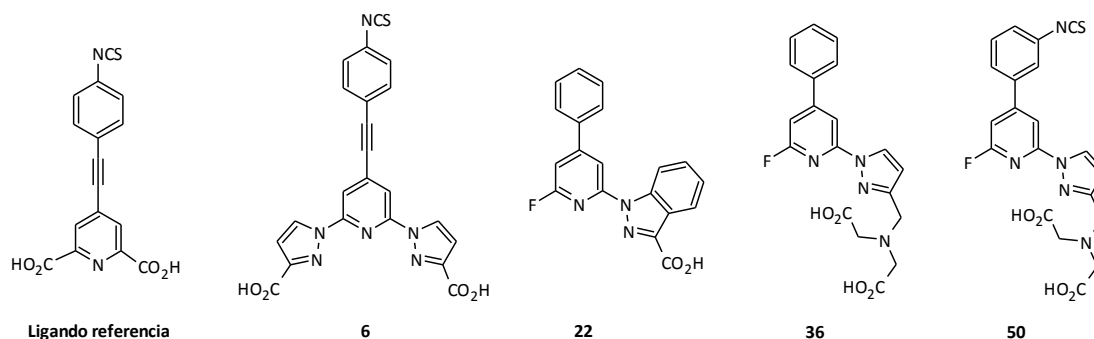


Figura 47

En la Tabla 12 se muestran los resultados de los complejos con Eu(III) mientras que para los correspondientes complejos con Tb(III) no es posible observarlos por esta metodología. El gran exceso de Tb(EDTA) empleado produce una señal de fondo de este complejo que se solapa con la obtenida por excitación del ligando empleado, dando resultados poco consistentes cuando se corrigen los espectros respecto a la emisión del blanco. En el caso del Eu(EDTA) la emisión de este complejo es muy inferior y la resta del blanco da como resultado señales significativas.

		INTENSIDAD DE LOS COMPLEJOS (ratio 1:5000)				
		Ligando referencia	6	22	36	50
Eu-EDTA	652,1	-----*	43,1	20,7	1,5	
Tb-EDTA	-----*	0,2	2,8	6,7	-----*	

\* No se observan señales o son muy débiles sobre el ruido de fondo del instrumento

Tabla 12.- Resultados de los complejos con Eu(III) y Tb(III)

En la tabla puede observarse una emisión significativa para los ligandos **22** y **36** aunque notablemente inferior que para el **ligando de referencia**. En el caso de los ligandos **6** y **50** los valores son prácticamente nulos. El único punto común de ambos es el de tratarse de isotiocianatos; los ligandos **36** y **50** son muy similares con grupos iminodiacético siendo el primero de ellos **36** el que mejor emisión presenta. En el caso de **6**, la disposición de los grupos carboxilato podría no ser la adecuada para la aproximación y complejación eficaz sobre el complejo Eu(EDTA).

Ambos isotiocianatos (**6** y **50**) fueron conjugados sobre oligonucleótidos y comprobada su eficacia, como se discutirá en el capítulo 5. Los resultados muestran, a pesar de los datos descritos aquí, valores positivos de detección en el sistema de hibridación sobre las sondas de oligonucleótidos marcados con estos productos.

A la vista de los resultados obtenidos con este nuevo método, y comparándolos con los obtenidos en el estudio de los complejos con triflatos de Eu(III) y Tb(III) realizado en el capítulo 4.1. (página 129), mediante el cual sí que se buscaba la formación neta de los complejos en acetonitrilo, no se considera válido ninguno de ambos métodos para poder comparar las propiedades de los ligandos antena preparados, por lo que sigue considerándose prioritario la puesta a punto de un método de estudio similar al descrito (aproximación ICC/Ln/AL), que permita la complejación en medios acuosos donde se llevará a cabo la aplicación de estos productos mediante su marcaje en oligonucleótidos.

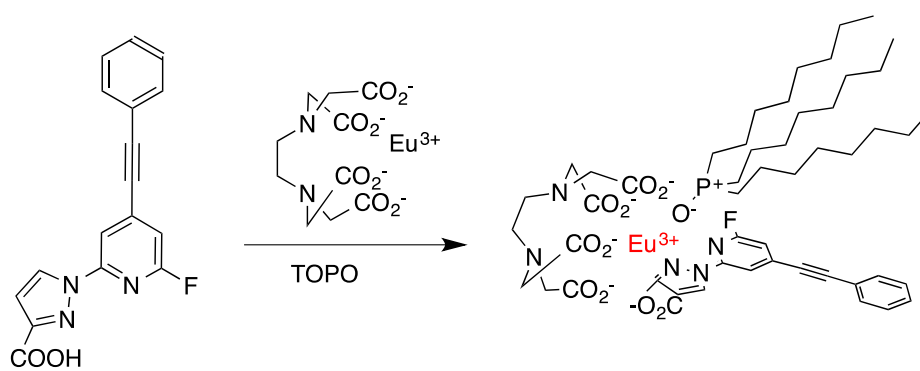
### Utilización de TOPO como agente sinérgico

Algunos lantánidos trivalentes son luminiscentes en disolución a temperatura ambiente cuando están presentes en forma de iones acuosos. Sin embargo, y como ya hemos visto, la luminiscencia en los complejos formados es muy débil por el acoplamiento vibracional de los iones excitados con los grupos –OH de las moléculas de agua de la primera esfera de coordinación,<sup>152,153</sup> proporcionando un patrón de desactivación no-radiativo.

<sup>152</sup> J.L. Kropp, M.W. Windsor, *J. Phys. Chem.*, **1967**, *71*, 477.

Una de las formas para solucionar este problema consiste en la formación de quelatos luminiscentes con ligandos orgánicos y el empleo adicional de un agente sinérgico. El uso de EDTA como quelato no luminiscente, ha resultado poco efectivo en el caso de los ligandos que se han estudiado mediante el último método como se ha indicado anteriormente.

El TOPO (óxido de trioctilfosfina) es un agente sinérgico capaz de completar la esfera de coordinación que presenta un oxígeno libre para la coordinación al ion y grupos octilo que, por su carácter hidrófobo, ayudan a mantener alejadas las moléculas de agua sobre la esfera de coordinación del lantánido<sup>154</sup> como se muestra en la Esquema 55.



Esquema 55

El método que se desarrolla y expone a continuación se basa en las técnicas de inmunoensayo con sondas de lantánidos no luminiscentes (DELFI).<sup>155</sup> Este método consiste en la utilización de una *solución de revelado*, que cuantifica la presencia del lantánido y por ende la del anticuerpo, que está formada por el ligando que actúa como sensibilizador de la luminiscencia del lantánido y por una base de Lewis o agente sinérgico (TOPO) que aísla al complejo de las moléculas de agua del medio.<sup>156</sup> Para que el método sea más efectivo, a esta *solución de revelado* se añade Tritón X-100 que actúa como surfactante con el fin de mejorar más aún el aislamiento del complejo formado de las moléculas de agua del medio.<sup>147,157</sup>

Para la puesta a punto del método, y dado que el efecto del TOPO varía en función del pH, es necesario en primer lugar determinar el pH óptimo para el estudio de los

<sup>153</sup> Y. Hass, G. Stein, *J. Phys. Chem.*, **1971**, *75*, 3668.

<sup>154</sup> F. Halverson, J.S. Brinen, J.R. Leto, *J. Phys. Chem.*, **1964**, *41*, 157.

<sup>155</sup> J.A. Keelan, J.T. France, P.M. Barling, *Clin. Chem.*, **1987**, *33*, 2292.

<sup>156</sup> F. Halverson, J.S. Brinen, J.R. Leto, *J. Phys. Chem.*, **1964**, *41*, 157.

<sup>157</sup> N. Arnaud, J. Georges, *J. Analyst*, **1997**, *122*, 143.

ligandos sintetizados en la relación 1:10 de ligando y Eu(EDTA). La preparación del tampón y de las disoluciones, se realiza siguiendo el método de Keelan y cols.<sup>158</sup> con los ligandos elegidos para realizar la primera optimización mostrados en la Figura 48 y que corresponden a un caso de cada grupo de ligandos en los que se podrían clasificar los ligandos preparados hasta el momento de la realización de este estudio (ligando de referencia, indazol y pirazol iminodiacético).

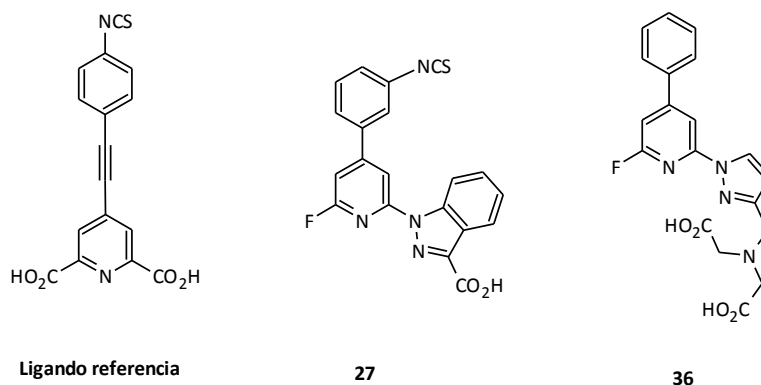


Figura 48.- Ligandos estudiados elegidos para la optimización del pH

Los resultados muestran que en las condiciones que describe Keelan (0,25 equivalentes de TOPO y exceso de 10 equivalentes de Eu(EDTA)), el pH en el que se observa la máxima emisión para los tres compuestos es 7,6, correspondiente a un tampón acetato, resultado lógico teniendo en cuenta que el tipo de ligando que se han sintetizado son ácidos carboxílicos.

Una vez determinado el pH para la formación de los complejos, la segunda aproximación consiste en estudiar la cantidad necesaria de TOPO para poder crear una esfera de coordinación adecuada para el aislamiento del ion lantánido.

Para la optimización del pH es indiferente el tipo de ligando y sustituyente elegido, pero para el caso del TOPO es importante que tengan alguna parte en común con el fin de poder realizar comparaciones del comportamiento ante unas condiciones determinadas. Por este motivo los ligandos que se han elegido tienen uno o dos carboxilatos en el anillo heteroaromático y están representados en la Figura 49.

<sup>158</sup> J.A. Keelan, J.T. France, P.M. Barling, *Clin. Chem.*, **1987**, *33*, 2292.

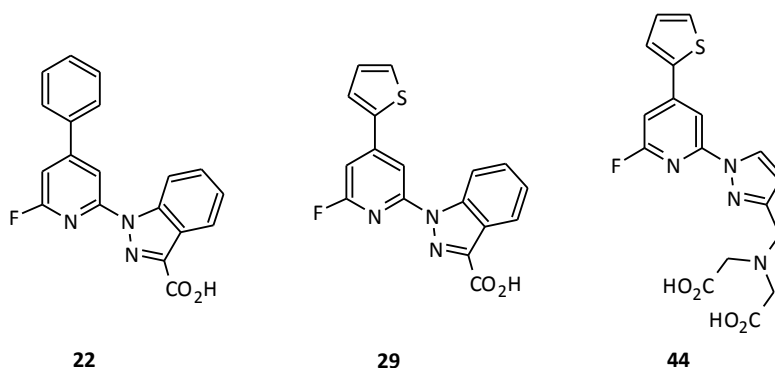


Figura 49.- Ligandos estudiados elegidos para la optimización de la cantidad de TOPO

La determinación de la cantidad de TOPO óptima se realiza mediante la variación en el número de equivalentes con respecto al ligando, con cantidades que oscilan desde los 0,1 equivalentes hasta los 2 equivalentes de TOPO como se muestra en la Tabla 13, manteniéndose el pH en el valor 7,6 y la cantidad de Eu(EDTA) en exceso con respecto al ligando.

	INTENSIDAD DE EMISIÓN (u.a.)						
	2 eq.	1,5 eq.	1,0 eq.	0,75 eq.	0,5 eq.	0,25 eq.	0,10 eq.
<b>22-Eu(EDTA)</b>	15,9	12,0	14,7	14,3	21,2	16,4	6,3
<b>29-Eu(EDTA)</b>	-----*	0,1	0,4	1,7	1,8	1,2	0,1
<b>44-Eu(EDTA)</b>	-----*	-----*	-----*	-----*	14,4	147,1	10,6

\* No se observan señales o son muy débiles sobre el ruido de fondo del instrumento

Tabla 13.- Resultados obtenidos mediante la variación de TOPO

En la tabla se puede observar como el efecto del TOPO es distinto en función de si el ligando estudiado es un mono (**22** y **29**) o un dicarboxilato (**44**). En el primero de los casos las intensidades de emisión más altas se obtienen empleando 0,5 equivalentes de TOPO, mientras que cuando existen dos ácidos carboxílicos la máxima intensidad se obtiene empleando solo 0,25 equivalentes. Esto es debido a la eficiencia de complejación que es capaz de proporcionar el agente sinérgico, puesto que el ligando con dos ácidos carboxílicos proporciona intrínsecamente un mayor aislamiento que uno monocarboxílico, lo que hace innecesario emplear mayor cantidad de TOPO.

La última aproximación para obtener las condiciones definitivas de este método consiste en la optimización de los equivalentes necesarios de lantánido. En esta ocasión se elige para el estudio un ligando monocarboxílico y otro dicarboxílico para comprobar la influencia de estos grupos.

La optimización se lleva a cabo mediante la variación del número de equivalentes y que oscila desde un defecto de 1000 equivalentes hasta un exceso de la misma magnitud usando la cantidad optimizada de TOPO y pH 7,6 (Tabla 14).

	INTENSIDAD DE EMISIÓN (u.a.)						
	-1000 eq.	-100 eq.	-10 eq.	1 eq.	10 eq.	100 eq.	1000 eq.
<b>22-Eu(EDTA)</b>	-----*	-----*	3,1	10,7	21,2	113,2	210,7
<b>44-Eu(EDTA)</b>	-----*	-----*	2,1	7,3	14,4	76,9	143,1

\* No se observan señales o son muy débiles sobre el ruido de fondo del instrumento

Tabla 14.- Resultados obtenidos mediante la variación de Eu(EDTA)

Como se observa en la tabla, la máxima intensidad se obtiene cuando existe un exceso de 1000 equivalentes tanto para el ligando monocarboxílico como dicarboxílico.

A la vista de los resultados obtenidos mediante la optimización de todos los parámetros que influyen en la formación de los complejos, se fija el valor del pH en 7,6 y la estequiometría AL:TOPO:Eu(EDTA) en 1:0,5:1000 equivalentes para ligandos monocarboxílicos y 1:0,25:1000 para dicarboxílicos.

Una vez establecidas las condiciones de este nuevo método, se amplía el estudio a algunos de los ligandos sintetizados hasta el momento (Figura 50).



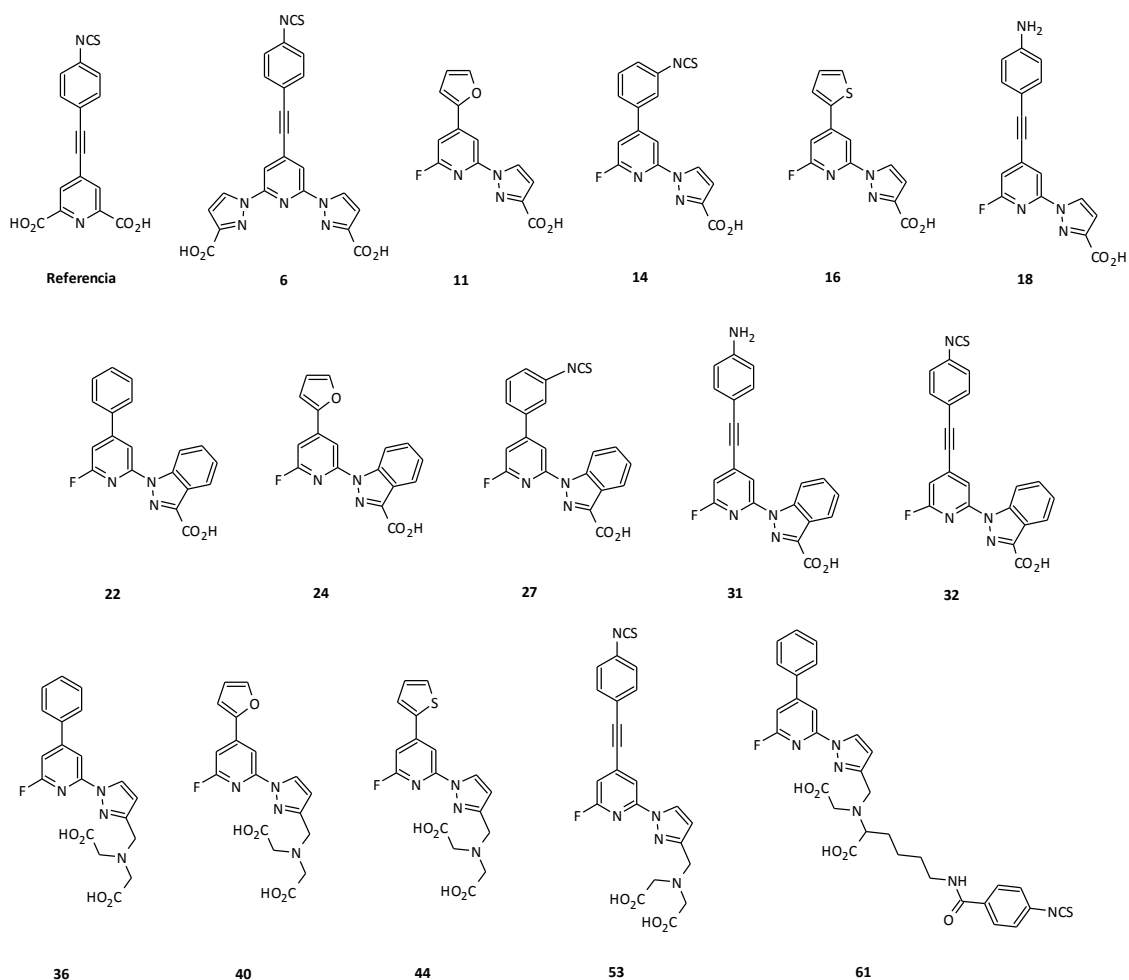


Figura 50.- Ligandos usados para el estudio mediante la complejación con TOPO

Los resultados de la intensidad de emisión cuando se forman los complejos con Eu(EDTA) en las condiciones anteriormente establecidas, se muestran en la Figura 51.

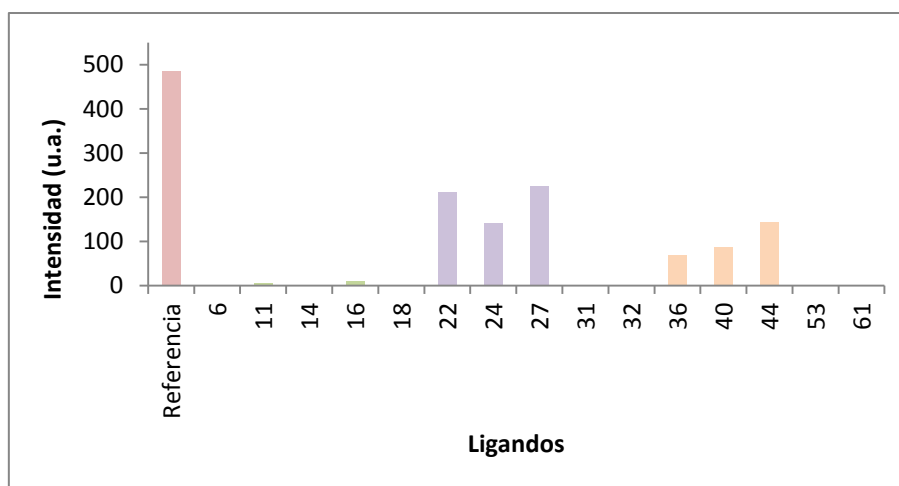


Figura 51.- Resultados de los complejos formados con Eu(EDTA)

Como se observa en la figura, para el caso del **ligando de referencia** la intensidad de emisión es elevada con respecto al resto de ligandos sean del tipo que sean. Como ya se ha comentado anteriormente, este ligando debido a la estructura que presenta (dos carboxilatos unidos directamente a la piridina) está optimizado para complejos de Eu(III), por lo que no resulta extraño que la emisión sea de esa magnitud.

En el caso de los ligandos monopirazólicos las intensidades son bastante débiles incluso si se comparan con sus homólogos dicarboxílicos. Una vez más, esto es debido al mejor aislamiento que son capaces de proporcionar al ion lantánido aquellos derivados iminodiacéticos. Las excepciones dentro de este grupo vuelven a ser los ligandos que presentan grupos –NCS como es el caso del ligando **53** y **61**, aunque mediante este método muestran intensidades relativamente bajas.

Los resultados numéricos de las intensidades de emisión para los complejos monopirazólicos tanto con uno como con dos carboxilatos, se muestran en la Tabla 15.

INTENSIDAD DE EMISIÓN (u.a.)										
Referencia	6	11	14	16	18	36	40	44	53	61
485,6	0,3	6,4	1,0	9,8	0,1	68,7	87,1	143,1	1,3	1,9

Tabla 15.- Emisión de los complejos monopirazólicos

Para el caso de los derivados monoindazólicos (**22-32**), las intensidades obtenidas mediante esta metodología son relativamente elevadas, aunque no llegan al nivel del **ligando de referencia** por la diferencia estructural que ya se ha comentado

anteriormente. El hecho de presentar en la estructura un anillo indazólico puede influir en dos aspectos, por un lado la variación de los niveles electrónicos, más favorable para la sensibilización del Eu(III) y por otro el aumento de hidrofobicidad de este anillo que hace que el ion esté más protegido que en el caso de los pirazoles, motivos por los que las intensidades de emisión son tan diferentes.

Las excepciones son los ligandos que contienen un grupo  $\text{-NH}_2$  (**31**) y su homólogo con el grupo  $\text{-NCS}$  (**32**). En esta ocasión, el hecho de transformar un grupo en otro no proporciona una mejor respuesta luminiscente, además de que confirma que el resultado obtenido en los derivados monopirazólicos no es un hecho aislado y propio de esa familia de ligandos, sino que es causado por la presencia de esos grupos. Los resultados numéricos para esta serie de ligandos se recogen en la Tabla 16.

INTENSIDAD DE EMISIÓN (u.a.)					
Referencia	22	24	27	31	32
485,6	210,7	141,4	225,8	2,2	0,9

Tabla 16.- Emisión de los complejos monoindazólicos

Una vez analizados todos los resultados obtenidos, ninguno de los ligandos que se han estudiado en este trabajo ha mostrado emisiones que hayan resultado mejores que la del **ligando de referencia**. Estos resultados resultan llamativos sobre todo en el caso de los monopirazoles con un ácido carboxílico **11-18**, teniendo en cuenta que los monoindazoles contienen el mismo número de posiciones de coordinación.

Los mejores resultados obtenidos para el **ligando de referencia** pueden deberse a la favorable disposición de los carboxilatos sobre el anillo de piridina, lo que podría dar lugar al establecimiento de fenómenos de competencia que dan lugar a la abstracción del Europio sobre el complejo Eu(EDTA) favoreciendo la emisión de complejos 1:3 Eu(III):ligando fuertemente luminiscente. El exceso de Europio empleado podría favorecer este tipo de procesos que conducirían a lecturas erróneas para la emisión de este ligando.

Por estos motivos se duda de los resultados obtenidos, por lo que se decide realizar un cambio del complejo lantánido empleado. Con el EDTA la estequiometría de los complejos formados no se sabe con certeza ya que puede ser que la unión no se produzca entre todos los posibles grupos susceptibles o pueda haber intercambio del lantánido entre ligandos, por ello se establece el  $\text{EuCl}_3$  como sal para la formación de los complejos, sin que haya involucrado ningún ligando adicional.

De nuevo es necesario realizar un estudio de optimización de las condiciones, principalmente de las cantidades necesarias de TOPO y de  $\text{EuCl}_3$ . El pH se fija en 7,6 puesto que ya se ha comprobado que los ligandos sintetizados, debido a la presencia de carboxilatos, ofrecen mejores intensidades a pH básico.

En primer lugar se realiza la optimización del número de equivalentes necesarios de TOPO, poniendo un exceso de 10 equivalentes de  $\text{EuCl}_3$ . Para ello se eligen los mismos ligandos que los empleados la metodología del  $\text{Eu}(\text{EDTA})$  y que se muestran nuevamente en la Figura 52.

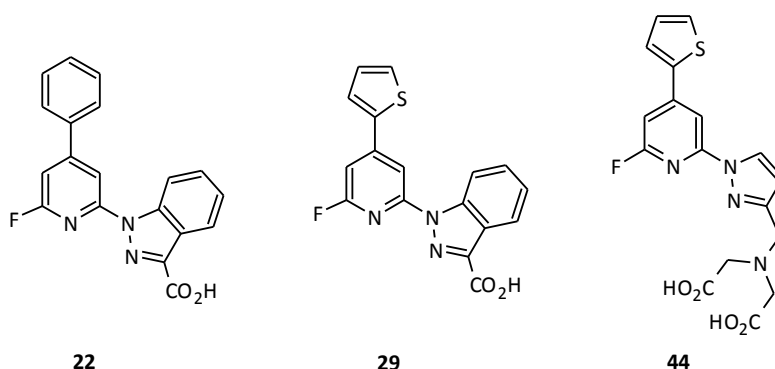


Figura 52.- Ligandos estudiados elegidos para la optimización de la cantidad de TOPO

Como se puede ver la Tabla 17, la máxima intensidad cuando se usa  $\text{EuCl}_3$  se mantiene en 0,5 equivalentes de TOPO para ligandos monocarboxílicos y en 0,25 equivalentes para los dicarboxílicos. El resultado es el mismo que en el caso de usar  $\text{Eu}(\text{EDTA})$ , por lo que la acción del TOPO a la hora de crear la esfera para albergar al ion lantánido resulta similar.

	INTENSIDAD DE EMISIÓN (u.a.)						
	2 eq.	1,5 eq.	1,0 eq.	0,75 eq.	0,5 eq.	0,25 eq.	0,10 eq.
<b>22-EuCl<sub>3</sub></b>	441,6	401,7	457,4	559,1	583,6	432,5	153,2
<b>29-EuCl<sub>3</sub></b>	-----*	0,7	1,1	1,9	2,6	1,9	0,5
<b>44-EuCl<sub>3</sub></b>	-----*	-----*	-----*	-----*	3,4	47,2	1,3

\* No se observan señales o son muy débiles sobre el ruido de fondo del instrumento

Tabla 17.- Resultados obtenidos mediante la variación de TOPO

Resulta muy llamativa la enorme diferencia entre las intensidades observadas en estas condiciones respecto de las recogidas en la Tabla 13 para la optimización de la

cantidad de TOPO en el caso de complejos con Eu/EDTA. En aquel estudio la mayor emisión correspondía al ligando **44** mientras que en el caso de los complejos obtenidos con  $\text{EuCl}_3$  el ligando que presenta mejor emisión es el **22**, estos datos resultan poco coherentes.

A modo de ejemplo se muestra en la Figura 53 una comparación usando Eu(EDTA) y  $\text{EuCl}_3$  para la optimización de los equivalentes de TOPO en el caso del ligando **29**.

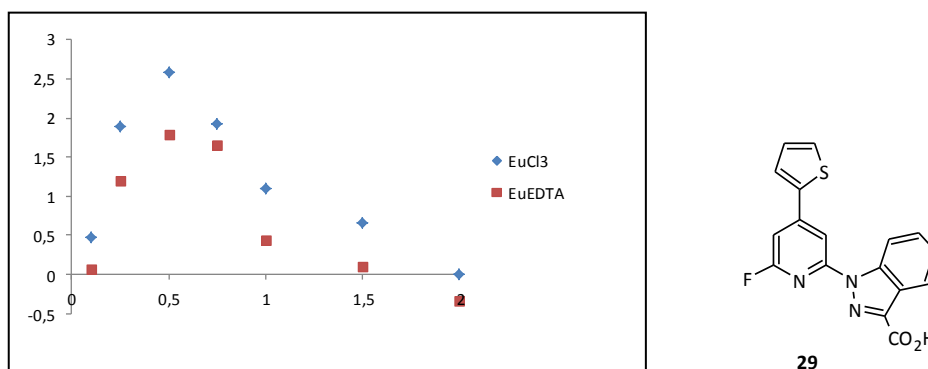


Figura 53.- Resultados de la optimización del número de equivalentes de TOPO

Una vez optimizada la cantidad de TOPO, se hace lo mismo con la cantidad necesaria de  $\text{EuCl}_3$ . El estudio se lleva a cabo mediante la variación en el número de equivalentes oscilando desde un defecto de 1000 equivalentes hasta un exceso de la misma magnitud (Tabla 18) y se elige un ligando monocarboxílico y otro dicarboxílico.

	INTENSIDAD DE EMISIÓN (u.a.)						
	-1000 eq.	-100 eq.	-10 eq.	1 eq.	10 eq.	100 eq.	1000 eq.
<b>22-EuCl<sub>3</sub></b>	-----*	1,9	30,5	336,9	583,6	852,5	1165,5
<b>44-EuCl<sub>3</sub></b>	-----*	0,5	9,2	27,7	47,2	23,4	28,3

\* No se observan señales o son muy débiles sobre el ruido de fondo del instrumento

Tabla 18.- Resultados obtenidos mediante la variación de  $\text{EuCl}_3$

A la vista de los resultados de la tabla, se observa que para el caso del ligando monoindazólico (**22**) la mayor intensidad se obtiene cuando se pone un exceso de 1000 equivalentes de  $\text{EuCl}_3$ , mientras que para el caso del iminodiacetato (**44**) basta con un exceso de 10 equivalentes.

A modo de ejemplo se muestra en la Tabla 19 una comparación usando Eu(EDTA) y  $\text{EuCl}_3$  para la optimización de los equivalentes de lantánido en el caso del ligando **22**.

	INTENSIDAD (u.a.)						
	-1000 eq.	-100 eq.	-10 eq.	1 eq.	10 eq.	100 eq.	1000 eq.
<b>22-Eu(EDTA)</b>	-----*	-----*	3,1	10,7	21,2	113,2	210,7
<b>22-EuCl<sub>3</sub></b>	-----*	1,9	30,5	336,9	344,1	582,5	1165,5

\* No se observan señales o son muy débiles sobre el ruido de fondo del instrumento

Tabla 19.- Resultados obtenidos para el ligando 22 usando Eu(EDTA) y EuCl<sub>3</sub>

Una vez establecidas las condiciones de este nuevo método usando EuCl<sub>3</sub>, se lleva a cabo el estudio con algunos de los ligandos (Figura 54) que mejores resultados mostraron cuando se emplea Eu(EDTA).

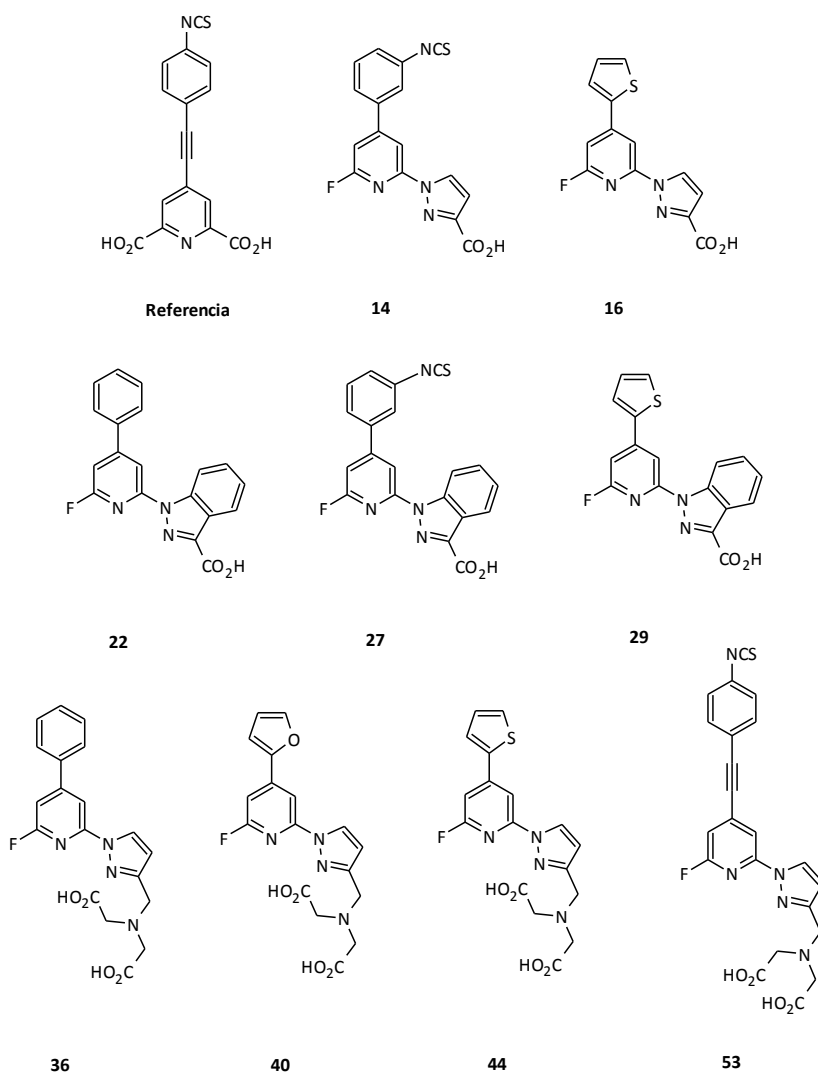


Figura 54.- Ligandos usados para el estudio mediante la complejación con TOPO

Los resultados de la intensidad de emisión cuando se forman los complejos con  $\text{EuCl}_3$  en estas condiciones se muestran en la Figura 55.

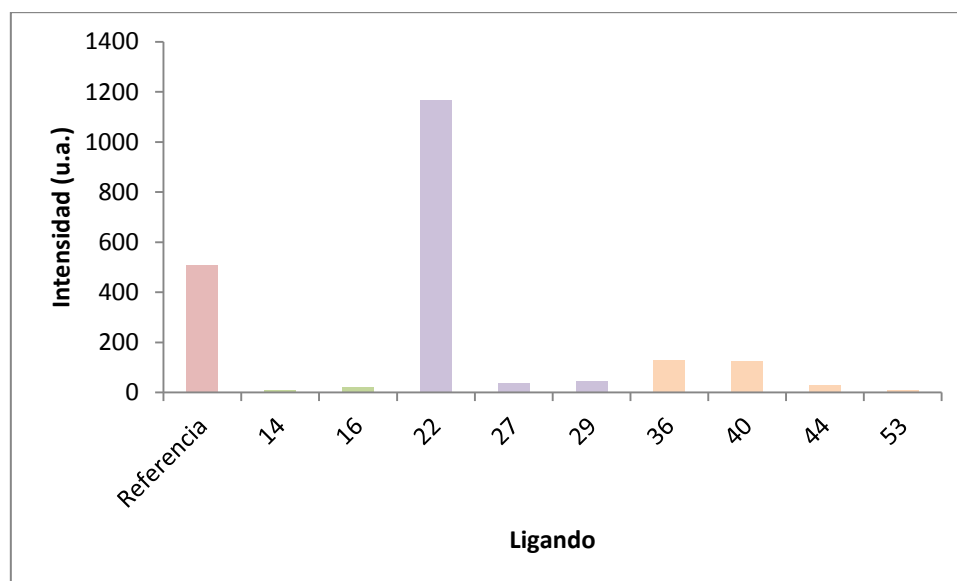


Figura 55.- Resultados de los complejos formados con  $\text{EuCl}_3$

Como se observa en la gráfica, para el caso del **ligando de referencia** la intensidad de emisión es elevada y se mantiene dentro del mismo rango que la obtenida con usando  $\text{Eu}(\text{EDTA})$ . En esta ocasión el ligando que mejor comportamiento presenta es el ligando monocarboxílico **22**.

En el caso de los ligandos monopirazólicos (**14** y **16**) las intensidades vuelven a ser bastante débiles incluso si se comparan con sus homólogos dicarboxílicos. Una vez más, podría deberse al mejor aislamiento que son capaces de proporcionar al ion lantánido aquellos derivados iminodiacéticos, aunque en el caso del ligando monoindazólico **22** esta tendencia no se mantiene. Los ligandos que presentan grupos  $-\text{NCS}$  como es el caso del ligando **14**, **27** y **53** presentan, en general, valores bajos siendo **27** el mejor de ellos, aunque muy inferior a su homólogo no sustituido **22**.

Los resultados numéricos de las intensidades de emisión para los complejos monopirazólicos y monoindazólicos, tanto con uno como con dos carboxilatos, se muestran en las Tabla 20 y 21.

INTENSIDAD DE EMISIÓN (u.a.)						
Referencia	14	16	36	40	44	53
508,2	8,6	21,3	128,9	124,7	28,3	7,9

Tabla 20.- Intensidades obtenidas para los ligandos monopirazólicos

INTENSIDAD DE EMISIÓN (u.a.)			
Referencia	22	27	29
508,2	1165,5	36,4	46,2

Tabla 21.- Intensidades obtenidas para ligandos monoindazólicos

Para el caso de los derivados monoindazólicos, las intensidades obtenidas mediante esta metodología son muy elevadas para el ligando **22** que, como ya se ha comentado, supera al **ligando de referencia** y se convierte en el ligando más prometedor de toda la serie de ligandos estudiada, aunque no es un compuesto utilizable para su conjugación sobre oligonucleótidos al carecer de punto de anclaje isotiocianato.

La Figura 56 muestra un resumen comparativo de las intensidades de emisión obtenidas, tanto con el uso del Eu(EDTA) como con el  $\text{EuCl}_3$ , para los ligandos que se han estudiado en ambos.

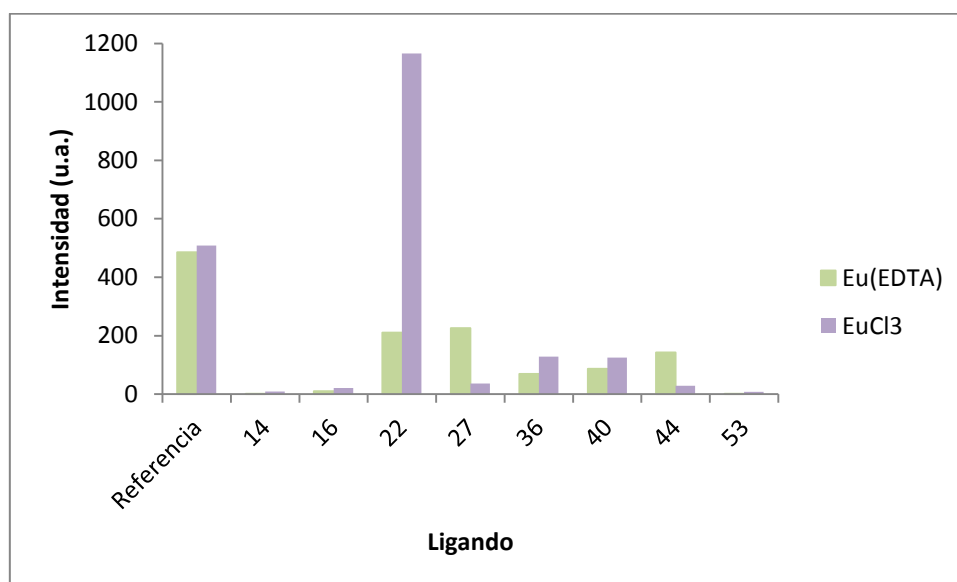


Figura 56.- Comparación entre Eu(EDTA) y  $\text{EuCl}_3$



Como se observa en la gráfica los resultados no siguen una tendencia general. Si nos fijamos en los monopirazoles **14** y **16** se observa una mejoría en ambos ligandos en el caso de usar  $\text{EuCl}_3$  al igual que sucede en el caso de los iminodiacetatos a excepción del ligando **44** que resulta mejor para  $\text{Eu}(\text{EDTA})$ .

En el caso de los monoindazoles **22** y **27** los resultados son totalmente distintos. Para el caso del ligando **22** se produce un importante incremento en la intensidad, mientras que para el caso del **27** se produce un acusado decrecimiento cuando el lantánido empleado se encuentra en la forma  $\text{EuCl}_3$ .

A la vista de los resultados obtenidos y ante las discrepancias con las que nos encontramos comparando el comportamiento frente al  $\text{Eu}(\text{EDTA})$  y al  $\text{EuCl}_3$ , se concluye que este método aunque resulta interesante por expresar las características de emisión de los ligandos, ya que en todos los casos se forman los complejos a pesar de que en algunos casos la intensidad sea bastante débil, se decide continuar el estudio de implementación de un método más general y consistente para el estudio comparativo de todos los ligandos preparados.

#### 4.2.3. Complejos ternarios con éteres corona

Los métodos desarrollados hasta el momento y que incluyen el uso de triflatos o el uso de lantánidos previamente complejados, y/o de agentes sinérgicos con el fin de crear una óptima coordinación entre el ligando y el quelato lantánido, no han mostrado la consistencia deseada para permitir un estudio comparativo de la variedad de ligandos que se han ido obteniendo conforme el trabajo sintético avanzaba. O bien las especies formadas no crean un entorno adecuado para el aislamiento del lantánido, o los complejos formados no son lo suficientemente estables como para poder ser estudiados comparativamente y determinar su potencial empleo como sondas luminiscentes.

El método que se propone a continuación tiene su base, de nuevo, en el diseño de compuestos ternarios<sup>159</sup> que contienen ligandos macrocíclicos de tipo éteres corona oxigenados, como la 14-corona-4, 15-corona-5 o 18-corona-6, que son particularmente interesantes debido a las estabilidades termodinámicas de sus complejos,<sup>160</sup> y especialmente indicados en sus complejos con lantánidos debido a la oxigenofilia de

<sup>159</sup> D. Zhao, Z. Hong, C. Liang, X. Liu, W. Li, C.S. Lee, S.T. Lee, *Thin Solid Films*, **2000**, 363, 208.

<sup>160</sup> M.C.F.C. Felinto, C.S. Tomiyama, H.F. Brito, E.E.S. Teotônio, O.L. Malta, *J. Solid State Chem.*, **2003**, 171, 189.

estos iones, lo que ayudaría a crear una esfera de coordinación más protegida en relación a las moléculas de agua, evitando la desactivación de la luminiscencia.<sup>161,162</sup>

En este método se abordará el empleo de éteres corona que contienen Eu(III) o Tb(III) ampliamente estudiados,<sup>163,164</sup> ya que son capaces de aumentar su solubilidad y la estabilidad de sus complejos (efecto macrocíclico).<sup>165</sup> Es interesante el papel que desarrollan en la formación de los complejos debido a la interacción entre los iones Ln(III) y el proceso de encapsulación que originan. En concreto, los éteres coronas elegidos son los 12-Corona-4 (12C4) y 15-Corona-5 (15C5) (Figura 57).<sup>166</sup>

Los complejos con las coronas fueron preparados a partir de una mezcla estequiométrica (1:1) del  $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Ln= Eu, Tb) y el éter corona (12-Corona-4, 15-Corona-5) en una mezcla etanol/acetona (1:1).

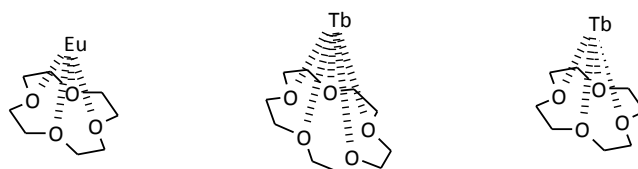


Figura 57.- Éteres corona con Eu(III) y Tb(III)

Como se observa en la figura, para el caso del Tb(III) se preparan los complejos tanto con 12C4 como con 15C5 debido a que con la primera los complejos son ligeramente menos estables lo que provoca que, o los complejos ternarios no se forman o que los datos de emisión sean de intensidad inferior como consecuencia de fenómenos de intercambio.<sup>167</sup> También se ha llevado a cabo un estudio comparativo para los complejos de Tb(III) empleando la 18C6, pero los resultados resultan similares a los obtenidos con la 15C5, por lo que definitivamente se emplea ésta para Tb(III) y la 14C4 para Eu(III).

<sup>161</sup> G.F. de Sá, O.L. Malta, C.D. Donegá, A.M. Simas, R.L. Longo, P.A. Santa-Cruz, E.F. da Silva, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 196, 165.

<sup>162</sup> F.R.G. Silva, J.F.S. Menezes, G.B. Rocha, S. Alves Jr., H.F. Brito, R.L. Longo, O.L. Malta, *J. Alloys Compd.*, **2000**, 303, 364.

<sup>163</sup> J.-C.G. Bünzli, D. Wessner, *Coord. Chem. Rev.*, **1984**, 60, 191.

<sup>164</sup> M.F. Belian, G.F. de Sá, S. Alves Jr., R.F. de Farias, *J. Coord. Chem.*, **2007**, 60, 173.

<sup>165</sup> Q. Chen, K. Cannell, J. Nicoll, D.V. Dearden, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 6335.

<sup>166</sup> M.F. Belian, G.F. de Sá, S. Alves Jr., A. Galembeck, *Journal of Luminescence*, **2011**, 131, 856.

<sup>167</sup> M.F. Belian, R.O. Freire, A. Galembeck, G.F. de Sá, R.F. de Farias, S. Alves Jr., *Journal of Luminescence*, **2010**, 130, 1946.

De modo análogo a los métodos desarrollados anteriormente, se realiza el estudio separando los distintos ligandos por grupos y familias de entre los compuestos preparados, para comprobar cuáles son los ligandos que proporcionan mejores comportamientos en función del sustituyente de la posición 4 de la piridina y de la naturaleza de los heterociclos implicados en la coordinación.

#### - Ligandos monosustituídos

Con el fin de poner a punto este método, una vez más se toman como referencia aquellos ligandos que se han denominado monosustituídos.

Para ello se han elegido algunos de los ligandos que hasta el momento han mostrado buen comportamiento luminiscente y que como ya se ha visto, son aquellos que tienen como sustituyentes grupos fenilo o su derivado, tienilo y furilo principalmente (Figura 58).

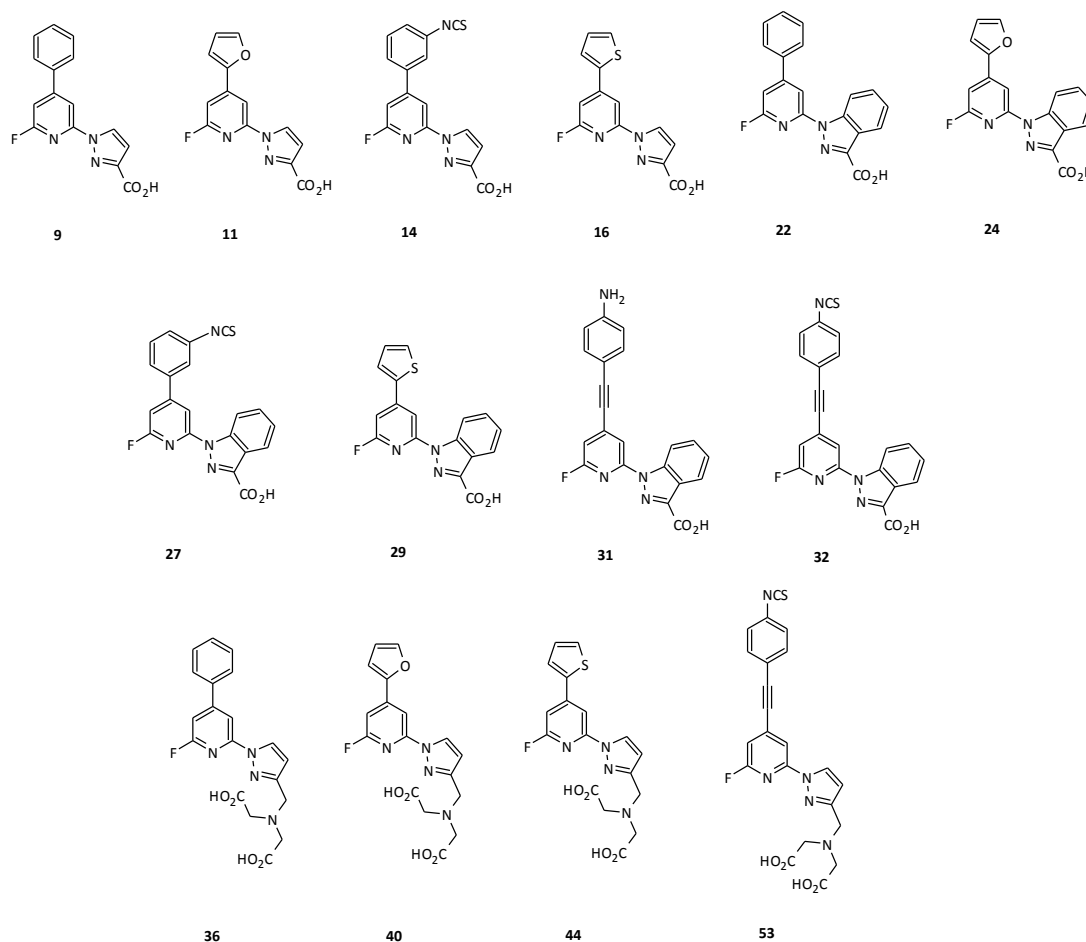


Figura 58.- Ligandos monosustituídos estudiados mediante el uso de éteres corona

Los complejos se forman mediante una relación estequiométrica AL:Corona<Ln> (1:1) en etanol y se registran sus correspondientes espectros usando una concentración de  $10^{-5}$ M.

A la vista de los resultados obtenidos para estos complejos y que se discutirán más adelante, se ha llevado a cabo también la medida de los tiempos de vida de los complejos formados. Estos valores que son siempre elevados en los complejos Eu(III) y Tb(III), pueden ser una indicación del grado de estabilidad y protección de los complejos frente a los efectos de desactivación producidos por el disolvente utilizado.

De manera general, los tiempos de vida para complejos lantánidos luminiscentes de Eu(III) y Tb(III) suelen estar en el orden de 0,5-1,5 ms para el caso del Eu(III) y de 1-2,5 ms para el Tb(III). En el caso de los complejos ternarios formados con los éteres corona, los valores obtenidos no alcanzan, en ningún caso, este valor debido al menor aislamiento que son capaces de proporcionar al lantánido.

En la Tabla 22 se muestran los valores, en el entorno de 0,3 ms para Eu(III) y de 0,7-0,8 ms para Tb(III), y que resultan similares para la práctica totalidad de los ligandos estudiados. Estos valores indican que los complejos preparados no provocan la encapsulación habitual del lantánido que se busca en el desarrollo de complejos luminiscentes y que el complejo ternario presenta posiciones de coordinación para el acercamiento de moléculas de disolvente.

Dentro de que los tiempos de vida se hayan en un rango estrecho de valores, cabe destacar que los ligandos iminodiacéticos, **36**, **40**, **44** y **53** son los que poseen valores más elevados tanto para Eu(III) con valores medios de 0,37 ms frente a el valor promedio de 0,27 ms, como para Tb(III). En estos ligando la estructura coordinante del grupo iminodiacético forma complejos con mayor estabilidad al encontrarse más protegidos frente al disolvente.

	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>36</b>	<b>40</b>	<b>44</b>	<b>53</b>
<b>Eu <math>\tau</math> (ms)</b>	0,28	0,30	0,24	0,30	0,44	0,37	0,35	0,32
<b>Tb <math>\tau</math> (ms)</b>	0,67	0,59	0,76	0,64	0,88	0,68	0,76	0,62

	<b>22</b>	<b>24</b>	<b>27</b>	<b>29</b>	<b>31</b>	<b>32</b>
<b>Eu <math>\tau</math> (ms)</b>	0,24	0,25	0,32	0,31	0,21	0,28
<b>Tb <math>\tau</math> (ms)</b>	1,10	0,64	0,82	0,82	0,53	0,63

Tabla 22.- a) Tiempos de vida de los ligandos constituidos por pirazoles y b) Tiempos de vida de los ligandos constituidos por indazoles

También cabe destacar los, en general, mayores tiempos de vida observados para el caso de los ligandos indazólicos sobre todo en los complejos de Tb(III).

La mayoría de los complejos estudiados muestran buenos resultados de emisión tanto para Eu(III) como para Tb(III). Los resultados de las intensidades y longitudes de onda obtenidos permiten comprobar: i) la validez de este método como estrategia general para el estudio de los ligandos sintetizados y, ii) que tipo de ligandos son los que muestran mejores propiedades luminiscentes.

En la Tabla 23 se recogen los resultados correspondientes a los ligandos formados por unidades pirazólicas, tanto aquellas que están formadas un ácido carboxílico, como las que poseen un resto iminodiacético.

		<b>9</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>36</b>	<b>40</b>	<b>44</b>	<b>53</b>
	$\lambda_{exc}$ (nm)	296	305	303	305	296	305	303	310
<b>Eu (<math>\lambda_{em} = 615</math> nm)</b>	$I_{em}$ (u.a.)	652	838	33	< 5	270	923	191	14
<b>Tb (<math>\lambda_{em} = 545</math> nm)</b>	$I_{em}$ (u.a.)	1396	74	68	15	2845	30	50	26

Tabla 23.- Resultados para los ligandos constituidos por pirazoles

En todos los casos, y a diferencia de los métodos discutidos anteriormente, se forman complejos con ambos lantánidos, hecho que no sucedía con los anteriores métodos, en los que para en ciertos ligandos los espectros, o bien de excitación, de emisión o ambos, no eran los esperados por lo que no han tenido la validez comparativa que se buscaba.

Tanto en el caso de pirazoles con un ácido carboxílico como con iminodiacético, la longitud de onda de excitación se mantiene dentro de los valores típicos de los pirazoles (300-310 nm) lo que coincide con los resultados obtenidos hasta el momento con las otras metodologías. Si se comparan los resultados atendiendo a la naturaleza del sustituyente que se encuentra en la posición 4 de la piridina, para aquellos ligandos que contienen pirazol, se puede observar que, en la mayor parte de los casos la emisión de Tb(III) es superior a la observada para el Eu(III), lo que confirma la tendencia observada comúnmente para estos iones. Sin embargo, en el caso del furano (**11** y **40**) los resultados son similares para ambos ligandos, siendo la emisión de Eu(III) muy superior a la de Tb(III), lo que convertiría a este sustituyente en un candidato idóneo para la sensibilización de Europio en el sistema biológico.

Para aquellos ligandos que muestran una especial sensibilización hacia el Tb(III), cabe destacar el caso de los compuestos **9** y **36**, en los que existe un sustituyente fenilo en posición 4. La emisión observada supera la intensidad máxima registrable, lo que

obliga a filtrar la emisión observada a fin de evitar la saturación del detector en condiciones de concentración equivalentes. La sustitución de la posición 3 del grupo fenilo por un grupo isotiocianato, hace disminuir significativamente la emisión observada para este ion, por lo que la variación del cromóforo con la introducción de un sustituyente de demanda electrónica produce una menor facilidad en la sensibilización de los niveles emisivos del Tb(III) (ver más adelante discusión sobre los estados triplete). Para estos ligandos también se obtienen resultados significativos para la emisión de Eu(III) aunque no superan los valores obtenidos cuando el sustituyente de la piridina es el anillo de furano.

Para los ligandos de tipo indazólico, las longitudes de onda de excitación vuelven a situarse en los valores típicos observados para este heterociclo (320-330 nm) y en todos los casos se observa también emisión luminiscente debida a la formación de los complejos correspondientes (Tabla 24).

		<b>22</b>	<b>24</b>	<b>27</b>	<b>29</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	
		$\lambda_{exc}$ (nm)	325	328	331	329	321	322
<b>Eu (<math>\lambda_{em} = 615</math> nm)</b>	$I_{em}$ (u.a.)	972	415	815	795	98	140	
<b>Tb (<math>\lambda_{em} = 545</math> nm)</b>	$I_{em}$ (u.a.)	3055	95	484	813	35	42	

Tabla 24.- Resultados para ligandos constituidos por indazoles

De manera general, estos complejos indazólicos muestran, sin embargo, mejores resultados para la sensibilización de Eu(III) que de Tb(III). Sólo en el caso de los sustituyentes fenilo y tienilo (**22** y **29**), éstos son superiores para terbio, sobre todo en el caso del fenilo y resultados, en casi todos los casos, similares para Eu(III), aunque la mayor intensidad de todos ellos se observa nuevamente para el caso del sustituyente fenilo (**22**), para el cual, en el caso del complejos de Tb(III) resulta también necesario el empleo de filtro para evitar la saturación del detector.

Dentro de esta familia de ligandos indazólicos y con el fin de comprobar si el complejo formado entre las coronas correspondientes y el ligando que contiene un grupo  $-NH_2$  sigue el mismo comportamiento que el visto hasta ahora mediante los otros métodos estudiados, se amplía el estudio al ligando **31**. Este derivado indazólico que presenta un máximo de excitación a 321 nm forma complejo con ambos lantánidos, pero la intensidad de emisión es la más baja de toda la serie, lo que pudiera deberse al efecto del grupo amino, en relación a su demanda electrónica o bien al mencionado anteriormente efecto PET generado a partir del par de electrones del átomo de nitrógeno, la determinación de los estados triplete para los complejos descritos aquí podría arrojar luz sobre este comportamiento (ver más adelante).

Por último, en el caso del ligando **32**, el efecto de cambiar el grupo  $\text{-NH}_2$  (**31**) por el grupo  $\text{-NCS}$  aporta una mejora de la respuesta luminiscente, aunque la intensidad resultante para ambos complejos nunca es tan elevada como para el resto de los compuestos indazólicos, aunque se sigue observando la tendencia de mejores resultados para el caso de los complejos con el Eu(III).

A la vista de todos los resultados obtenidos, se puede concluir que las mayores intensidades se obtienen con la serie de los indazoles y más concretamente con el sustituyente fenilo y para los ligandos pirazólicos aquellos con sustituyentes fenilo (**9** y **36**) y furilo (**11** y **40**) en estos últimos ligandos para la sensibilización de Eu(III). Los resultados de la serie de los indazoles son interesantes, tanto desde el punto de vista de la intensidad de emisión, como del valor de la longitud de onda de excitación, puesto que se encuentra en una zona en la que se evitan fuentes de excitación del rango ultravioleta. En cualquier caso, el sustituyente fenilo muestra excelentes resultados en las tres familias y para ambos lantánidos, por lo que puede ser un buen candidato para el diseño de ligandos con propiedades altamente luminiscentes.

A modo de ejemplo, en la Figura 59, se muestran los espectros de excitación con el Eu(III) obtenidos para un mismo sustituyente (fenilo) y que es el que mejores resultados ha mostrado, con el fin de observar la variación de la longitud de onda de excitación en las diferentes familias.

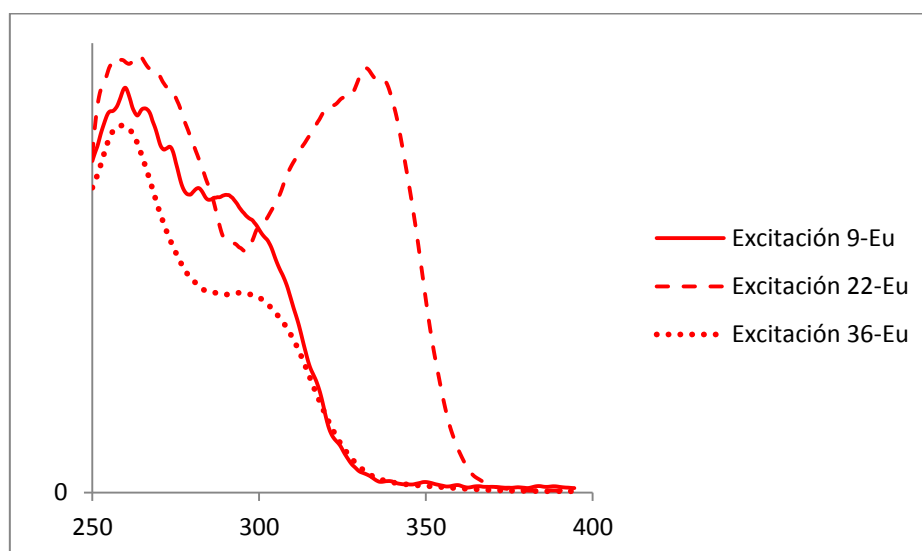


Figura 59.- Variación de la longitud de onda en las tres familias estudiadas para el sustituyente fenilo

### *Determinación de los estados triplete*

A la vista de la consistencia de los datos obtenidos en los complejos ternarios utilizando éteres corona como ligando portador de lantánido, se plantea la ampliación del estudio a la determinación de los niveles de energía de sus estados triplete responsables de esta emisión, según el mecanismo comúnmente admitido para la sensibilización luminiscente de europio y terbio.

Esta determinación se basa en que, dentro de la serie de los lantánidos, la coordinación de estos iones presenta propiedades muy similares, debido a que los electrones que se van introduciendo en su capa interna *4f*, minimiza entre ellos las variaciones de sus propiedades de coordinación.

A partir de estas propiedades poco diferenciadas, el ion gadolinio no presenta niveles emisivos accesibles desde un ligando coordinado, por lo que este ion no es luminiscente. Los complejos de este ion estudiados a 77K producen la emisión de fosforescencia correspondiente al ligando que se halla complejado al ion y en un entorno muy similar al existente para el resto de los iones, como el Eu(III) o el Tb(III). De este modo la fosforescencia observada para el complejo corresponderá con el estado emisor triplete del ligando complejado con cualquiera de los iones de la serie. Este valor puede ser comparado con los datos de los niveles emisivos de Eu(III) y Tb(III) y con las intensidades observadas, con el fin de sacar conclusiones acerca de los distintos cromóforos y los resultados obtenidos para los mismos y que se acaban de discutir.

Los complejos de Gd (III) de los ligandos se preparan de modo similar al llevado a cabo con Eu(III) y Tb(III), empleando el complejo 12C4<Gd(III)> como especie portadora de gadolinio. Los espectros se registran en etanol a 77K y el valor del estado triplete se determina a partir del valor de energía de la transición 0-0 para el espectro de fosforescencia obtenido (Figura 60).



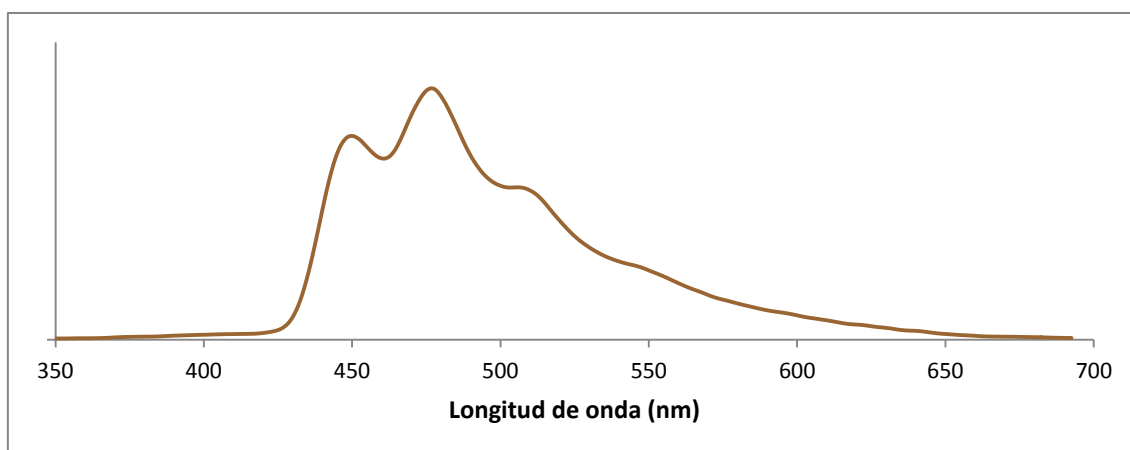


Figura 60.- Espectro de fosforescencia tipo (22), a partir del cual se determina la energía del nivel  $T_1$

Los complejos de los ligandos monosustituídos que se han estudiado en su interacción con el gadolinio en su complejo con la corona y los valores obtenidos se recogen en la Tabla 25, junto con las intensidades observadas para sus complejos de Eu(III) y Tb(III).

Ligando	E ( $T_1$ ) ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidad (u.a.)	
		Europio	Terbio
9	25707	652	1396
11	21108	838	74
14	22805*	33	68
16	22099*	3,4	15
22	22422	1000	3100
24	21142	608	95
27	22075	815	484
29	22297	795	813
32	20704	140	40
36	23641	270	2700
40	22198	923	10
44	19960	191	16
53	22962*	14	12

\*Dificultad para asignar su estado triplete debido a la baja intensidad

Tabla 25.- Valores de los estado triplete  $T_1$  de los complejos de Gd (III) monosustituídos a partir de los espectros de fosforescencia a 77K e intensidades de emisión observadas para sus complejos de Eu(III) y Tb(III)

En la mayoría de los casos los espectros de fosforescencia obtenidos permiten encontrar sin ambigüedad la posición de más baja energía para la transición 0-0

mientras que en los casos señalados en la tabla, esta posición no se puede asignar con facilidad. El estudio de estos valores en relación con los resultados de luminiscencia de los complejos de Eu(III) y Tb(III), se recoge en las Figuras 61 para Eu(III) y 62 para Tb(III).

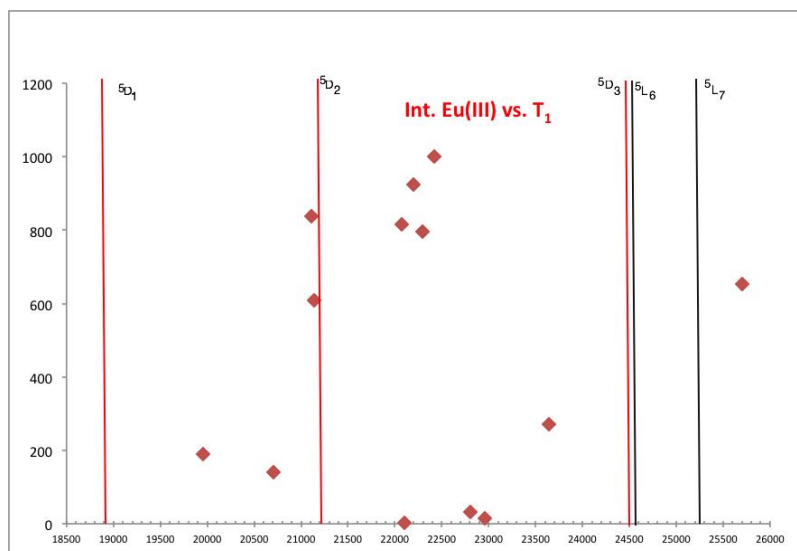


Figura 61.- Representación de los valores de  $T_1$  frente a la intensidad observada para los complejos de Eu(III) en función de la posición de los niveles emisivos este ion

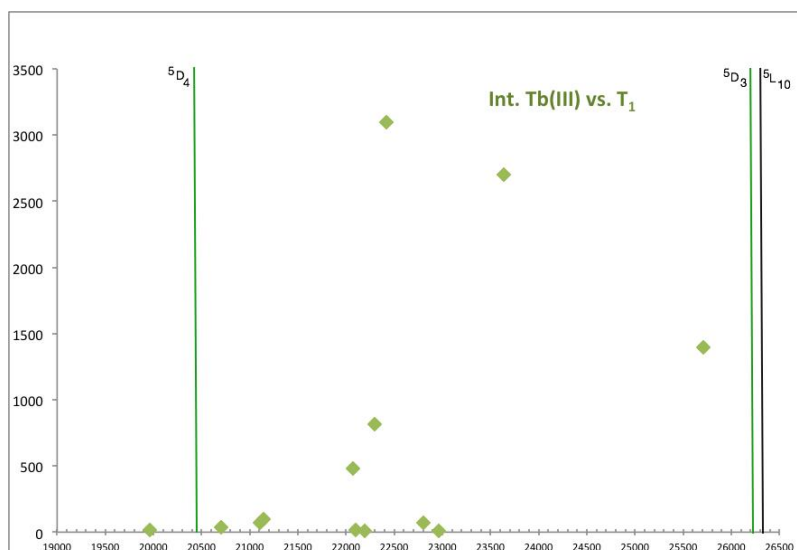


Figura 62.- Representación de los valores de  $T_1$  frente a la intensidad observada para los complejos de Tb(III) en función de la posición de los niveles emisivos este ion

La intensidad de las emisiones recogidas en estas gráficas muestra que para el caso de los complejos de europio las más elevadas se encuentran en un intervalo relativamente estrecho que va desde 21000 a 23700  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden al intervalo entre los niveles emisivos del Europio  $^5\text{D}_2$  y  $^5\text{D}_3$ . Algunos de los compuestos no presentan sin embargo intensidades significativas a pesar de estar en este intervalo, sería el caso de los compuestos **14**, **16** y **53**. Dos de estos compuestos son derivados isotiocianato y corresponden a estructuras para las cuales la determinación de la transición 0-0 en el espectro de fosforescencia es dudosa.

Para el caso de los compuestos de terbio las tendencias son menos claras ya que existe una mayor dispersión de valores aunque en todos los casos los niveles se hallan situados entre los emisivos  $^5\text{D}_3$  y  $^5\text{D}_4$  del terbio. Los mejores resultados se obtienen, sin embargo, cuando los niveles  $T_1$  se sitúan por encima de 22000  $\text{cm}^{-1}$ . Los resultados para **14**, **16** y **53** nuevamente resultan dudosos sobre la tendencia observada debido probablemente a la incertidumbre en la determinación del nivel triplete.

Hasta el momento, se han estudiado mediante este método los ligandos que se han denominado monosustituídos (pirazoles, indazoles e iminodiacetatos). La coherencia de los resultados obtenidos y la formación de los complejos en todos los casos, hacen que esta estrategia para el estudio las propiedades de complejación de los ligandos sintetizados, se pueda considerar como definitiva, por lo que a continuación se presenta la ampliación del estudio al resto de ligandos sintetizados en esta memoria.

#### - **Ligandos disustituídos 5-aminoindazol / 3-carboxipirazol**

Tanto los grupos pirazol como indazol, sobre todo estos últimos, han mostrado buenos resultados en cuanto a los valores de longitud de onda (superiores a 315 nm) y algunos de ellos han resultado grandes emisores luminiscentes en términos de intensidad. A partir de estos resultados se ha abordado la síntesis de los derivados disustituídos de piridina discutida en el capítulo 3.3.

La sustitución del átomo de flúor de los derivados monosustituídos por un anillo indazólico busca obtener mejoras sustanciales en las intensidades de emisión al conseguir mayor absorptividad de los ligandos y desplazar los máximos de excitación a regiones más próximas al visible lo que, como ya se ha comentado, permite abaratar los posibles costes asociados a las determinaciones llevadas a cabo con estos compuestos.

Otra de las razones, y no necesariamente menor, es lograr un entorno más protegido para la complejación del lantánido y, en consecuencia, más eficaz en su protección, lo que debería redundar en una mayor emisión de los complejos. La presencia de un nuevo átomo de nitrógeno coordinante sumado a la existencia del resto de grupos

incluido el carboxilato, deberá de conferir al ion lantánido un medio más aislado y, de este modo, propiedades luminiscentes más efectivas.

Como ya se ha comentado, la posición 4 de la piridina está limitada en cuanto a la variedad de sustituyentes que se pueden introducir y que puedan ser transformados en un grupo para el anclaje al oligonucleótido como el isotiocianato. Por tanto, una de las opciones para la introducción del nuevo anillo de indazol es la inclusión sobre éste de un grupo  $-NH_2$ , lo que abriría la posibilidad a su transformación en un grupo isotiocianato para ser usado como marcador para oligonucleótidos convenientemente funcionalizados.

Esta primera familia de ligandos doblemente sustituidos presentan como estructura general un anillo de pirazol y otro de indazol, dotado este último de un grupo amino sobre la posición 5 original (5-aminoindazol) (Figura 63).

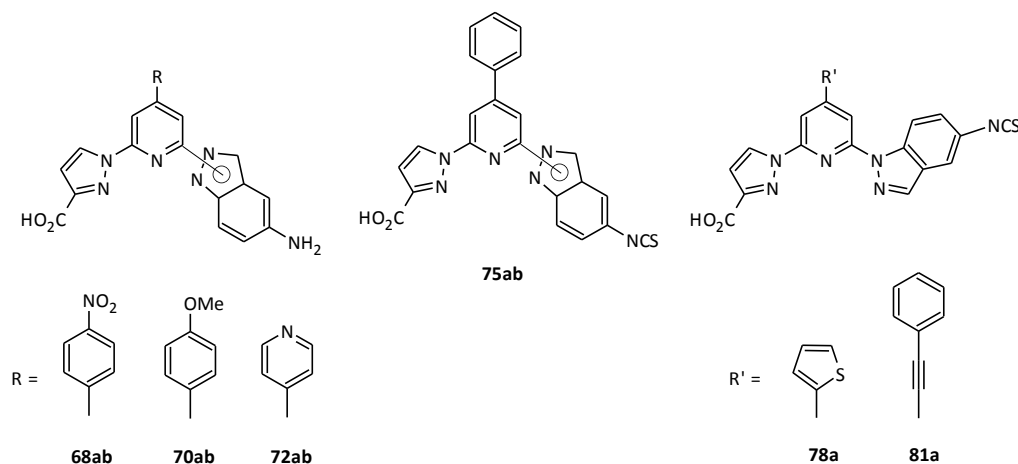


Figura 63.- Ligandos disustituidos constituidos por 5-aminoindazol/3-carboxipirazol

Recordemos que los productos obtenidos para esta familia de compuestos corresponden a la mezcla de los dos isómeros posibles, resultantes de la casi equivalente reactividad de ambos tautómeros y la imposibilidad de su separación y aislamiento en la práctica totalidad de los casos, resultando los isómeros mostrados en la Figura 63, por lo que los resultados mostrados a continuación corresponden en cuatro de los productos a los estudios realizados con la mezcla de isómeros. Aunque en el estudio de emisión llevado a cabo, no se sabe cuál de los dos isómeros presenta mayor contribución o es mejor sensibilizador, su mezcla como tal podría ser útil para aplicaciones luminiscentes sin que sea necesaria, en un principio, su separación.

Un último punto a considerar en este estudio es que parte de los ligandos estudiados son derivados amino sobre el anillo de indazol y como se ha discutido en el caso de los

ligandos monosustituidos, los grupos amino pueden producir efectos de extinción de la fosforescencia por fenómenos de transferencia electrónica fotoinducida (PET). En este sentido el estudio se ha ampliado con derivados isotiocianato para comprobar la variación entre ambos sustituyentes. De nuevo resulta necesario subrayar que el estudio tiene interés desde el punto de vista comparativo del efecto producido por el sustituyente en posición 4 de la piridina, ya que el cromóforo que finalmente será responsable de la sensibilización del lantánido será el grupo tiourea que se genera entre el grupo isotiocianato y el grupo amino introducido sobre alguna de las bases del oligonucleótido.

La Tabla 26 recoge los datos de emisión más significativos de los complejos preparados con las parejas de isómeros, la longitud de onda de excitación empleada, la intensidad de emisión, así como los tiempos de vida ( $\tau$ ).

		$I_{em}$ (u.a.)	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\tau$ (ms)
<b>-NH<sub>2</sub></b>				
<b>68ab</b>	<b>12C4-Eu</b>	< 5	315	-----*
	<b>15C5-Tb</b>	35	292	0,74
<b>70ab</b>	<b>12C4-Eu</b>	8	319	0,30
	<b>15C5-Tb</b>	50	326	0,70
<b>72ab</b>	<b>12C4-Eu</b>	5	320	0,28
	<b>15C5-Tb</b>	34	293	0,81
<b>-NCS</b>				
<b>75ab</b>	<b>12C4-Eu</b>	15	332	0,31
	<b>15C5-Tb</b>	45	285	0,86
<b>78a</b>	<b>12C4-Eu</b>	25	340	0,32
	<b>15C5-Tb</b>	35	290	0,83
<b>81a</b>	<b>12C4-Eu</b>	13	309	0,34
	<b>15C5-Tb</b>	25	309	0,76

\* No se ha podido registrar debido a la baja intensidad

Tabla 26.- Longitudes de onda de excitación, intensidades y tiempos de vida

Los tiempos de vida están en el rango esperado para estos complejos y ligeramente por encima de los hallados anteriormente para los ligandos monosustituidos, lo que resulta coherente con el aumento de posiciones de coordinación que presentan estos ligandos disustituidos aportadas por el nuevo heterociclo.

Los espectros de excitación de los compuestos estudiados muestran un comportamiento complejo que se manifiesta por un lado en la existencia en algunos casos de máximos de excitación poco definidos y, sobre todo en el caso del Tb(III), en longitudes de onda de excitación no concordantes con las esperadas para estos cromóforos, en los que como se ha venido observando para los compuestos con un

anillo de indazol, los máximos de excitación están desplazados hacia el rojo con longitudes de onda en torno a los 320 nm.

En la Figura 64 se muestran ejemplos de los comportamientos aludidos; la aparición de máximos de excitación con poca definición, en los que puede observarse que es posible una excitación efectiva en un intervalo amplio de longitudes de onda (300-350 nm). Este comportamiento se debe a que los complejos formados con ambos ligandos isómeros tienen máximos de excitación diferentes ya que como se discutió en su preparación, había una gran diferencia cromática entre ambos ligandos con separación de máximos de absorción entre ambos isómeros.

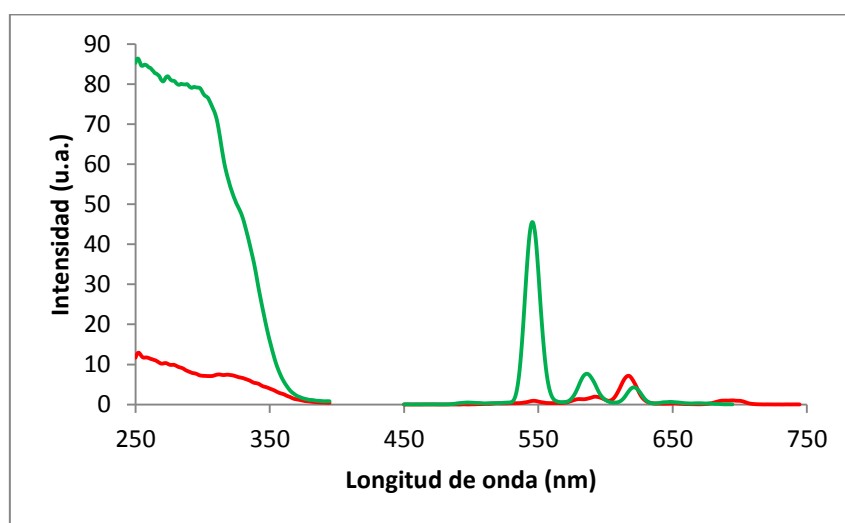


Figura 64.- Espectros de excitación y emisión de los complejos de Eu(III) y Tb(III) obtenidos con el ligando **70ab**

El comportamiento de los complejos de Tb(III) muestra emisiones siempre superiores a las de Eu(III) aunque los máximos de excitación no se corresponden a los característicos esperados para estos ligandos ya que se trata de valores muy bajos, en torno a 290 nm, por lo que estos espectros parecen corresponder a la excitación directa del Tb(III) (ver figura 64). La no existencia de sensibilización por parte del ligando en el caso de los complejos de Tb(III) no parece que pueda ser debida a la no formación de los complejos ya que en el resto de los ligandos estudiados con este método se observa la formación de complejos, por lo que la causa más factible es la posible extinción de la emisión por parte del grupo amino, aunque sí que se observa emisión por excitación directa, pudiendo ser también la causa, la de que los niveles triplete para la transferencia de energía hacia el terbio estén situados energéticamente por debajo de los niveles emisivos para este ion y que habitualmente se consideran inadecuados cuando se encuentran por debajo del nivel  $^5D_4$  situado en torno a 20500

$\text{cm}^{-1}$ . Sin embargo, la determinación de los niveles triplete para estos ligandos tiene una dificultad añadida y es que se trata de una mezcla, por lo que cada uno de los ligandos isómeros debería de dar una transición 0-0 distinta, lo que complica la detección de estas transiciones en los espectros. En la Figura 65 se muestra un espectro tipo para uno de los complejos de Gd(III) llevados a cabo y donde se puede comprobar este comportamiento.

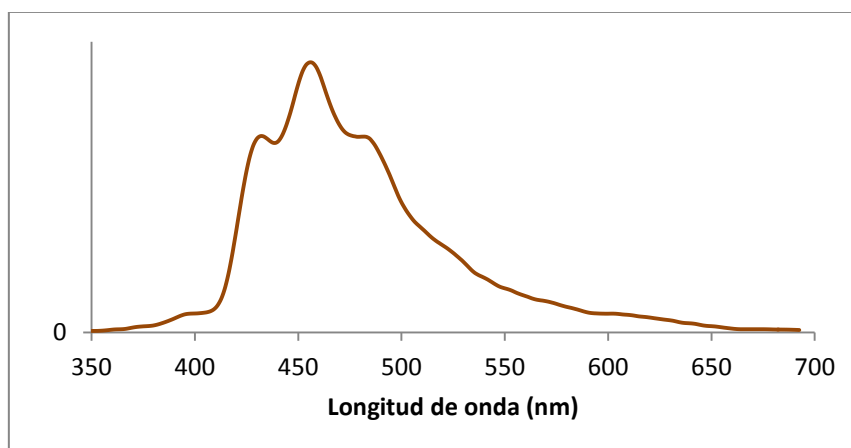


Figura 65.- Espectro de fosforescencia del complejo de Gd(III) con el ligando **72ab**

A pesar de las dificultades en su determinación, no existe en ninguno de los complejos de Gd(III) estudiados para esta familia de compuestos, posibles estado triplete situados por debajo de  $22000 \text{ cm}^{-1}$ , por lo que la ausencia de sensibilización con estos ligandos no tiene una explicación con los datos analizados hasta ahora siendo a pesar de haber logrado en dos casos la separación de los dos isómeros, dando como resultado posibles estado triplete en el mismo rango que los observados en las mezclas ( $\approx 23500 \text{ cm}^{-1}$ ).

En el caso de los complejos con Eu(III) en los que si se observa la sensibilización por parte de los ligandos se observan valores bajos en el caso de los sustituyentes con carácter electrón-atrayente, así los sustituyentes 4-nitrofenilo (**68**) y piridina (**72**) muestran valores inferiores a los del resto de los sustituyentes. También cabe destacar el mayor valor de la emisión producida por un sustituyente electrodonador, como el 4-metoxifenilo respecto del fenilo sin sustituir. Este comportamiento de los grupos metoxilo ha sido observado en otros compuestos preparados en nuestro laboratorio.<sup>168</sup> De nuevo para estos compuestos no es posible una correlación con sus

<sup>168</sup> Paloma Martínez Martín, Trabajo fin de Grado; Arturo Gamonal Ruiz-Crespo, Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. 2015.

estados triplete debido a la imposible asignación de estos niveles para cada uno de los ligandos en la mezcla.

En el caso de los ligandos **78a** y **81a** los máximos recogidos para Eu(III) se sitúan a 340 y 309 nm respectivamente, aunque las bandas son muy anchas y hay emisión en un rango muy elevado de longitudes de onda en torno a estos valores.

A la vista de estos resultados el estudio de estas mezclas no tiene, en consecuencia, validez para el estudio de sus propiedades, aunque sí queda abierta la posibilidad de estudiar su comportamiento en reacciones de hibridación con oligonucleótidos marcados con la mezcla.

No obstante, dada la preparación análoga de los ligandos disustituídos para la familia de los derivados bisindazólicos se completa el estudio para estos, en los que como punto de interés adicional, tal y como se discutió en su síntesis fue posible la separación, en un caso, de los dos isómeros tautoméricos obtenidos.

#### - **Ligandos disustituídos 5-aminoindazol / 3-carboxiindazol**

Como se acaba de ver, los resultados de la doble sustitución del anillo piridínico por pirazol e indazol ofrecen buenos resultados para Eu(III) pero no para Tb(III).

El siguiente paso para intentar mejorar estas propiedades consiste en la doble sustitución con grupos indazol, en el que uno de ellos presenta también un grupo amino que puede transformarse en un punto de anclaje a un oligonucleótido si es necesario, mientras que el otro grupo indazol presenta el grupo carboxilato necesario para actuar como centro de coordinación al ion lantánido.

Por tanto, esta segunda familia de ligandos doblemente sustituidos presentan como estructura general dos anillos indazólicos, uno con un grupo amino en posición relativa 5 y otro un grupo carboxilato en la posición 3 (Figura 66).



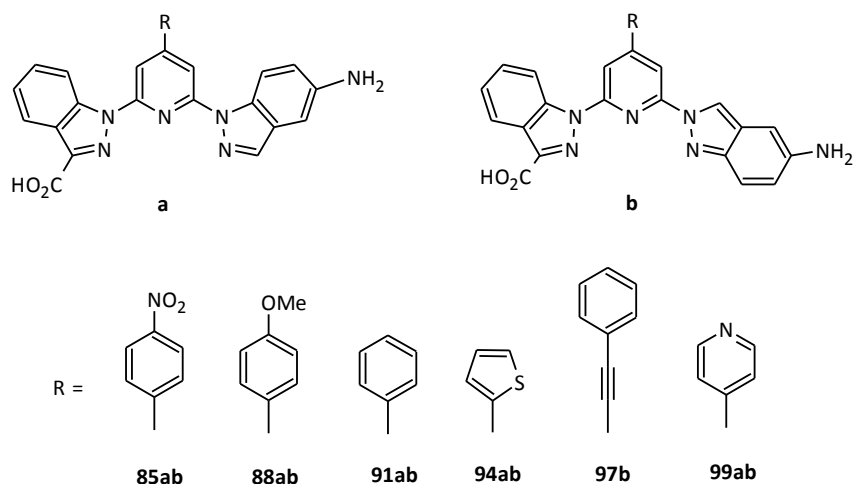


Figura 66.- Ligandos disustituidos constituidos por 5-aminoindazol/3-carboxiindazol

Todos los productos obtenidos corresponden a la mezcla isómera de los dos productos posibles, el unido por el nitrógeno en posición 1 del indazol y el unido por la posición 2, por lo que los resultados mostrados corresponden a la mezcla de isómeros, excepto para el caso del ligando que presenta el sustituyente feniletinilo (**97b**) que corresponde al regioisómero 2,5.

En la Tabla 27 se recoge la longitud de onda de excitación empleada, la intensidad de emisión, así como los tiempos de vida ( $\tau$ ) para los complejos estudiados.

		$I_{em}$ (u.a.)	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\tau$ (ms)
<b>85ab</b>	<b>12C4-Eu</b>	15	318	0,29
	<b>15C5-Tb</b>	40	289	0,89
<b>88ab</b>	<b>12C4-Eu</b>	23	320	0,30
	<b>15C5-Tb</b>	25	334	0,55
<b>91ab</b>	<b>12C4-Eu</b>	7	321	0,28
	<b>15C5-Tb</b>	10	336	0,66
<b>94ab</b>	<b>12C4-Eu</b>	25	319	0,28
	<b>15C5-Tb</b>	39	292	0,85
<b>97b</b>	<b>12C4-Eu</b>	55	320	0,31
	<b>15C5-Tb</b>	130	334	0,55
<b>99ab</b>	<b>12C4-Eu</b>	6	311	-----*
	<b>15C5-Tb</b>	23	289	0,92

\* No se ha podido registrar debida a la baja intensidad

Tabla 27.- Longitudes de onda de excitación, intensidades y tiempos de vida

La tendencia general observada es una mejor emisión de los complejos de Tb(III) que de los de Eu(III) aunque de modo distinto a la familia anterior de ligandos pirazol-indazol, en los que la emisión observada no provenía del ligando sino del terbio. En este caso, este comportamiento se observa para los compuestos **85ab**, **94ab** y **99ab**, el resto de los compuestos presenta el comportamiento esperado, en el que los máximos de excitación están centrados en el ligando (Figura 67).

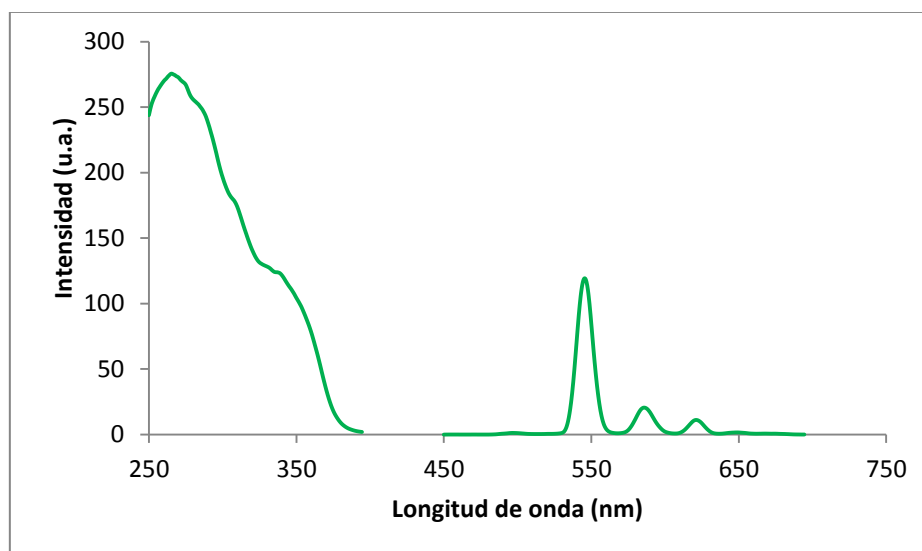


Figura 67.- Espectros de excitación y emisión del complejo de Tb(III) con el ligando **97b**

De nuevo, el comportamiento observado para estos complejos de Tb(III) podría ser debido al efecto desactivante del grupo amino por PET o a un nivel triplete de energía demasiado bajo que provoque la retrotransferencia de energía Tb(III)→Ligando, observada cuando se cumplen estas circunstancias.<sup>169</sup>

Cuando se forman los complejos con los ligandos **91ab** se observa que para el caso del Eu(III) aparecen dos máximos en el espectro de excitación situados a 321 y 336 nm (Figura 68). En este tipo de ligandos se hace más evidente la isomería de los productos sintetizados desde el punto de vista de la excitación de sus complejos de europio; es decir, que existe una importante manifestación de la diferente distribución electrónica entre ambos isómeros con distintas transiciones  $\pi$ - $\pi^*$ , siendo ambas en este caso capaces de la sensibilización del Eu(III). Por otro lado, en el complejo de Tb(III) formado con este mismo ligando se observan asimismo dos máximos, aunque en este caso uno de ellos corresponde a la excitación directa del terbio con un máximo a 287 nm,

<sup>169</sup> G. Blasse, G. Dirksen, N. Sabbatini, S. Perathoner, J.-M. Lehn, B. Alpha, *J. Phys. Chem.*, **1988**, *92*, 2419.

mientras que sí que aparece ahora otra excitación a 336 nm que ahora sí que corresponde a la emisión por sensibilización del ligando.

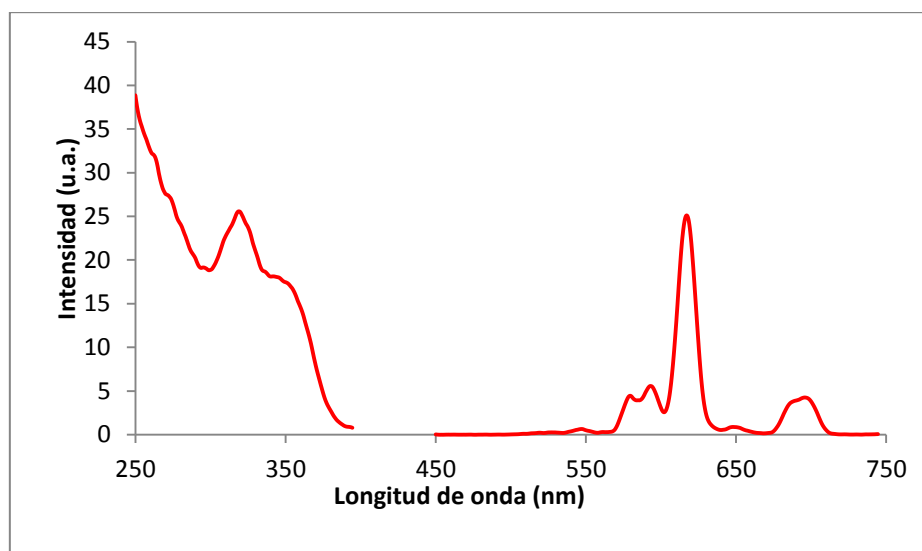


Figura 68.- Espectros de excitación y emisión del complejo de Eu(III) de la mezcla isómera **91ab**

Los complejos con el sustituyente metoxifenilo (**88ab**) muestran resultados similares. En el complejo de Eu(III) aparece un máximo situado a 320 nm aunque la amplitud de la banda no descarta que exista otro situado a mayor longitud (se intuye un hombro situado en 338 nm) y que tendría su origen en el otro isómero. En el caso del complejo con Tb(III), aparece como máximo el debido a la corona (290 nm) y un hombro situado a 334 nm de modo similar al espectro recogido en la Figura 67 para los complejos con **97b**.

Para los complejos de Eu(III) y Tb(III) con el ligando **97**, que corresponde a un único isómero (isómero 2, **97b**), se observa una banda muy ancha y centrada a 335 nm que indica, de nuevo, la emisión por parte del complejo. Este resultado procede de un único isómero, por lo que a la vista de este resultado individual se puede afirmar que los valores de los ligandos derivados del isómero 5-amino-2-indazol muestran sus bandas a mayores longitudes de onda (335 nm), mientras que aquellos derivados del 5-amino-1-indazol se sitúan sobre los 315-320 nm como se concluye a la vista de los resultados de las muestras isómeras.

Puesto que para este ligando se ha conseguido aislar uno de los isómeros (**97b**), se realiza la medida de su estado triplete correspondiente a la transición 0-0, cuyo espectro se muestra en la Figura 69. Esta transición se encuentra en el valor de 22170  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde al intervalo entre los niveles emisivos del Europio  $^5\text{D}_2$  y  $^5\text{D}_3$ , más próxima a  $^5\text{D}_2$  que cuando existe mezcla isómera que se sitúan cerca de  $^5\text{D}_3$ .

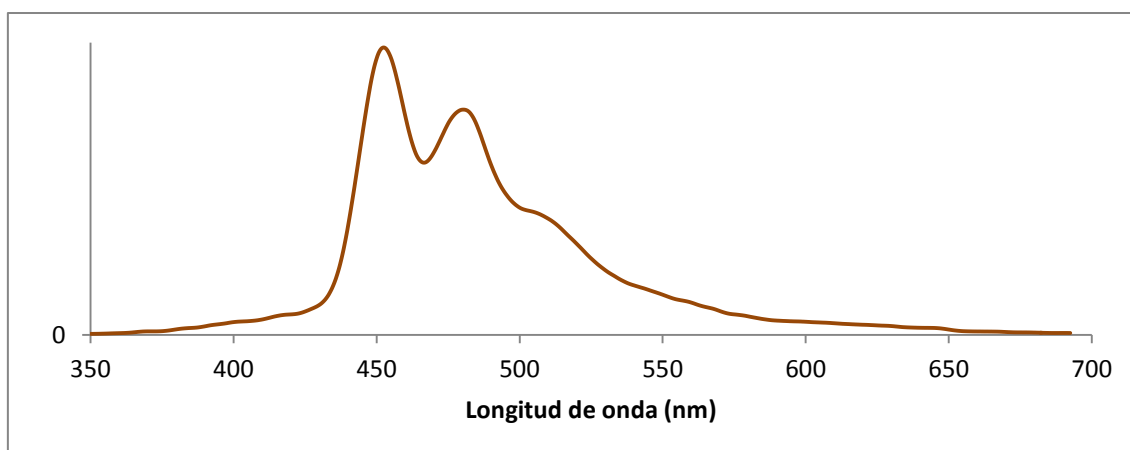


Figura 69.- Espectro de fosforescencia del complejo de Gd (III) con el ligando **97b**

A modo de resumen, los mejores ligandos son aquellos que tienen como sustituyentes al grupo 4-metoxifenilo (**88ab**) y feniletinilo (**97b**). La determinación de los estados triplete encuentra de nuevo los problemas mencionados anteriormente, en los que la mezcla de isómeros existente impide una localización precisa de los niveles 0-0 y su asignación a los isómeros presentes.

A la vista de estos resultados y aunque alguno de los productos más interesantes de ambas series podrían ser candidatos, por los resultados de emisión obtenidos, para reacciones de hibridación con los oligonucleótidos marcados con ellos, se aborda a continuación el estudio con la última familia de productos preparados en esta memoria, en la que se consiguen aislar los isómeros en las reacciones para la introducción del isómero 6-aminoindazol sobre el anillo de piridina.

#### - Ligandos disustituídos 6-aminoindazol / 3-carboxiindazol

La imposibilidad para separar los isómeros obtenidos usando el 5-aminoindazol hace surgir la idea de cambiar al isómero 6-aminoindazol para tratar de conseguir su aislamiento y, que como se ha visto en los resultados y discusión de la parte sintética, se lleva a cabo de manera exitosa siendo éste el motivo para la síntesis de esta última familia de ligandos.

El estudio fotofísico se realiza de manera similar a la descrita hasta aquí, para comparar el comportamiento y resultado de ambos isómeros. Los ligandos estudiados mediante esta metodología se muestran en la Figura 70.

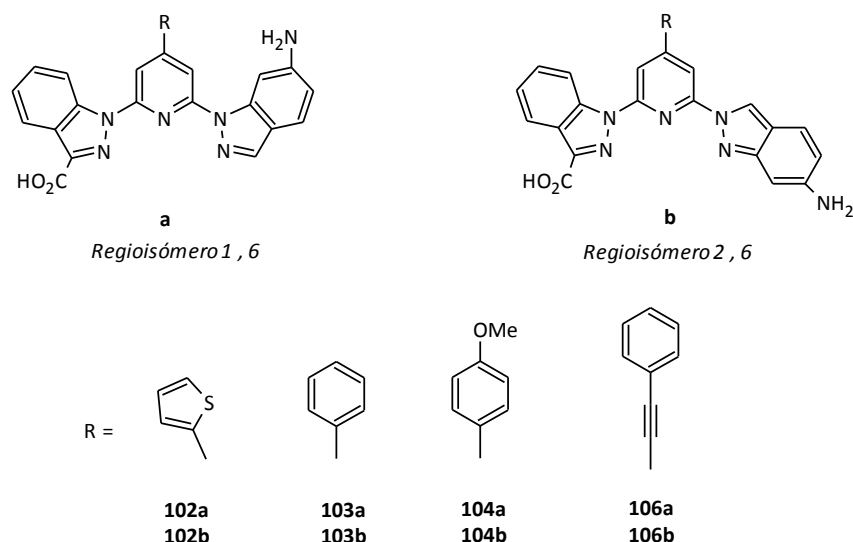


Figura 70.- Ligandos disustituidos constituidos por 6-aminoindazol/3-carboxiindazol

#### • Isómeros 6-amino-1-indazolil

Los espectros de ultravioleta de todos los complejos formados son muy similares para ambos lantánidos, Eu(III) y Tb(III), sin embargo, éstos difieren notablemente de sus espectros de excitación, en los que los máximos de excitación observados aparecen a longitudes de onda superiores a los máximos de absorción de los complejos (ver ejemplo del ligando **102a** en la Figura 71).

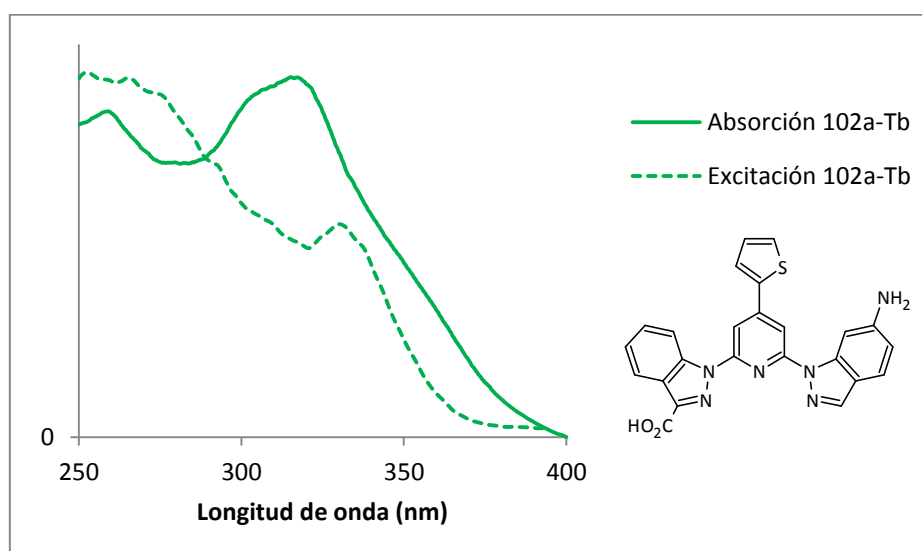


Figura 71.- Espectros de absorción y de excitación para el ligando **102a** con Tb(III)

Esto es debido a la contribución ejercida por todos los componentes orgánicos que constituyen el complejo. En los espectros de fosforescencia de todos los complejos sí se observa la emisión del lantánido provocada por la excitación del ligando, cuyo máximo de excitación se corresponde con la presencia de un hombro en el espectro de absorción.

Todos los complejos muestran máximos de excitación en el entorno de los 330 nm, como corresponde y se había observado en los ligandos con anillos indazólicos. En la Tabla 28 se recoge la longitud de onda de excitación empleada, la intensidad de emisión observada, así como los tiempos de vida ( $\tau$ ) para los complejos estudiados.

		$I_{em}$ (u.a.)	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\tau$ (ms)
<b>102a</b>	<b>12C4-Eu</b>	9	335	0,24
	<b>15C5-Tb</b>	15	330	1,10
<b>103a</b>	<b>12C4-Eu</b>	8	331	0,32
	<b>15C5-Tb</b>	20	328	0,82
<b>104a</b>	<b>12C4-Eu</b>	8	328	0,21
	<b>15C5-Tb</b>	11	331	0,53
<b>106a</b>	<b>12C4-Eu</b>	234	340	0,21
	<b>15C5-Tb</b>	349	340	0,53

Tabla 28.- Longitudes de onda de emisión/excitación, intensidades y tiempos de vida

En general, las intensidades obtenidas con estos ligandos son bajas, pero en todos los casos se forman los complejos con Eu(III) y Tb(III). Nuevamente, la tendencia general observada es una mejor emisión de los complejos de Tb(III) que de los de Eu(III) del mismo modo que la familia anterior de ligandos indazol-indazol 5.

En todos los casos, los compuestos presentan el comportamiento esperado independientemente de que sea Eu(III) o Tb(III), tal y como se muestra en la Figura 72. En ella se observa un amplio rango de excitación procedente del ligando.

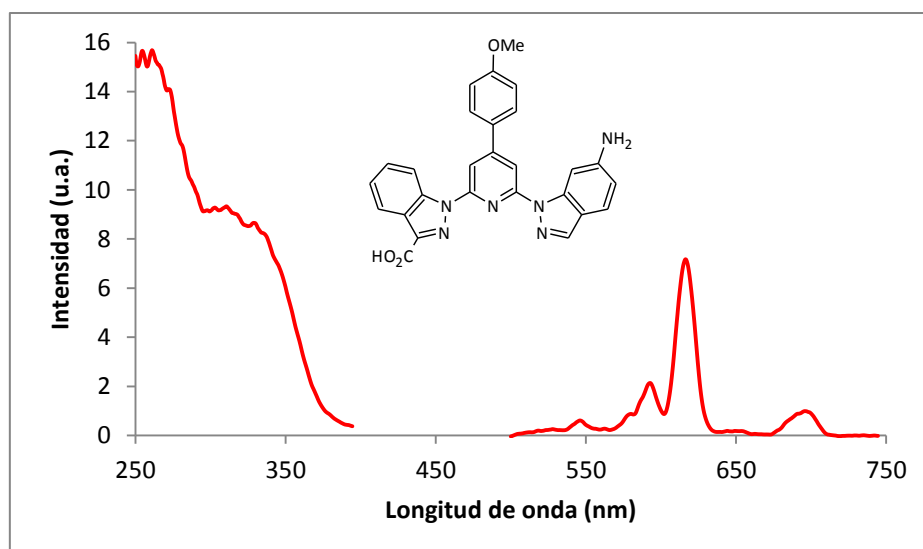


Figura 72.- Espectros de excitación y emisión del complejo de Eu(III) con el ligando **104a**

Cuando se forman los complejos con el ligando **106a** se observa para ambos lantánidos la aparición de dos máximos en el espectro de excitación situados a 307 y 340 nm (Figura 73), hecho similar al observado en el ligando **91ab** de la familia anterior (Figura 68) y que es debida a la diferente distribución electrónica entre ambos anillos indazólicos con distintas transiciones  $\pi-\pi^*$ , siendo ambas capaces de la sensibilización del Ln (III), además de la contribución del sustituyente feniletinilo.

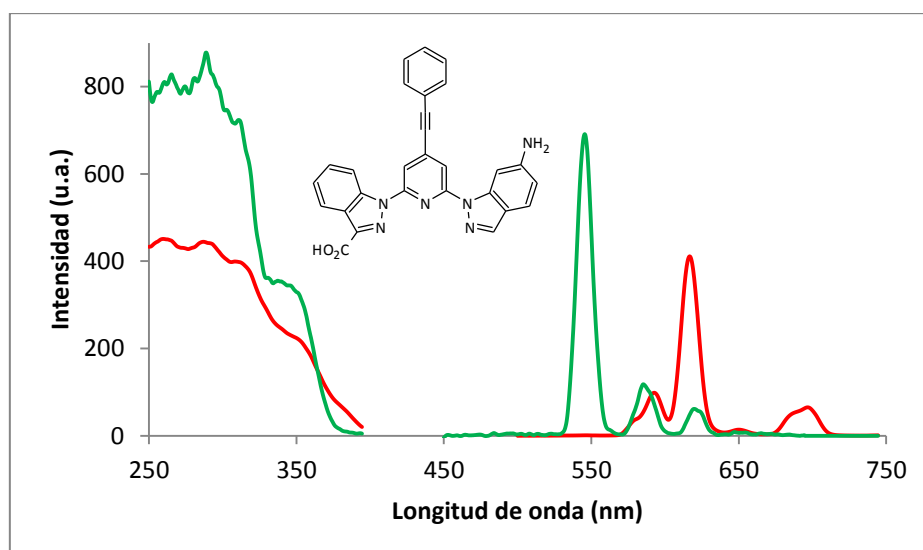


Figura 73.- Espectros de excitación y emisión de los complejos de Eu(III) y Tb(III) obtenidos con el ligando **106a**

A la vista de los resultados para los ligandos que contienen el isómero 6-amino-1-indazol, el sustituyente que mejor comportamiento luminiscente presenta el feniletinilo (**106a**) tanto para Eu(III) como para Tb(III).

- **Isómeros 6-amino-2-indazolil**

Esta serie de ligandos constituidos por el 6-amino-2-indazol presenta un comportamiento similar a los isómeros discutidos anteriormente. Los espectros de ultravioleta de todos los complejos formados son muy parecidos para ambos lantánidos, Eu(III) y Tb(III).

Los máximos de excitación observados aparecen a longitudes de onda similares a los máximos de absorción de los complejos para el caso del ligando **102b** (Figura 74), pero en el resto de casos los máximos de excitación corresponden a un hombro en el espectro de absorción, tal y como sucedía con los 6-amino-1-indazolil derivados.

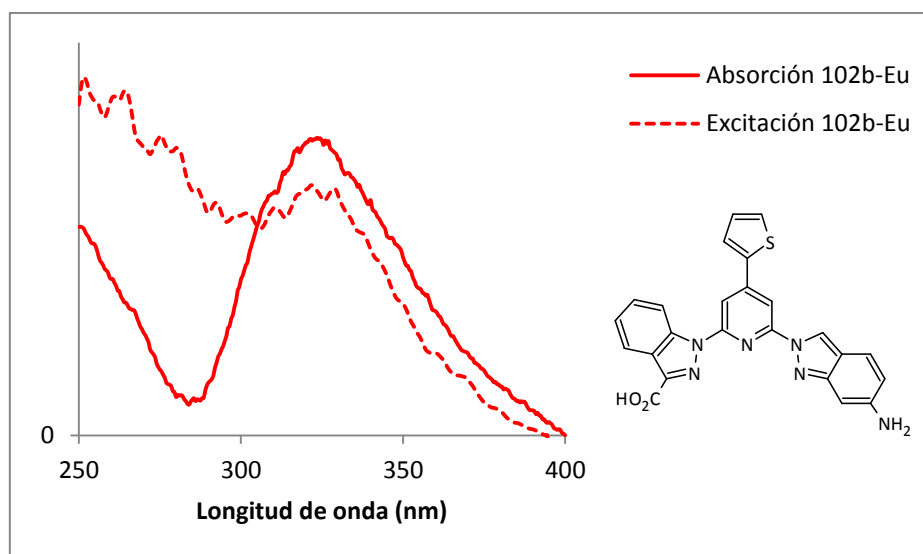


Figura 74.- Espectros de absorción y de excitación para el ligando **102b** con Eu(III)

Nuevamente, todos los complejos muestran máximos de excitación en el entorno de los 325-330 nm, como corresponde a los ligandos indazólicos. En la Tabla 29 se recoge la longitud de onda de excitación empleada, la intensidad de emisión observada, así como los tiempos de vida ( $\tau$ ) para los complejos estudiados.



		$I_{em}$ (u.a.)	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\tau$ (ms)
109	12C4-Eu	< 5	323	0,25
	15C5-Tb	15	323	0,64
110	12C4-Eu	< 5	335	0,31
	15C5-Tb	7	335	0,82
111	12C4-Eu	< 5	324	0,28
	15C5-Tb	6	323	0,63
113	12C4-Eu	12	322	0,28
	15C5-Tb	42	333	0,63

Tabla 29.- Longitudes de onda de emisión/excitación, intensidades y tiempos de vida

De nuevo, la tendencia general observada es una mejor emisión de los complejos de Tb(III) que de los de Eu(III) al igual que sucedía con los isómeros 6-amino-1-indazoles, y en todos los casos se observa emisión por sensibilización del ligando del ligando (Figura 75). Sin embargo, la emisión observada para estos isómeros es inferior a la observada para los ligandos isómeros de la serie anterior 6-amino-1-indazol.

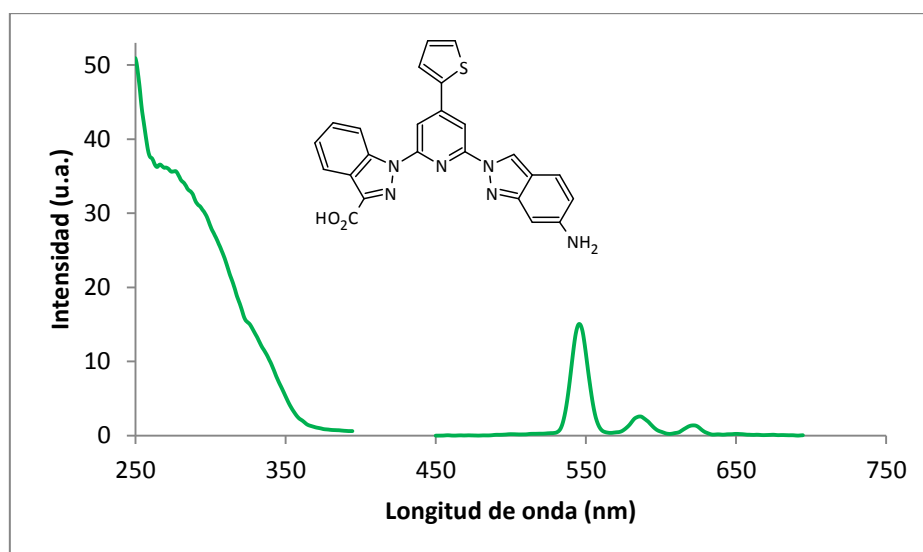


Figura 75.- Espectros de excitación y emisión del complejo de Tb(III) con el ligando **102b**

Una vez comentados los resultados relativos a ambas series por separado, se realiza a modo de resumen una comparación conjunta de intensidades obtenidas con el fin de determinar el comportamiento de ambas parejas isómeras (Figura 76).

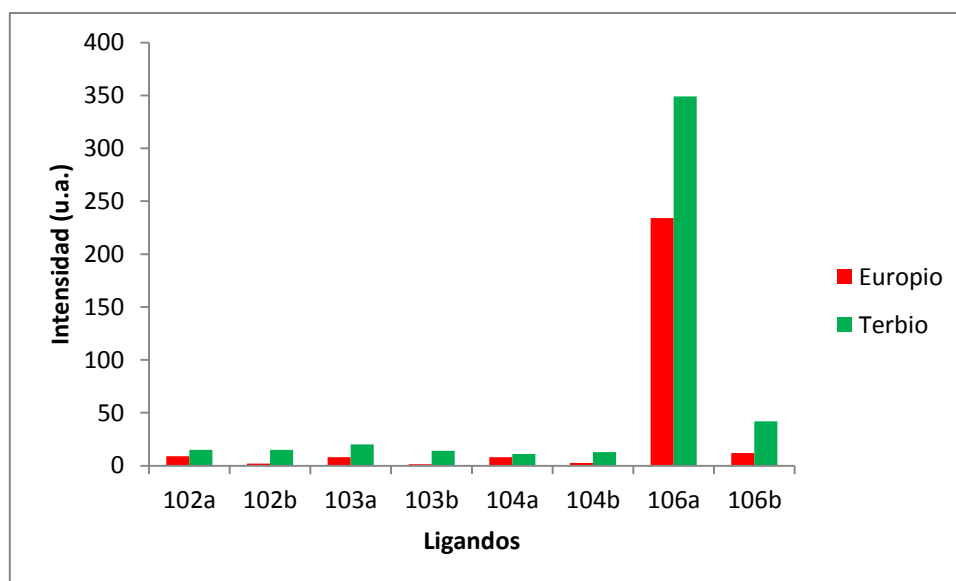


Figura 76.- Resultados de la emisión luminiscente para los derivados 6-aminoindazolil derivados

Como se ha comentado, los ligandos que contienen al 6-amino-1-indazol en su estructura (**102a**, **103a**, **104a** y **106a**) presentan mayores intensidades que aquellos derivados del 6-amino-2-indazol (**102b**, **103b**, **104b** y **106b**), con longitudes de onda de excitación ligeramente superiores en los primeros, como pauta general.

En cuanto al lantánido, los mejores resultados se obtienen para el Tb(III) y con respecto al sustituyente, claramente el que mejores resultados ofrece es el feniletinilo (**106a** y **106b**) siendo el ligando más interesante el complejo de Tb(III) con el anillo 6-amino-1-indazol (**106a**).

A la vista de la consistencia de los resultados obtenidos mediante este último método usando los éteres corona como constituyentes macrocíclicos para la encapsulación de los iones lantánidos, puede establecerse como metodología definitiva para el estudio de ligandos derivados de la 4-bromo-2,6-difluoropiridina puesto que en todos los casos se produce la formación de los complejos y en muchos casos se observan prometedoras intensidades de emisión.

A pesar de haber diseñado un método para intentar establecer con la mayor precisión posible el comportamiento de todos los ligandos en el sistema final, se puede concluir que esta metodología es válida sólo para la comparación de las propiedades fotofísicas en función de los distintos sustituyentes presentes en cada familia de compuestos e intentar determinar cuáles de ellos pueden tener aplicación en el desarrollo del proyecto ACUSEP.

Algunos de los complejos pueden no haber resultado altamente luminiscentes, pero no por ello pueden ser descartados como futuros marcadores luminiscentes en la aplicación que pretende el proyecto ACUSEP puesto que, en el caso de aquellos que contienen el grupo isotiocianato, la conjugación al oligonucleótido da como resultado una tiourea que puede diferir de las propiedades cromofóricas iniciales del complejo.

Por este motivo, la determinación definitiva de la eficacia de estos ligandos como marcadores se realiza mediante las reacciones de conjugación e hibridación a los oligonucleótidos correspondientes y que se describe a continuación.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN. CONJUGACIÓN E HIBRIDACIÓN

---



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. CONJUGACIÓN E HIBRIDACIÓN

Las secuencias de ADN y ARN pueden ser reconocidas mediante una secuencia de bases complementarias a través un proceso denominado hibridación, por el que cada base se empareja con su complementaria. La presencia de filamentos perfectamente complementarios produce la hibridación entre ellos con mucha facilidad, e incluso un desajuste de un solo nucleótido puede desestabilizar la hibridación lo suficiente como para evitarla.

En teoría, se necesitan 16 pares de bases para identificar una única secuencia del tamaño de un genoma humano.<sup>170</sup> Las sondas binarias, también llamadas sondas duales, se componen de dos secuencias de oligonucleótidos que se hibridan al enfrentarse a una cadena complementaria del ácido nucleico correspondiente. Las sondas pueden modificarse, como es nuestro caso, con ligandos orgánicos sobre los ácidos nucleicos siempre que cuando se produzca la aproximación, de lugar a la formación de una señal medible, como puede ser la emisión de luz tal y como aparece representado en la Figura 77.

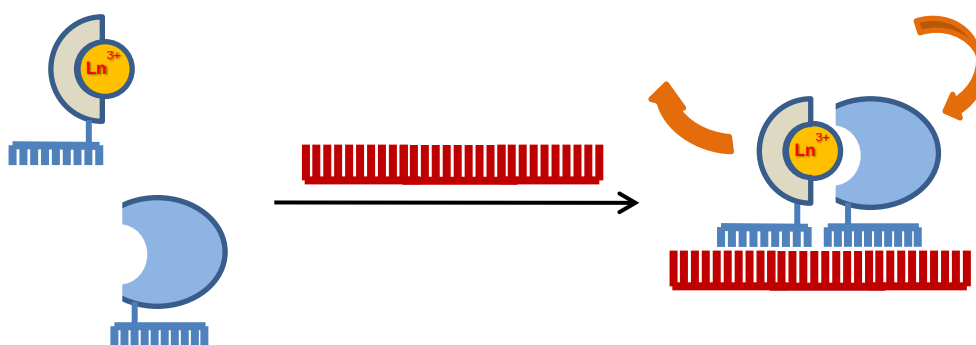


Figura 77.- Representación de una sonda binaria basada en la detección de ácidos nucleicos

La detección de una secuencia de bases usando este sistema de sonda binaria resulta interesante porque el requisito de que se tenga que producir la hibridación simultánea y adyacente de los dos fragmentos, da lugar a una alta especificidad en el reconocimiento del oligonucleótido. Con los marcadores fluorescentes, la señal puede

<sup>170</sup> Q. Liu, D.J. Segal, J.B. Ghiara, C.F. Barbas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 5525.

ser generada inmediatamente después de que las sondas se hayan hibridado con el oligonucleótido de destino.

Heller<sup>171</sup> y Cardullo<sup>172</sup> fueron los precursores en la detección binaria basada en una sonda de un ácido nucleico por transferencia de energía resonante Förster (FRET)<sup>173</sup>. Las sondas FRET binarias tienen una de las dos sondas marcadas con un fluoróforo donante y la otra con un fluoróforo aceptor. Los requisitos para la transferencia de la energía de resonancia son la proximidad de los dos fluoróforos, la superposición del espectro de emisión del donador con el espectro de excitación del aceptor, y la orientación correcta de los momentos dipolares de transición de los fluoróforos, lo que permite la detección de parejas donador y aceptor (Figura 78).<sup>174</sup> La eficiencia de la transferencia de energía disminuye rápidamente cuando aumenta la distancia entre el donador y el aceptor, estando la distancia efectiva entre un donador y un aceptor comprendida entre 10-100 Å, que corresponde a una cantidad de entre 3-30 nucleótidos en la estructura de doble hélice del ADN.

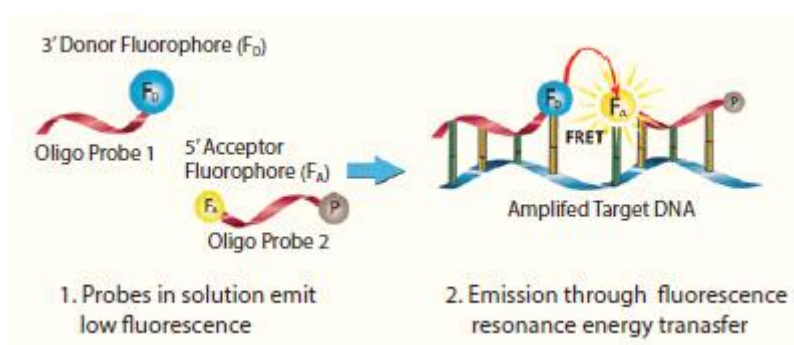


Figura 78.- Sonda binaria FRET

Hasta la fecha, nuestro grupo de investigación no había llevado a cabo ensayos de estas características por lo que ha sido necesario el apoyo de uno de los grupos participantes en el proyecto ACUSEP. Parte del trabajo realizado en este capítulo ha sido desarrollado en la Universidad de Turku, en donde efectué una estancia corta para familiarizarme con este tipo de trabajo. Este grupo, del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Turku (Finlandia), ha sido el encargado de mostrarnos los conceptos y la metodología básica necesaria para llevar a cabo los ensayos con los ligandos que se han estudiado por el momento y que suponen una prueba de

<sup>171</sup> M.J. Heller, L.E. Morrison, W.D. Prevatt, C. Akin, *EP0070685*, **1983**.

<sup>172</sup> R.A. Cardullo, S. Agrawal, C. Flores, P.C. Zamecnik, D.E. Wolf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 8790.

<sup>173</sup> T. Förster, *Ann. Phys.*, **1948**, *340*, 245.

<sup>174</sup> B. Juskowiak, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, *399*, 3157.



concepto del sistema que se pretende desarrollar de modo integrado para la determinación de bacterias responsables de sepsis.

Desde el punto de vista de la puesta a punto del método se tomó como referencia un ligando antena y un complejo de Eu<ICC> estudiado preliminarmente por el grupo de la Universidad de Turku (Figura 79).<sup>11</sup>

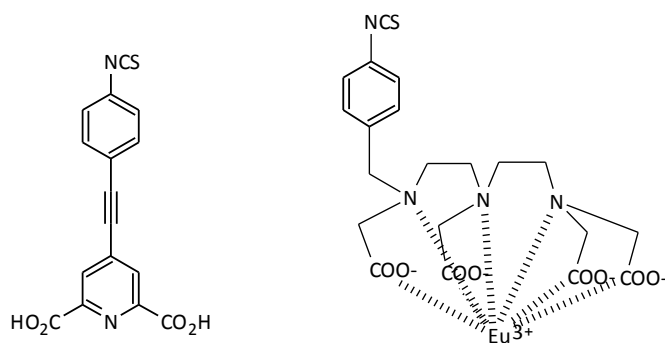


Figura 79.- Ligando de referencia e ICC

A partir de éstos se tomó el ligando derivado del ácido dipicolínico como antena de referencia en los estudios de hibridación y se perfeccionó como ligando portador del ion lantánido ICC una estructura distinta al derivado de EDTA de la figura y que se basa en un triácido de una estructura tetraazamacrocíclica de tipo DOTA (Figura 80), similar a las estudiadas en la puesta a punto de métodos para el estudio de los complejos binarios con los ligandos antena preparados, ver página 141 (Figura 45).

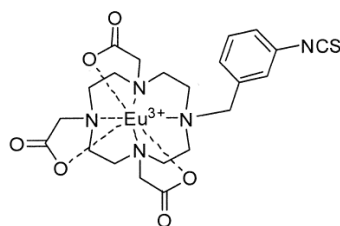


Figura 80.- Ligando portador del ion europeo (EuICC)

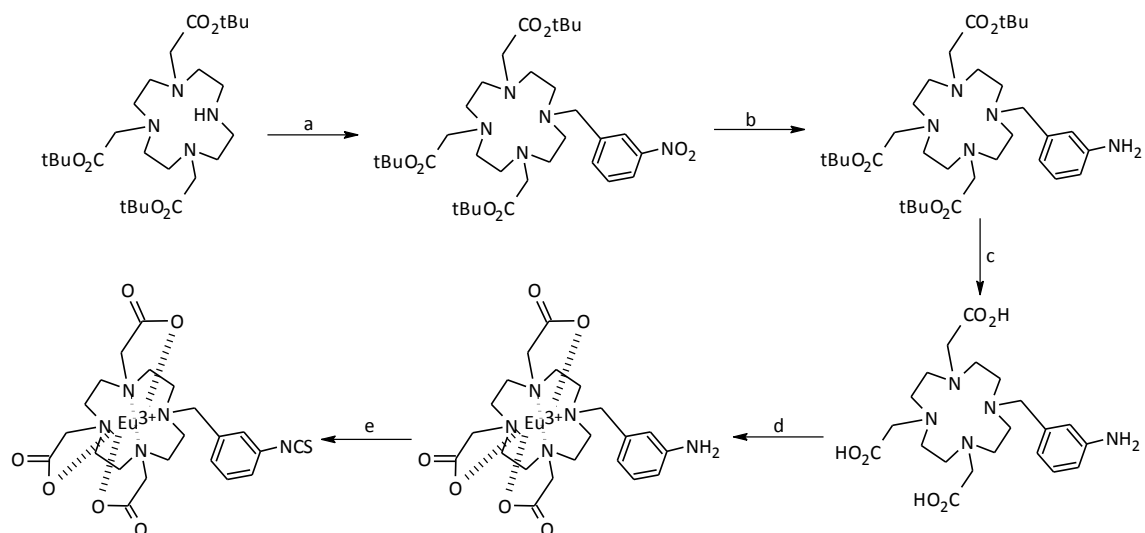
Aunque esta estructura posee un núcleo aromático que potencialmente puede ser capaz de sensibilizar la luminiscencia del lantánido, ni su intensidad de emisión ni la longitud de onda de excitación que habría que emplear suponen una interferencia en

la obtención de la señal correspondiente a la sensibilización obtenida por excitación del ligando antena. En todos los casos los análisis que se mostrarán a lo largo de este estudio restan la posible emisión de fondo de un blanco, en el que solo se haya presente el oligonucleótido marcado con este ICC, por lo que su posible emisión no perturba los resultados obtenidos.

### 5.1. Conjugación de los oligonucleótidos con el quelato portador de iones (ICC)

La existencia de un punto de anclaje para las reacciones de conjugación entre un oligonucleótido y el quelato portador de iones es un requisito de nuevo imprescindible. Este anclaje se consigue a través del grupo isotiocianato que contiene el quelato.

El producto se prepara acorde a la secuencia sintética mostrada en el Esquema 56 y en la última etapa se hace la selección del lantánido, en este caso se muestra el ICC para el caso del europio, con el cual se llevará a cabo la determinación del oligonucleótido en la reacción de hibridación.



Esquema 56.- Síntesis de complejos ICC: a) 1-(bromometil)-3-nitrobenceno,  $K_2CO_3$ , acetonitrilo; b)  $NaBH_4$ , Pd/C, metanol; c) TFA; d)  $EuCl_3$ , agua, pH 6,5; e) tiofosgeno,  $NaHCO_3$ , agua-cloroformo

Una vez sintetizado el quelato portador de iones (EuICC) es necesario determinar la concentración del lantánido (Eu o Tb) presente en él, con el fin de servir de referencia en las determinaciones de la concentración de oligonucleótido a emplear en las reacciones de hibridación.

La determinación se lleva a cabo mediante la liberación del europio presente en el quelato por incubación en ácido clorhídrico. La concentración en europio de esta disolución se determina a partir de distintas diluciones de la misma tratadas con DES (Delfia Enhancement Solution), que genera un complejo luminiscente de europio cuya concentración se mide por su emisión a 615 nm y que se correlaciona mediante un tratamiento similar de una disolución certificada de europio 1 nM.

Una vez determinada la concentración en europio del complejo ICC, se realiza la reacción de conjugación sobre el oligonucleótido. La reacción se lleva a cabo en una relación molar 1:20 de oligonucleótido e ICC con el objeto de que este exceso garantice el máximo marcaje del oligonucleótido. La secuencia empleada para los diferentes ensayos realizados ha variado a lo largo del proyecto ya que inicialmente se empleó un oligonucleótido sintético de secuencia 5'-CCTAAACATAAC-3' marcado en la base Citosina del extremo 3', mientras que conforme el proyecto avanzaba el oligonucleótido se sustituyó por otra secuencia elegida a partir del estudio realizado por la Universidad de Turku sobre diferentes bacterias causantes de sepsis y del que finalmente se eligió como característica de la cepa de *Pseudomona Aeruginosa* la secuencia 5'-GCTAACTHCGTGCCA-3'. De esta secuencia se eligió como posición de anclaje del ICC la primera base del extremo 3' cuya base Adenina se halla funcionalizada con un grupo hexilamino tal y como se recoge en la Figura 81.

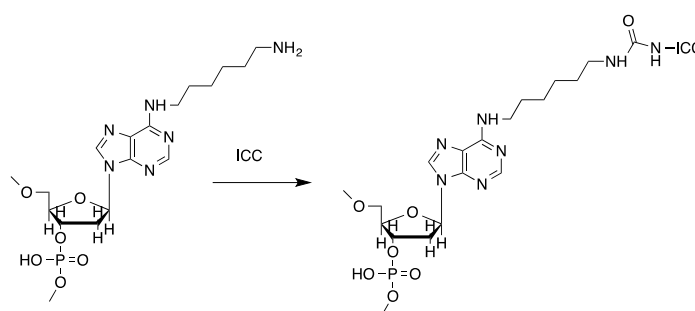


Figura 81.- Base modificada en la secuencia para el anclaje del ICC

El oligonucleótido y el complejo ICC se incuban durante toda la noche, para favorecer el desplegamiento de la cadena del ADN y que la unión quelato/oligonucleótido se realice de la manera más efectiva.

La reacción requiere de tratamiento y purificación para obtener la sonda ICC marcada. El tratamiento consiste en una filtración del bruto de reacción a través de la columna de exclusión molecular NAP-5 y posterior purificación de la fracción oligonucleotídica mediante HPLC usando como fases móviles TEAA (acetato de trietilamonio) en agua y acetonitrilo. En la Figura 82 se muestra el cromatograma de la purificación por HPLC para el quelato de Europio de la estructura de la Figura 80.

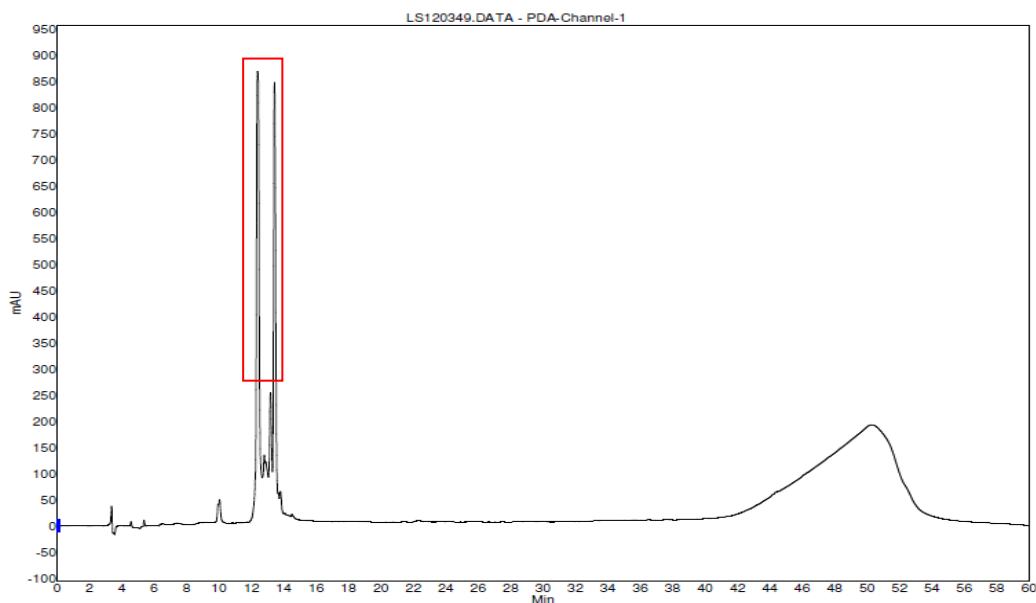


Figura 82.- HPLC del oligonucleótido marcado con el EuICC

Como se observa, hay dos picos principales además de otros más pequeños. El pico a un tiempo de retención menor, en torno a los 12 minutos (12'), corresponde al oligonucleótido sin marcar, y el de tiempo de retención mayor corresponde al oligonucleótido marcado con el complejo de europio (13,5') que será el empleado en las reacciones de hibridación.

Para determinar qué fracción de las separadas mediante HPLC puede usarse para realizar la futura reacción de hibridación es necesario conocer el grado de marcaje del oligonucleótido. El grado de marcaje consiste en una relación entre la concentración de europio que está presente en el ICC marcado y la concentración del oligonucleótido marcado, cuya relación debe ser próxima a la unidad.

En primer lugar es necesario determinar la concentración de europio en el oligonucleótido marcado. Nuevamente, se realiza una correlación con la disolución certificada de europio 1 nM registrando la intensidad a 615 nm de modo análogo al descrito anteriormente.

Para conocer la concentración del oligonucleótido marcado se realiza su espectro de ultravioleta, cuyo valor de absorbancia a 260 nm (absorción característica del ADN) permite su determinación y correlacionarla con la de europio.

## 5.2. Conjugación de los oligonucleótidos con los ligandos antena (AL)

Al igual que se ha mostrado en el caso de los complejos ICC, los ligandos antena precisan igualmente de la existencia de un punto de anclaje para las reacciones de conjugación sobre el oligonucleótido. Este punto de anclaje no está disponible en todos los ligandos preparados a lo largo de esta memoria, en la que se ha pretendido optimizar los sustituyentes en función de sus propiedades de emisión e ir ensayando alguno de ellos en los que resultaba factible ese anclaje a través del grupo isotiocianato.

En este sentido los resultados que se presentan en esta memoria abordan solamente algunos de los ligandos preparados y estos han ido produciéndose a medida que los ligandos se han sintetizado y se contaba con la colaboración de la Universidad de Turku para la realización de algunas de las reacciones y/o purificaciones. Los resultados abarcan tanto estudios iniciales empleando el complejo ICC de europio, en el que por regla general, tal y como se ha ido viendo en los estudios de complejación los ligandos son peores sensibilizadores para este ion y finalmente para alguno de los ligandos antena preparados en esta memoria sobre el complejo ICC de terbio.<sup>175</sup>

Uno de los objetivos de esta memoria trata de comprobar la viabilidad de este tipo de ligandos antena frente al ligando de referencia mostrado en la Figura 83, en el que los resultados para europio muestran que esta estructura, simétrica en cuanto a su coordinación con este ion, es muy favorable para este tipo de determinaciones aunque con limitaciones derivadas de su baja absorptividad o de la longitud de onda de excitación empleada para la emisión del europio.

---

<sup>175</sup> Estudios en colaboración realizados en la Universidad de Turku por Arturo Gamonal. Tesis doctoral UAM, 2015.

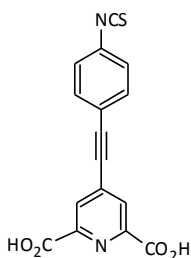


Figura 83.- Ligando de referencia desarrollado por la Universidad de Turku

La secuencia empleada para los diferentes ensayos realizados con los ligandos antena también ha variado a lo largo del proyecto. Inicialmente se empleó un oligonucleótido sintético de secuencia 5'-TGAACAGTCTGA-3' marcado en la base Timina en el extremo 5', mientras que conforme el proyecto avanzaba el oligonucleótido se sustituyó por la secuencia bacteriana 5'-CAGCCGCGTAATAC-3' marcándose en la base Citosina del extremo 5'.

Los ligandos isotiocianato ensayados se someten a un proceso similar al descrito más arriba para la conjugación del complejo ICC. El ligando se sonica en N,N'-dimetilformamida y se incuba a 50°C. La cantidad de N,N'-dimetilformamida nunca debe superar el 50% del volumen total de la reacción de conjugación (25 µL) para que el pH se mantenga básico debido a la presencia del tampón carbonato/bicarbonato sódico.

La reacción de conjugación se lleva a cabo a escala nanomolar en una relación molar de 1:100 de oligonucleótido y antena para asegurar el máximo marcaje del oligonucleótido presente.

El tratamiento del medio de reacción consiste en su filtración a través de una columna de exclusión molecular NAP-5. Con este tratamiento se consigue separar los productos de mayor peso molecular (oligonucleótido marcado con la antena y oligonucleótido que pueda quedar sin reaccionar) de los de menor peso que quedarán retenidos en ella.

La purificación de la fracción de componentes de elevado peso molecular y el aislamiento del oligonucleótido marcado se lleva a cabo mediante HPLC usando como fases móviles TEAA (acetato de trietilamonio) en agua y acetonitrilo. En la Figura 84 se muestra un cromatograma típico de la purificación por HPLC.

Como se observa, además de pequeños picos hay dos picos principales. Un pico con un tiempo de retención de 14 minutos y que corresponde al oligonucleótido sin marcar, y nuevamente un pico a mayor tiempo de retención (14,5') correspondiente al

oligonucleótido marcado, fracción que una vez recogida se cuantifica sobre la base de su contenido en ligando antena y que será usado en la reacción de hibridación.

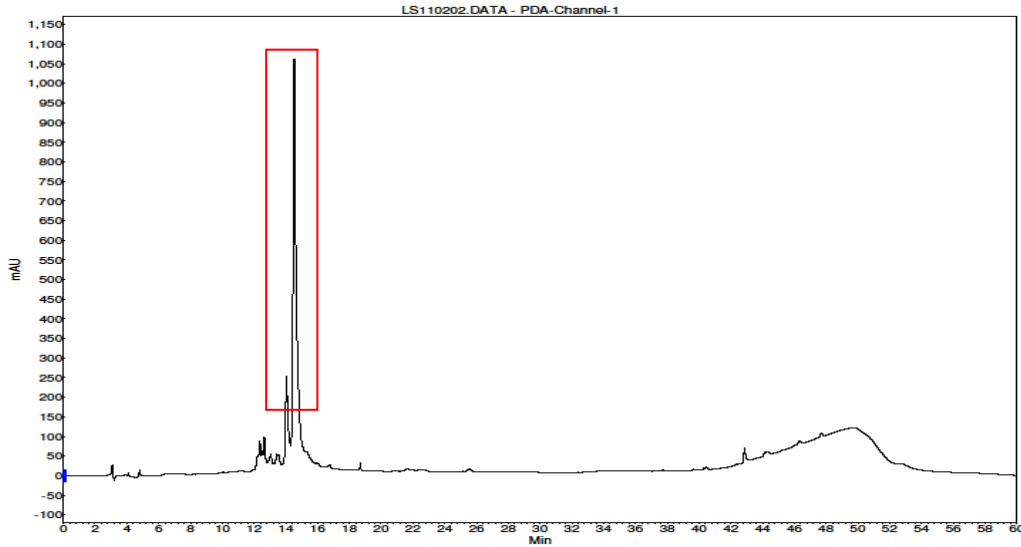


Figura 84.- HPLC del ligando antena de Turku anclado al oligonucleótido

Su concentración se mide mediante su espectro de ultravioleta, tal y como se recoge en la Figura 85. En este espectro se observan dos máximos que corresponden a la absorción de las bases nucleicas, y que está centrado a 260 nm (absorbancia del ADN) y otro a mayor longitud de onda (316 nm) que corresponde a la longitud de onda del cromóforo antena unido al oligonucleótido. Estas absorciones relativas se corresponden, en determinados valores, con el grado de marcaje de la fracción obtenida por HPLC y en consecuencia con la concentración de producto formado que se emplea para realizar la combinación con el oligonucleótido del que se desea conocer su concentración, "target", en la reacción de hibridación final.

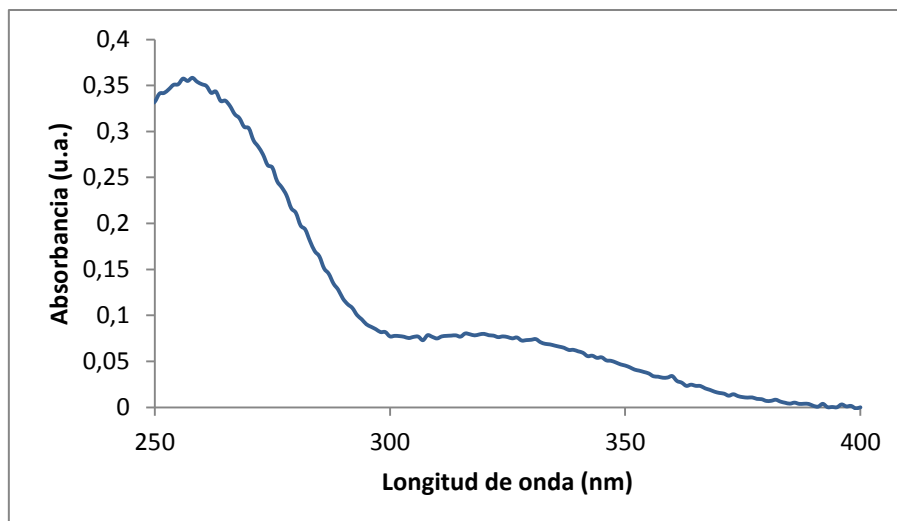


Figura 85.- Espectro UV del oligonucleótido marcado con el ligando de Turku

Las pruebas para la determinación del oligonucleótido “target”, sintético o de naturaleza bacteriana, con el oligonucleótido ICC de Europio, han sido hasta la fecha de redacción de esta memoria, las llevadas a cabo con los ligandos recogidos en la Figura 86. De igual modo se ha realizado de modo paralelo la conjugación con el ligando de referencia de la Figura 83.

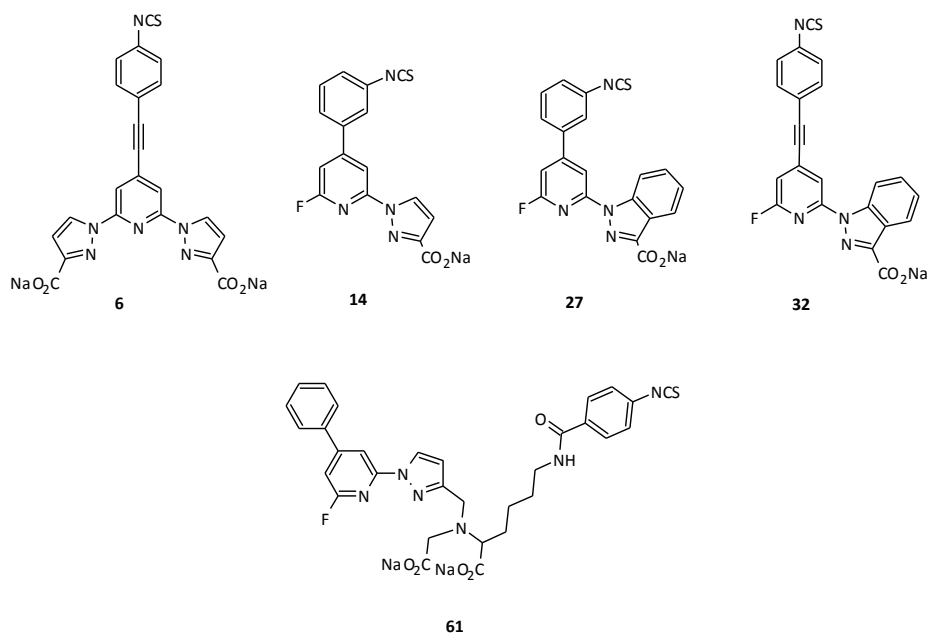


Figura 86.- Ligandos empleados en la reacción de conjugación



La conjugación de estos ligandos con el oligonucleótido se lleva a cabo en las condiciones descritas anteriormente y una vez filtrado el medio de reacción a través de la columna de exclusión molecular se obtienen los cromatogramas recogidos en la Figura 87.

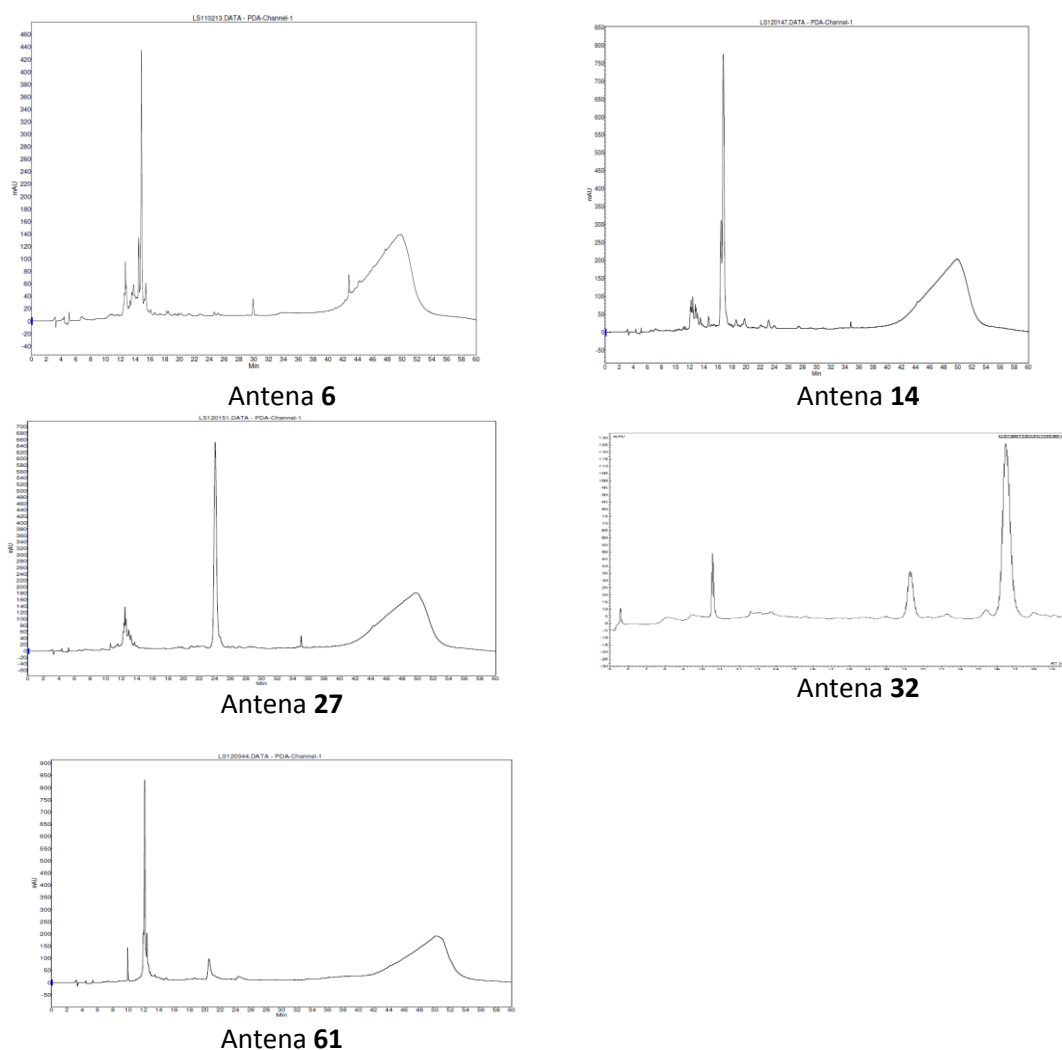


Figura 87.- HPLC de los oligonucleótidos marcados con las antenas **6**, **14**, **27**, **32** y **61**

Los cromatogramas de las cinco reacciones de conjugación son muy diferentes entre sí, lo que dificulta el proceso de selección y análisis de las fracciones cromatográficas. En el caso de la antena **6** el pico que finalmente corresponde al oligonucleótido marcado corresponde al que aparece a 14,8' tal y como se deduce a partir del análisis de ultravioleta descrito anteriormente, a partir del cual se determina también su concentración en la fracción aislada.

De igual manera en el caso de la antena **14** se observa un pico con un tiempo de retención a 16,5' que corresponde al oligonucleótido sin marcar, mientras que el pico mayoritario que aparece a 17' corresponde según su análisis al del oligonucleótido marcado.

En el caso de la antena **27** el cromatograma muestra un único pico mayoritario con un tiempo de retención muy alto en relación a los anteriores, 24', que también corresponde con el oligonucleótido marcado como se comprueba por su espectro y que será el usado para realizar la reacción de hibridación. En este caso la reacción de conjugación ha transcurrido muy favorablemente ya que no se aíslan fracciones de oligonucleótido sin marcar.

Para el caso de la antena **32** se observa un pico con un tiempo de retención a 10,5' que corresponde al oligonucleótido sin marcar, mientras que a 21,8' y 27,5' aparecen dos picos mayoritarios que corresponden según su análisis al del oligonucleótido marcado y que hay que comprobar si ambos son válidos mediante la correspondiente reacción de hibridación.

Por último, en el caso de la antena **61**, el cromatograma muestra un pico muy intenso a tiempos de retención bajos, efectivamente de las fracciones aisladas se comprueba por sus espectros UV que este pico corresponde al oligonucleótido sin marcar, mientras que el de 12,4' es el del oligonucleótido marcado con la antena.

El contraste existente en el comportamiento de la reacción de conjugación de los cuatro ligandos antena estudiados resulta difícil justificar. La distinta interacción o afinidad entre los ligandos y la cadena de oligonucleótidos podría estar detrás de este comportamiento. Ya sea la distinta interacción de los núcleos aromáticos de las antenas frente a las bases nitrogenadas o la accesibilidad del resto isotiocianato al grupo amino sobre el cual se debe producir la reacción de conjugación a la tiourea. Asimismo las grandes diferencias de tiempos de retención observados para reacciones de conjugación similares y sobre productos no excesivamente distintos entre sí, es otra de las incógnitas de estas reacciones de conjugación. El plegamiento de las cadenas de oligonucleótidos podría estar detrás de este comportamiento, ya que en todos los casos los picos aislados corresponden a oligonucleótidos marcados con las antenas, como se confirma de sus espectros de ultravioleta/visible y del porcentaje de marcaje obtenido a partir de estos espectros.

Las fracciones aisladas permiten llevar a cabo las reacciones de hibridación propuestas, aunque obviamente en caso de que este tipo de sondas resulten útiles para el objetivo perseguido, habría que optimizar las condiciones de conjugación con el fin de mejorar los rendimientos y condiciones de separación en la obtención de las sondas y su aplicación en sistemas analíticos de alto rendimiento.

### 5.3. Luminiscencia en las reacciones de hibridación

La confirmación de si un ligando es válido o no, se determina mediante la correspondiente reacción de hibridación. Dicha reacción se produce por la complementariedad de bases. Ambos fragmentos de oligonucleótidos deben encontrar su secuencia complementaria en la cadena de ADN “target” para que la reacción de hibridación sea favorable (Figura 88). Si estuviéramos frente a un caso real, esta cadena de ADN correspondería al material genético bacteriano que se ha aislado en el paciente enfermo, mientras que los dos fragmentos marcados, una vez elegido el ligando y el quelato que mejores respuestas han mostrado, estarían integrados en el cartucho comercial y corresponderían a secuencias elegidas en el estudio genómico llevado a cabo paralelamente en este proyecto y que permiten diferenciar los distintos tipos de bacterias a determinar.

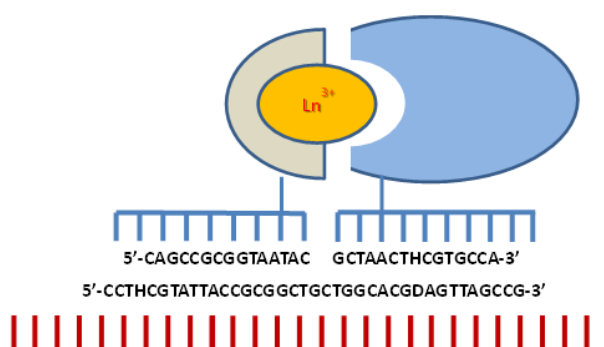


Figura 88.- Esquema de la reacción de hibridación

Inicialmente se empleó un *target* sintético de secuencia 3'-CGACAGGATTTTGTATTGAACTTGTGACTAATT-5', mientras que conforme el proyecto avanzaba este *target* se sustituyó por otra secuencia elegida a partir del estudio genético realizado por la Universidad de Turku sobre diferentes bacterias causantes de sepsis y de las que finalmente y para cada bacteria se eligieron los fragmentos más significativos, los estudios sobre ADN bacteriano se realizaron sobre una secuencia característica la cepa de *Pseudomona Aeruginosa* de fórmula 5'-CCTHCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGDAGTTAGCCG-3'.

Las reacciones de hibridación se llevan a cabo frente a concentraciones de *target* en el rango nM (0,2-20 nM). Para una correcta confirmación de emisiones de lantánido en este rango es necesario el empleo de un ligando de referencia que sirva tanto para confirmar presencia de *target* como para establecer el nivel de detección que puede lograrse con estos ligandos antena. Los resultados obtenidos con el ligando antena

referencia de la Figura 83 permiten evaluar si los ligandos sintetizados en esta memoria se comportan de manera eficiente y pueden ser candidatos para su empleo en la aplicación bioanalítica de detección de bacterias de sepsis.

A nivel de laboratorio, esta reacción se lleva a cabo preparando una disolución en la que los oligonucleótidos marcados con ICC y la antena están en cantidad equimolar, mientras que el *target* se añade en diferentes concentraciones para estudiar su respuesta mediante la emisión del lantánido sobre estas disoluciones tal y como se observa en la Tabla 30.

Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
100 nM sondas AL e ICC	100 nM sondas AL e ICC	100 nM sondas AL e ICC	100 nM sondas AL e ICC	Tampón
Tampón	0,2 nM target	2,0 nM target	20 nM target	

Tabla 30.- Disoluciones necesarias para la reacción de hibridación

Las soluciones que contienen todos los reactivos necesarios en las distintas concentraciones, se incuban durante 30' a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se mide la emisión de fosforescencia a 615 nm (Eu(III)) cuando se excita a la longitud de onda correspondiente al ligando antena (Figura 89).

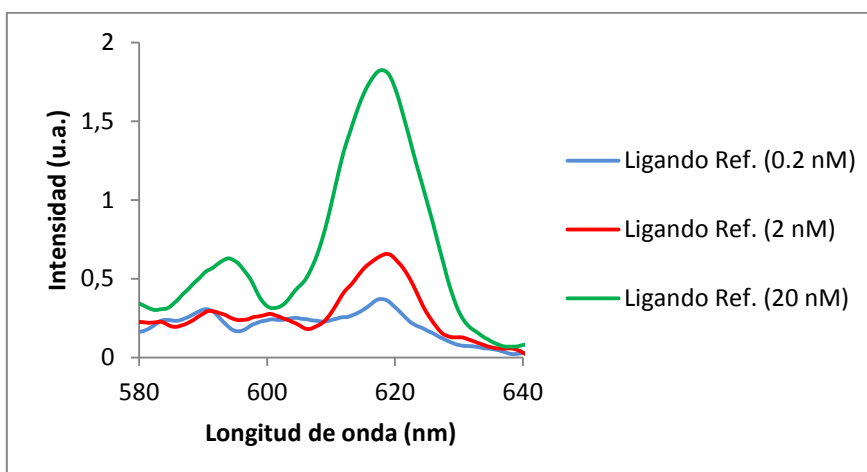


Figura 89.- Espectro de emisión de la reacción de hibridación con el ligando de referencia

Como se observa en la figura, se produce un resultado positivo de emisión a la longitud de onda de 615 nm frente a las tres diferentes concentraciones de oligonucleótido.

Los ensayos realizados con los oligonucleótidos marcados con las antenas **6**, **14**, **27** y **61** muestran espectros de emisión del mismo tipo, con intensidades muy bajas a 0,2 y 2 nM como para poder ser diferenciadas del ruido del espectro. Los resultados de emisión obtenidos se muestran en la Figura 90.

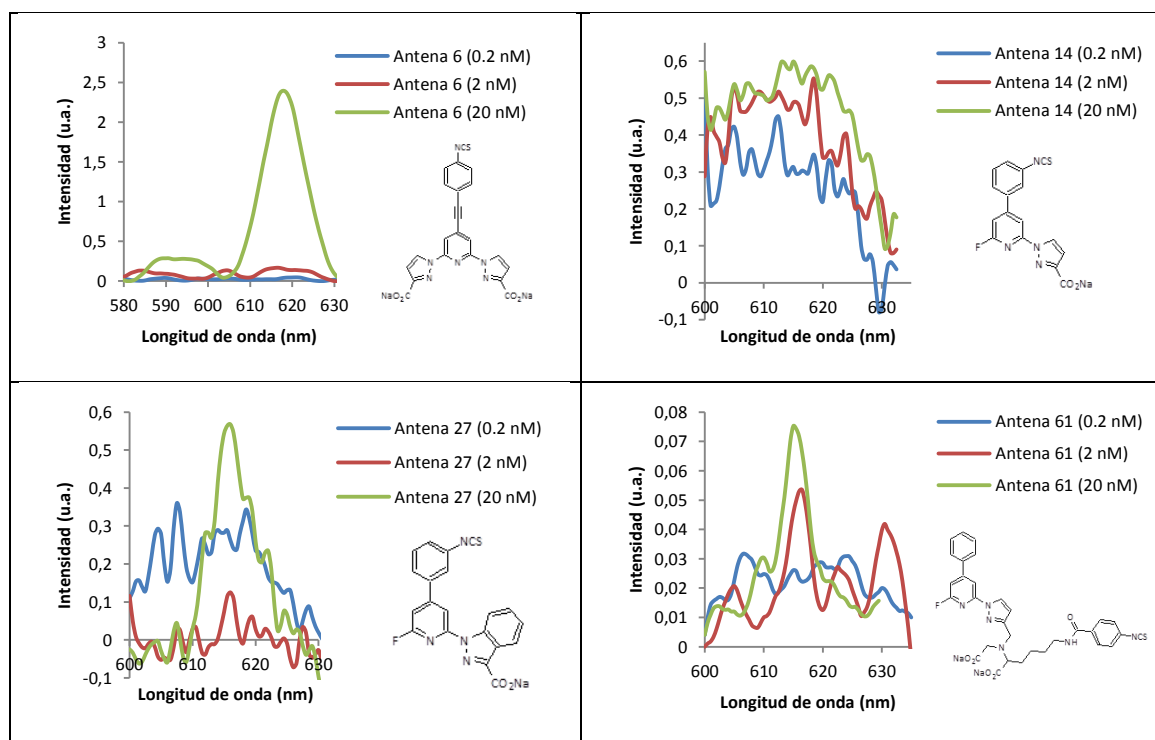


Figura 90.- Respuesta de las antenas **6**, **14**, **27** y **61** en las reacciones de hibridación con Europio

Como se observa en la figura, el compuesto que mejores resultados presenta es el correspondiente a la antena **6** en el que a una concentración 20 nM de *target* se observa una emisión clara de europio. Los resultados en este caso son muy positivos aunque la concentración del oligonucleótido a determinar puede ser en ciertas circunstancias demasiado elevada, dada la concentración en la que es posible aislar las bacterias responsables de sepsis en una acustoforesis de una muestra de sangre real.

Con el fin de evitar estos inconvenientes, se realizan este tipo de medidas a lo largo de un periodo simultáneo de PCR sobre la muestra dando como resultado el aumento de la señal luminiscente tal y como se observa en Figura 91 para el caso del ligando de referencia y el ligando **32**.

Como se puede observar, la intensidad de emisión aumenta de forma exponencial a medida que lo hace el número de ciclos a los que se somete la muestra y que en nuestro caso 30 ciclos equivalen a obtener aproximadamente 10000 copias de la

secuencia marcada. El número de ciclos realizados se considera finalizado al alcanzar una intensidad de emisión constante.

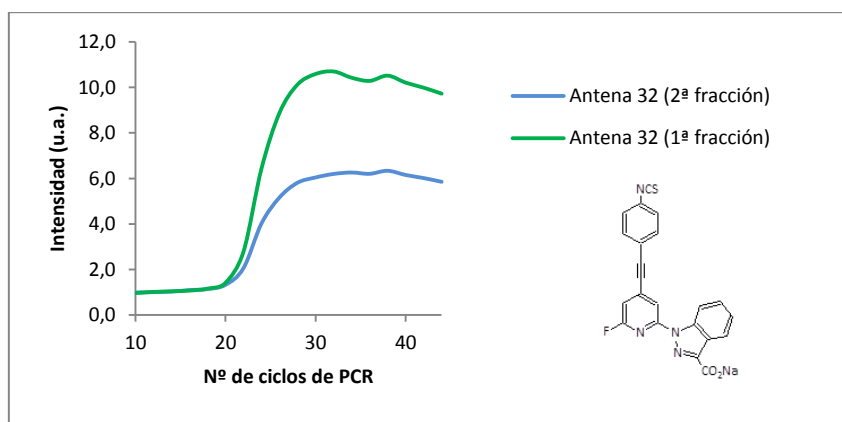


Figura 91.- Resultados de PCR para el ligando **32**

El resumen de los resultados de emisión de fosforescencia de estas hibridaciones a 615 nm para los ligandos estudiados se recogen en la Tabla 31, en la cual se observa una respuesta positiva de la reacción de hibridación a concentraciones de target de 20 nM para la mayoría de los ligandos estudiados.

	LIGANDOS					
	Referencia	6	14	27	32	61
Intensidad (u.a.)	1,8	2,4	-----*	0,6	0,7	0,07

\*No se distingue la emisión de Europio del ruido de fondo del aparato

Tabla 31.- Valores de emisión de europio en las reacciones de hibridación con target 20 nM

Tal y como se ha visto en los estudios de complejación, los complejos de europio, de manera general, emiten peor que los de terbio. Por ello, finalmente para alguno de los ligandos antena preparados en esta memoria se realizan las correspondientes reacciones de conjugación sobre el complejo ICC de terbio.<sup>175</sup> Estos estudios se llevaron a cabo por primera vez para este tipo de análisis y no se disponía de ningún ligando antena de referencia que diese una señal significativa en los estudios preliminares llevados a cabo por el grupo de la Universidad de Turku.

La preparación del ICC de terbio se lleva a cabo de manera análoga al de europio como se vio en el Esquema 56. De modo también análogo, se determina su concentración en

este ion y el grado de marcaje del oligonucleótido mediante los correspondientes espectros de ultravioleta y emisión, en este caso a 545 nm.

Los ligandos con los cuales se llevan a cabo las reacciones de conjugación y posterior hibridación difieren de los presentados hasta ahora, ya que presentan el grupo  $-NCS$  en uno de los anillos heteroaromáticos, además de encontrarse sustituida la posición 6 de la piridina con un anillo pirazólico que aporta el grupo ácido carboxílico, tal y como se muestra en la Figura 92.

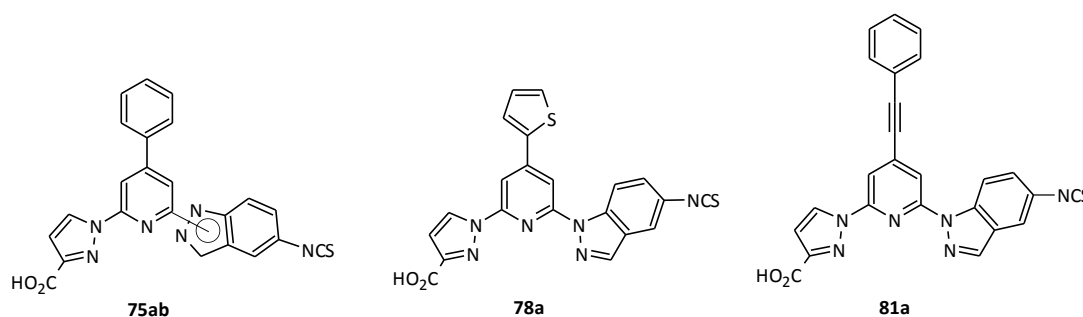


Figura 92.- Ligandos usados en la reacción de conjugación

A continuación se muestran los cromatogramas correspondientes a la purificación mediante HPLC (Figura 93).

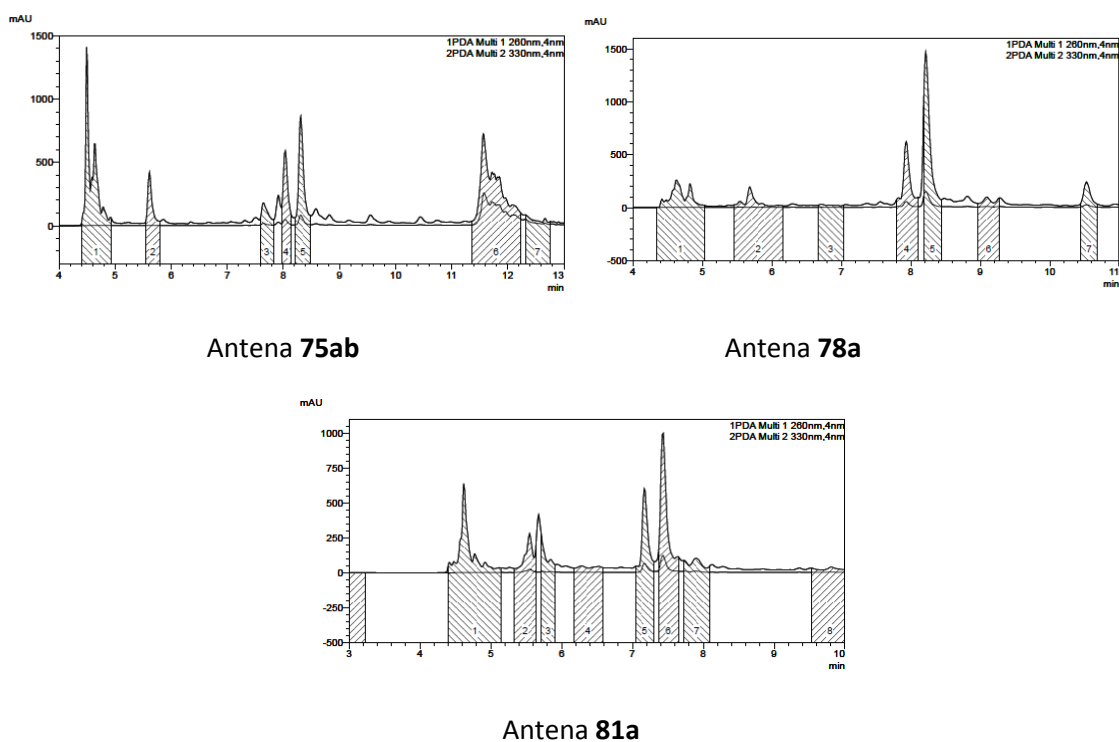


Figura 93.- HPLC de los oligonucleótidos marcados con las antenas 75ab, 78a y 81a

Como se puede observar en todos los cromatogramas hay varios picos mayoritarios. Esto puede ser debido a una configuración cuaternaria provocada por el desigual plegamiento de las cadenas de ADN, dando como resultado dos conformaciones para el oligonucleótido libre y otras dos para el oligonucleótido marcado, puesto que los correspondientes espectros de ultravioleta muestran los mismos resultados para los picos que se han considerado oligonucleótidos marcados (Figura 94).

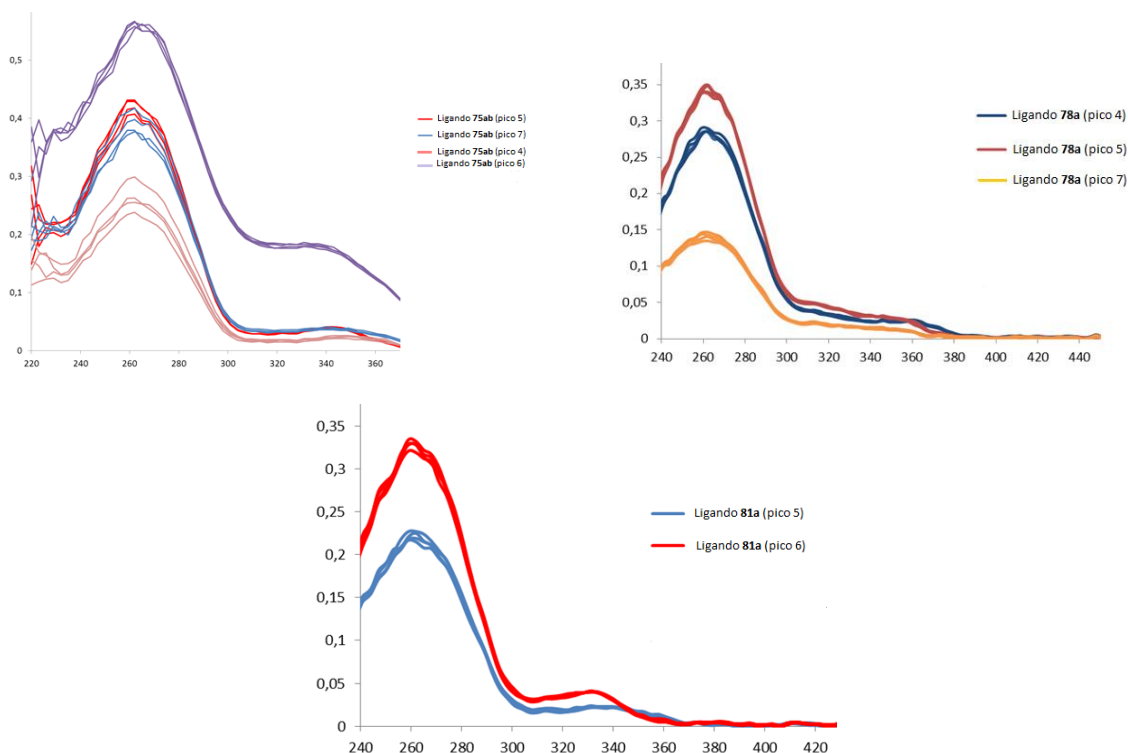


Figura 94.- Espectros de ultravioleta para los oligonucleótidos marcados con 75ab, 78a y 81a

Una vez determinadas las fracciones óptimas de todas estas antenas, se realizan las correspondientes reacciones de hibridación, en el que los resultados mostrados corresponden a los que se obtienen mediante determinaciones en las que se lleva a cabo simultáneamente la PCR del target, y se recogen en la Tabla 32.

	LIGANDOS		
	75ab	78a	81a
Intensidad (u.a.)	2,0	-----	13,0

Tabla 32.- Resultados de PCR para TbICC y los ligandos 75ab, 78a y 81a



El mejor resultado se obtiene para la antena **81a** que presenta el sustituyente feniletinilo, superando incluso a los valores obtenidos con EuICC, de la misma manera que sucedía en el estudio de complejación mediante el uso de éteres corona. En el caso de la antena **75ab** (mezcla isómera) la intensidad se encuentra dentro de los valores vistos hasta el momento para EuICC, mientras que para el caso del **78a** no se observa emisión para esta reacción de hibridación.

Estos resultados sobre las reacciones de hibridación, tanto con ICCs de europio como de terbio con algunos de los ligandos antena preparados en esta memoria, muestran lo acertado del diseño, ya que en la mayoría de los casos se obtienen emisiones como consecuencia del mecanismo de reconocimiento.

Los resultados obtenidos con las hibridaciones para la emisión de europio no han superado, hasta el momento, los obtenidos con el ligando dipicolínico de referencia, aunque alguno de los productos que mejor respuesta presentaban en los estudios de complejación con éteres corona no han podido ser estudiados aun al ser compuestos cuya síntesis se ha realizado recientemente.

En el caso de los resultados obtenidos para terbio con los ligandos antena estudiados, el mejor resultado se ha obtenido con el oligonucleótido marcado con la antena **81a**. Este ligando, en los estudios de emisión con los complejos de la corona de terbio, no era de los que mejores propiedades de emisión presentaba.

Este hecho pone de manifiesto que tanto el grupo  $-NH_2$  como  $-NCS$  y la tiourea (enlace producido en la conjugación), tienen un comportamiento completamente diferente y a pesar de mostrar bajos resultados de emisión en el estudio de sus complejos, no tienen por qué ser descartados como marcadores de oligonucleótidos.

Previsiblemente alguno de los ligandos preparados, y que tienen mejores emisiones, mejorarán los resultados descritos aquí y pueden convertirse en candidatos idóneos para el desarrollo final del método.

El interés en el desarrollo de ligandos antena óptimos tanto para europio como para terbio radica principalmente no solo en la elección de aquel que de las mejores emisiones, sino en su aplicación simultánea al análisis multiplexado, en el que cada Lantánido sirve para la determinación de diferentes contenidos bacterianos. La futura ampliación al estudio de otros lantánidos luminiscentes, como el samario y disprosio, permitirá el análisis simultáneo de cuatro parámetros para los que existe distinta emisión, característica de cada ion empleado.



## CONCLUSIONES

---



## 6. CONCLUSIONES

---

- Se ha puesto a punto un nuevo procedimiento sintético que da acceso a nuevos sistemas poliheterocíclicos que combinan la piridina como anillo común y sustituida en posición 4 con diferentes sistemas aromáticos, con anillos de pirazol y/o indazol sobre las posiciones 2 y 6. En dependencia de los anillos a introducir sobre la piridina, el método permite alterar el orden de reacción para dar lugar a una gran versatilidad sintética.
- Usando como producto de partida la 4-bromo-2,6-difluorpiridina y mediante la sustitución de los átomos de flúor, se han sintetizado varias series de ligandos que se han clasificado en dos familias de compuestos: ligandos monosustituídos que tienen como estructura general pirazoles, indazoles con restos carboxilato o iminodiacetato; y en ligandos disustituídos, constituidos por combinación de pirazoles y/o indazoles. Todos estos ligandos presentan diversos sustituyentes en la posición 4 de la piridina que se han introducido mediante reacciones de acoplamiento tipo Suzuki-Miyaura o Sonogashira.
- Con el fin de estudiar las propiedades luminiscentes de los ligandos sintetizados, se ha llevado a cabo el desarrollo de diversas metodologías para formar complejos con Eu(III) y Tb(III) hasta encontrar un método general válido para todos los compuestos que consiste en la formación de complejos ternarios con estos lantánidos complejados con éteres corona. Este método ha permitido conocer las propiedades luminiscentes de los ligandos, previo a su marcaje sobre oligonucleótidos. Los mejores resultados se obtienen de forma general para Tb(III) y en ligandos que constan de unidades indazólicas y sustituyentes fenilo principalmente.
- Se han realizado reacciones de conjugación del Quelato Portador de Iones (ICC) y de un Ligando Antena (AL) con los correspondientes oligonucleótidos en aquellos casos que presentan un grupo isotiocianato (-NCS). Esos oligonucleótidos unidos covalentemente al ICC y AL se han hibridado con otro oligonucleótido complementario (*target*) obteniéndose resultados positivos en la mayoría de los casos.
- Los objetivos conseguidos abren un camino muy interesante para la síntesis de nuevos ligandos orgánicos con aplicaciones luminiscentes y médicas debido a las propiedades fotofísicas que presentan estos compuestos.



## PARTE EXPERIMENTAL

---





## 7. PARTE EXPERIMENTAL

---

### 7.1. Materiales y métodos

#### Disolventes y reactivos

Todos los disolventes anhidros se secan mediante el uso de un tamiz molecular adecuado, activado en el microondas durante 1 minuto a máxima potencia (2 veces) y secado posteriormente en la línea.<sup>176</sup>

La mayoría de los reactivos empleados son productos comerciales suministrados por Aldrich, Fluka o Acros, a excepción del 3-etoxicarbonilpirazol,<sup>177</sup> 4-bromo-2,6-difluorpiridina<sup>119b</sup> y 3-metoxicarbonilindazol,<sup>178</sup> que se sintetizan según la bibliografía.

Los compuestos orgánicos usados para los ensayos de hibridación son productos sintetizados en el laboratorio. Los oligonucleótidos son productos comerciales suministrados por ThermoFisher Scientific y Biomers. La disolución Delfia Enhancement Solution (DES) es suministrada por Perkin-Elmer y las columnas NAP-5 son de GE Healthcare.

Todos los materiales y disoluciones empleados para el anclaje e hibridación deben ser estériles y manejados en las condiciones más asépticas posibles.

#### Microondas

Microondas Biotage Initiator

#### Cromatografía

El seguimiento de las reacciones se efectúa por cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios de gel de sílice de 0,2 mm de espesor (Marchery-Nagel).

---

<sup>176</sup> D.D. Perrin, D.R. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, Ed. Pergamon Press, 2ª Edición, **1989**.

<sup>177</sup> H. Reimlinger, *Liebigs Ann. Chem.*, **1959**, 625, 970,

<sup>178</sup> K.W. Woods et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 6832.

Las cromatografías se realizan en el Cromatógrafo Biotage Isolera One y el eluyente se indica en cada caso, estando las proporciones relativas de disolventes en volumen/volumen.

### Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN se realizan en los equipos Bruker AV-300 y Bruker AVII-300 a temperatura ambiente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm relativas a la señal del tetrametilsilano (TMS), que se utiliza como referencia en  $^1\text{H}$ -RMN, o la señal del cloroformo deuterado a 77,0 ppm en  $^{13}\text{C}$ -RMN.

### Espectrometría de Masas

Los espectros de masas de impacto electrónico y FAB de bombardeo con cationes cesio acelerados (L-SIMS) se registran en un espectrómetro VG AutoSpec, en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI, UAM), empleando como matriz alcohol *m*-nitrobencílico. Las muestras analizadas por MALDI-TOF se realizan por un espectrómetro Bruker Ultraflex III con láser de nitrógeno, empleando como matriz ácido dihidroxibenzóico o  $\alpha$ -cianocinámico. Los datos obtenidos ( $m/z$ ) se expresan en unidades de masa atómica (uma) y los valores entre paréntesis corresponden a las intensidades relativas al pico base.

### Análisis Químico Elemental

Los análisis elementales se realizan con un analizador elemental LECO CHNS-932 en el SIdI, UAM. Los datos vienen expresados en tanto por ciento.

### Espectroscopia electrónica

Los espectros de absorción se realizan en un espectrofotómetro JASCO V-660 Spectrophotometer y los de luminiscencia en espectrofluorímetros Perkin Elmer LS-50 y Varian Cary Eclipse.

### Medidas por espectrofotometría de absorción y de emisión

Se preparan disoluciones de los ligandos sintetizados en concentraciones del orden de  $10^{-4}$  M. A partir de esta concentración inicial, se preparan otras disoluciones

comprendidas entre  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$  M para la determinación de los coeficientes de absorción molar ( $\epsilon$ ).

Los espectros de luminiscencia de los complejos de lantánidos se registran en el modo fosforescencia del equipo, con una velocidad de barrido de 250 nm/min, y con las ventanas de emisión y de excitación ajustadas a 5 nm para los complejos de Eu y Tb; utilizando un tiempo de retardo de 0,1 ms y un tiempo de integración variable entre 2 y 5 ms.

## 7.2. Síntesis de los ligandos

### 7.2.1. Procedimientos generales

#### *Reacción de acoplamiento Sonogashira*

Bajo atmósfera de argón se añaden el derivado bromado (1 equivalente), dicloro-bis-trifenilfosfina de paladio (0,061 equivalentes), ioduro de cobre (0,061 equivalentes), acetonitrilo seco (8,5 mL), trietilamina (2,5 mL) y el alquino correspondiente (1,2 equivalentes). Se agita a temperatura ambiente durante 3 días. Se filtra sobre celita y se lava con diclorometano (3 x 30 mL). El filtrado se lava con una disolución saturada de cloruro amónico (2 x 30 mL), agua (2 x 30 mL) y la fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro y se filtra, eliminando el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se purifica triturando con hexano.

#### *Reacción de acoplamiento Suzuki-Miyaura*

El derivado bromado (1 equivalente), el correspondiente ácido borónico (1,5 equivalentes), la tetrakistrifenilfosfina (0,1 equivalentes) e hidróxido potásico (2,4 equivalentes) se ponen en un tubo de microondas equipado con imán y bajo atmósfera de argón. Se añade THF seco (12 mL) y agua (1 mL). La disolución inicialmente se agita 2 minutos y luego se calienta 11 minutos a  $130^{\circ}\text{C}$ . Se elimina el disolvente, se añade agua (10 mL) y se extrae con diclorometano. El producto se purifica mediante cromatografía en sílice (diclorometano/metanol en productos monosustituidos y hexano/acetato de etilo en disustituidos).

### *Hidrólisis de los ésteres metílicos/etílicos pirazólicos o indazólicos en ligandos monosustituidos*

En un tubo sellado se pone el producto esterificado (1 equivalente), etanol (2,6 mL), hidróxido sódico (3 equivalentes) y agua (2 mL). Se agita durante 3 h a 35<sup>o</sup>C. Se deja enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente y se neutraliza con ácido clorhídrico al 10%. Se extrae con éter etílico (2 x 2,6 mL) y se elimina el disolvente.

### *Reducción de los grupos éster del anillo pirazol a grupos hidroxilo*

A una disolución del derivado 3-etoxicarbonilpirazol (1 equivalente) en THF seco (10 mL) a -78<sup>o</sup>C, se añade progresivamente LiAlH<sub>4</sub> 1,0 M (1 equivalente). La disolución se mantiene bajo agitación durante 90 minutos y se deja alcanzar temperatura ambiente progresivamente. La reacción se trata mediante la adición sucesiva de agua (50 µL), NaOH al 15% (50 µL) y agua (150 µL). Después de la filtración de las sales de litio, el disolvente es evaporado.

### *Sustitución de los grupos hidroxilo por átomos de bromo*

El alcohol correspondiente (1 equivalente) se disuelve en acetonitrilo (10 mL). El tribromuro de fósforo (0,6 equivalentes) se añade a la mezcla y se calienta a reflujo durante 90 minutos. El disolvente se elimina, se añade una disolución acuosa saturada de carbonato sódico (10 mL), se extrae con diclorometano y se elimina el disolvente.

### *Sustitución de los átomos de bromo por restos de iminodiacetato de tert-butilo*

A una disolución del derivado bromado (1 equivalente) en acetonitrilo seco (20 mL) se añade carbonato sódico (5 equivalentes) y el iminodiacetato de tert-butilo (1 equivalente). La mezcla se agita a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón durante 24 horas. El disolvente se elimina, el precipitado obtenido se lava con agua y se extrae con diclorometano.

### *Transformación de los grupos éster tert-butílicos en ácidos carboxílicos*

A una disolución del éster tert-butílico correspondiente en diclorometano se añade ácido trifluoroacético y se agita a temperatura ambiente durante 18 horas. Una vez eliminado el disolvente, el producto precipita al añadir éter etílico.

### *Transformación del grupo amino en grupo isotiocianato*

A una disolución del amino correspondiente (1 equivalente) y bicarbonato sódico (6 equivalentes) en mezcla de agua (20 mL) y cloroformo (20 mL), se añade tiofosgeno (4,4 equivalentes) y se agita vigorosamente durante 3 horas. El precipitado formado se aísla por centrifugación y se lava con agua.

### *Sustitución del segundo átomo de flúor por el anillo 3-metoxicarbonilindazol*

El producto monofluorado (1 equivalente), el 3-metoxicarbonilindazol (1,2 equivalentes) y carbonato potásico anhidro (1,2 equivalentes) se ponen en un tubo de microondas equipado con imán y bajo atmósfera de argón. Se añade DMF destilada y seca (3 mL). La disolución inicialmente se agita 2 minutos y luego se calienta 2 horas a 140°C. Se añade agua y el producto precipita. El sólido es aislado mediante centrifugación y lavado varias veces con agua. El producto se purifica mediante cromatografía en sílice (diclorometano y metanol al 0,5%).

### *Hidrólisis del 3-metoxicarbonilindazol en ligandos biindazólicos*

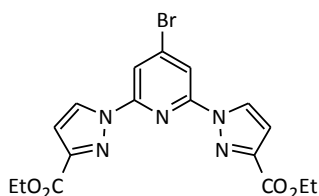
En un tubo de microondas se pone el producto derivado del 3-metoxicarbonilindazol (1 equivalente), hidróxido potásico 2M (13 equivalentes) y DMF (1 mL). Inicialmente se agita 1 minuto, luego se calienta 50 minutos a 150°C y se sigue por TLC hasta que se completa la reacción. Se deja enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente, se neutraliza con ácido clorhídrico al 10% y se lleva a sequedad.

### *Reacción de acoplamiento Suzuki-Miyaura e hidrólisis simultánea*

El derivado bromado (1 equivalente), el ácido borónico correspondiente (1,1 equivalentes), la tetrakistrifenilfosfina de paladio (0,04 equivalentes) e hidróxido potásico 2M (2,7 equivalentes) se ponen en un tubo de microondas equipado con imán y bajo atmósfera de argón. Se añade DMF seca y destilada (3 mL). La disolución inicialmente se agita 2 minutos y luego se calienta 45 minutos a 150°C. Se añade agua y el producto precipita; en el caso de que no se produzca esta precipitación se adiciona ácido clorhídrico concentrado hasta que esto ocurra. El producto se aísla mediante centrifugación.

## 7.2.2. Ligandos bipirazólicos derivados de la 4-bromo-2,6-difluorpiridina

### Síntesis de 4-bromo-2,6-bis-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)piridina (1)



A un matraz que contiene THF seco (35 mL), 4-bromo-2,6-difluorpiridina (1 g, 5,16 mmol) y 3-etoxicarbonilpirazol (1,44 g, 10,32 mmol), se añade bajo atmósfera de argón hidruro sódico (80% en aceite mineral, 341 mg, 11,36 mmol). Se agita durante 2 h a 0°C. El disolvente elimina a presión reducida y el residuo se disuelve en diclorometano (35 ml), se lava con agua (2 x 35 ml) y con una disolución de cloruro sódico saturada (35 ml). La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. Se obtiene **1** como un sólido blanco (1,8 g, 80%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,55 (d, J= 2,6 Hz, 2 H); 8,28 (s, 2 H); 7,01 (d, J= 2,6 Hz, 2 H); 4,46 (c, J= 7,2 Hz, 4 H); 1,44 (t, J= 7,2 Hz, 6 H).

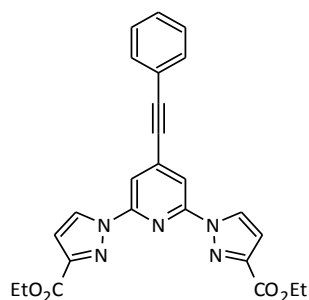
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (75 MHz):** 161,7; 149,7; 146,9; 137,4; 128,6; 114,6; 110,7; 61,5; 14,3.

**Análisis Elemental %:** C 47,02, H 3,71, N 16,13 (teórico); C 46,82, H 3,57, N 15,72 (medido).

**E.M. (EI<sup>+</sup>):** m/z= 434,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%); 436,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**UV/Vis (CH<sub>3</sub>CN):** 254 nm (25000); 258 nm (34000); 304 nm (19700).

### Síntesis de 2,6-bis-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-4-feniletinilpiridina (2)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **1** (1 mmol) y del fenilacetileno. Se obtiene **2** como un sólido amarillo (220 mg, 50%).

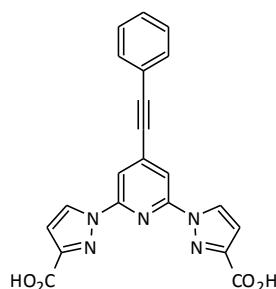
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,57 (d, J= 2,6 Hz, 2 H); 8,20 (s, 2 H); 7,60-7,56 (m, 2 H); 7,41 (dd, J= 2,0 Hz, 5,26 Hz, 3 H); 7,01 (d, J= 2,6 Hz, 2 H); 4,47 (c, J= 7,1 Hz, 4 H); 1,44 (t, J= 7,1 Hz, 6 H).

**$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 161,8; 153,0; 149,2; 131,7; 131,5; 128,8; 128,6; 128,2; 124,0; 120,9; 110,2; 91,9; 91,2; 61,2; 14,2.

**E.M. (ESI $^+$ ):** m/z= 456,1 ([M] $^+$ , 100%).

**UV/Vis ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ):** 259 nm (27000); 288 nm (22100); 303 nm (21480); 322 nm (8440).

### Síntesis de 2,6-bis-(3-carboxi-1-pirazolil)-4-feniletinilpiridina (3)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **2** (0,11 mmol). Se obtiene **3** como un sólido blanco (29 mg, 73%).

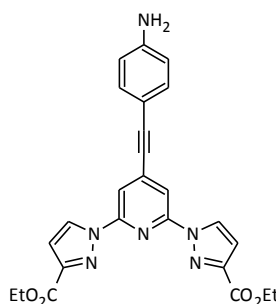
**$^1\text{H}$ -RMN (DMSO)  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,71 (d, J= 2,3 Hz, 2 H); 7,92 (s, 2 H); 7,71-7,67 (m, 2 H); 7,47 (dd, J= 1,9, 5,32 Hz, 3 H); 6,73 (d, J= 2,3 Hz, 2 H).

**$^{13}\text{C}$ -RMN (DMSO)  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 184,2; 153,1; 145,7; 133,3; 131,7; 130,6; 128,8; 128,6; 124,0; 121,1; 113,3; 91,9; 91,2.

**E.M. (ESI $^+$ ):** m/z= 400,1 ([M] $^+$ , 100%).

**UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ ):** 259 nm (6600); 288 nm (5280); 302 nm (5195); 321 nm (2710).

### Síntesis de 4-(4-aminofeniletinil)-2,6-bis-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)piridina (4)



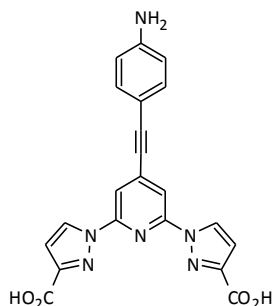
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **1** (0,70 mmol) y del 4-aminofenilacetileno. Se obtiene **4** (190 mg, 60%).

**$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,56 (d, J= 2,3 Hz, 2 H); 8,13 (s, 2 H); 7,38 (d, J= 8,2 Hz, 2 H); 7,00 (d, J= 2,2 Hz, 2 H); 6,67 (d, J= 8,2 Hz, 2 H); 4,47 (c, J= 7,0 Hz, 4 H); 1,44 (t, J= 7,0 Hz, 6 H).

**$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 161,8; 153,0; 149,2; 147,6; 131,5; 129,7; 128,2; 120,9; 119,9; 117,6; 110,2; 91,9; 91,2; 61,2; 14,2.

**E.M. (ESI<sup>+</sup>):** m/z= 471,2 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

#### Síntesis de 4-(4-aminofeniletinil)-2,6-bis-(3-carboxi-1-pirazolil)piridina (5)



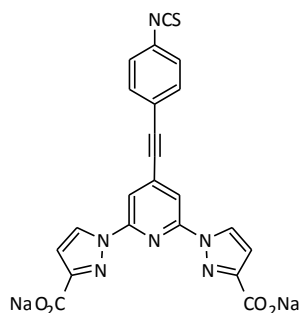
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **4** (0,40 mmol). Se obtiene **5** (147 mg, 89%).

**$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,65 (d, J= 2,1 Hz, 2 H); 7,88 (s, 2 H); 7,45 (d, J= 7,8 Hz, 2 H); 6,86 (d, J= 7,8 Hz, 2 H); 6,86 (d, J= 2,1 Hz, 2 H); 6,81 (d, J= 7,8 Hz, 2 H).

**$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 184,2; 153,1; 147,6; 145,7; 133,3; 130,6; 129,7; 121,1; 119,9; 117,6; 113,3; 91,9; 91,2.

**E.M. (ESI<sup>+</sup>):** m/z= 415,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

#### Síntesis de la sal sódica 2,6-bis-(3-carboxi-1-pirazolil)-4-(4-isotiocianofeniletinil)piridina (6)



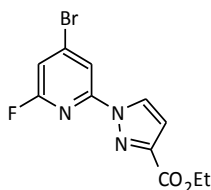
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **5** (0,34 mmol). Se obtiene **6** (139 mg, 90%).

**E.M. (ESI<sup>+</sup>):** m/z= 501,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).



### 7.2.3. Ligandos monosustituidos derivados de la 4-bromo-2,6-difluorpiridina

#### Síntesis de 4-bromo-2-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-6-fluorpiridina (**7**)



A un matraz que contiene THF seco (51 mL), 4-bromo-2,6-difluorpiridina (2,77 g, 14,28 mmol) y 3-etoxicarbonilpirazol (1 g, 7,14 mmol), se añade bajo atmósfera de argón hidruro sódico (80% en aceite mineral, 188 mg, 7,85 mmol). Se agita durante 2 h a 0°C. El disolvente elimina a presión reducida y el residuo se disuelve en diclorometano (50 mL), se lava con agua (2 x 50 mL) y con una disolución de cloruro sódico saturada (50 mL). La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro y se filtra, eliminando el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de sílice (hexano y diclorometano, 3/1). Se obtiene **7** como un sólido blanco (1,86 g, 83%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,46 (d, J= 2,7 Hz, 1 H); 8,21 (dd, J= 1,3, 1,10 Hz, 1 H); 7,06 (dd, J= 2,7 Hz, 2,59 Hz, 1 H); 6,96 (d, J= 2,7 Hz, 1 H); 4,44 (c, J= 7,1 Hz, 2 H); 1,42 (t, J= 7,1 Hz, 3 H).

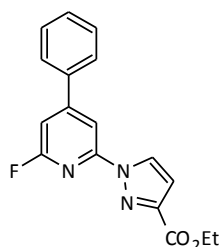
**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (75 MHz):** 163,7; 161,7; 160,5; 147,0; 137,9; 129,0; 113,4; 111,0; 110,7; 61,8; 14,3.

**Análisis Elemental %:** C 42,06, H 2,89, N 13,38 (teórico); C 42,43, H 3,16, N 13,18 (medido).

**E.M.** (FB<sup>+</sup>): m/z= 314,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%), 316,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**UV/Vis (CH<sub>3</sub>CN):** 264 nm (15060); 288 nm (28750).

#### Síntesis de 2-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-4-fenil-6-fluorpiridina (**8**)

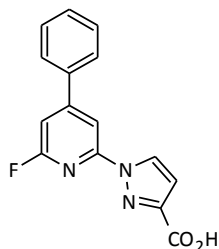


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **7** (1,91 mmol) y el ácido fenilborónico. Se obtiene **8** como un sólido blanco (264 mg, 68%).

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,54 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 8,23 (s, 1 H); 7,74-7,71 (m, 2 H); 7,52-7,50 (m, 3 H); 7,08 (s, 1 H); 6,97 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 4,45 (c,  $J = 7,1$  Hz, 2 H); 1,43 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3 H).

**$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 161,8; 158,4; 156,2; 145,4; 136,6; 134,2; 129,0; 128,4; 127,2; 123,6; 110,2; 105,7; 61,3; 14,3.

### Síntesis de 2-(3-carboxi-1-pirazolil)-4-fenil-6-fluorpiridina (9)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **8** (0,07 mmol). Se obtiene **9** como un sólido blanco (13 mg, 67%).

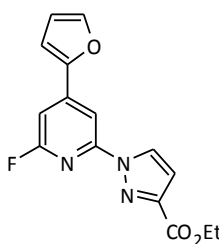
**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,50 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1 H); 8,19 (d,  $J = 10,0$  Hz, 1 H); 7,78-7,75 (m, 2 H); 7,45-7,43 (m, 3 H); 7,24 (dd,  $J = 1,4$  Hz, 10,0 Hz, 1 H); 6,89 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1 H).

**$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 184,2; 161,7; 155,3; 145,7; 136,6; 135,1; 130,8; 129,0; 129,0; 127,2; 123,8; 113,3; 105,7.

**E.M.** ( $\text{FB}^+$ ):  $m/z = 284,1$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

**UV/Vis ( $\text{H}_2\text{O}$ ):** 259 nm (7350); 297 nm (4140).

### Síntesis de 2-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-6-fluor-4-furilpiridina (10)



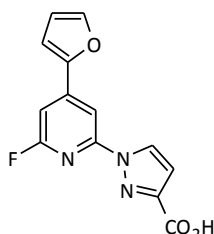
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **7** (1,30 mmol) y el ácido 2-furilborónico. Se obtiene **10** como un sólido blanco (203 mg, 77%).

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,51 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 8,17 (s, 1 H); 7,58 (dd,  $J = 0,7$  Hz, 1,7 Hz, 1 H); 7,10 (s, 1 H); 7,07 (d,  $J = 3,4$  Hz, 1 H); 6,95 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 6,57 (dd,  $J = 1,7$  Hz, 3,4 Hz, 1 H); 4,45 (c,  $J = 7,1$  Hz, 2 H); 1,44 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3 H).

**$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 164,5; 161,8; 161,1; 157,9; 145,4; 143,6; 141,2; 135,3; 128,4; 119,5; 110,9; 110,2; 103,8; 96,5; 61,3; 14,3.

**E.M. ( $\text{FB}^+$ ):**  $m/z=302,1$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

#### Síntesis de 2-(3-carboxi-1-pirazolil)-6-fluor-4-furilpiridina (11)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **10** (0,07 mmol). Se obtiene **11** como un sólido blanco (15,5 mg, 86%).

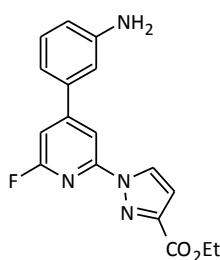
**$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,24 (d,  $J=2,6$  Hz, 1 H); 7,92 (d,  $J=1,4$  Hz, 1 H); 7,44 (m, 1 H); 6,97-6,95 (m, 2 H); 6,65 (d,  $J=2,6$  Hz, 1 H); 6,35 (m, 1 H).

**$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 184,2; 165,4; 162,0; 157,1; 145,7; 143,6; 141,2; 136,2; 130,8; 119,5; 113,3; 111,1; 103,8; 96,5.

**E.M. ( $\text{FB}^+$ ):**  $m/z=274,0$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

**UV/Vis (EtOH):** 269 nm (24290); 273 nm (23270); 296 nm (25770); 304 nm (23290); 319 nm (17770).

#### Síntesis de 4-(3-aminofenil)-2-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-6-fluorpiridina (12)

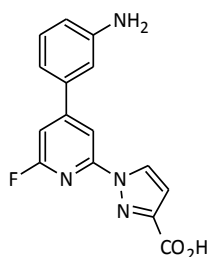


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **7** (1,43 mmol) y el ácido 3-aminofenilborónico. Se obtiene **12** como un sólido blanco (261 mg, 84%).

**$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,53 (d,  $J=2,63$  Hz, 1 H); 8,19 (s, 1 H); 7,30-7,27 (m, 1 H); 7,08 (dd,  $J=3,79$  Hz, 4,99 Hz, 1 H); 7,03 (s, 1 H); 6,96 (d,  $J=2,64$  Hz, 1 H); 6,79 (dd,  $J=1,59$  Hz, 7,94 Hz, 1 H); 4,45 (c,  $J=7,13$  Hz, 2 H); 1,43 (t,  $J=7,13$  Hz, 3 H).

**$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 161,8; 158,5; 154,6; 147,7; 145,4; 142,6; 130,6; 128,4; 125,2; 125,1; 119,0; 115,3; 114,0; 110,2; 107,2; 61,3; 14,3.

### Síntesis de 4-(3-aminofenil)-2-(3-carboxi-1-pirazolil)-6-fluorpiridina (13)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **12** (0,06 mmol). Se obtiene **13** como un sólido blanco (13,7 mg, 75%).

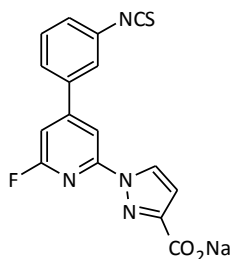
**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,63 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 8,33 (s, 1 H); 8,04-7,58 (m, 4 H); 7,42 (s, 1 H); 7,01 (d, J= 2,6 Hz, 1 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 184,2; 159,4; 153,7; 147,7; 145,7; 142,6; 130,8; 130,6; 126,0; 125,4; 119,0; 115,3; 114,0; 113,3; 107,2.

**E.M. (FB<sup>+</sup>):** m/z= 299,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**UV/Vis (CH<sub>3</sub>CN):** 260 nm (1200); 295 nm (6240).

### Síntesis de la sal sódica de 2-(3-carboxi-1-pirazolil)-6-fluor-4-(3-fenilisotiocianato)piridina (14)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **13** (0,64 mmol). Se obtiene **14** como un sólido blanco (204 mg, 94%).

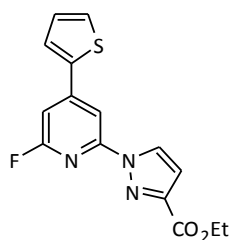
**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,61 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 8,34 (s, 1 H); 7,86-7,84 (m, 2 H); 7,63-7,58 (m, 1 H); 7,63-7,58 (m, 1 H); 7,47-7,44 (m, 1 H); 7,40 (s, 1 H); 7,00 (d, J= 2,6 Hz, 1 H).

**E.M. (ESI<sup>+</sup>):** m/z= 363,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**I.R. (KBr) (ν cm<sup>-1</sup>):** 2110 cm<sup>-1</sup> (-NCS).

**UV/Vis (EtOH):** 261 nm (34050); 300 nm (17400).

### Síntesis de 2-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-6-fluor-4-tienilpiridina (15)

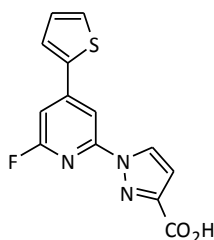


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **7** (1,14 mmol) y el ácido 2-tienilborónico. Se obtiene **15** como un sólido blanco (269 mg, 82%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,51 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 8,17 (s, 1 H); 7,66 (dd, J= 0,9 Hz, 3,7 Hz, 1 H); 7,49 (dd, J= 0,9 Hz, 5,0 Hz, 1 H); 7,16 (dd, J= 3,7 Hz, 5,0 Hz, 1 H); 7,03 (s, 1 H); 6,96 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 4,45 (c, J= 7,1 Hz, 2 H); 1,44 (t, J= 7,1 Hz, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 164,0; 161,8; 159,1; 145,4; 142,9; 137,3; 132,8; 128,4; 125,0; 118,1; 111,9; 110,2; 104,8; 61,3; 14,3.

### Síntesis de 2-(3-carboxi-1-pirazolil)-6-fluor-4-tienilpiridina (16)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **15** (0,07 mmol). Se obtiene **16** como un sólido blanco (19 mg, 99%).

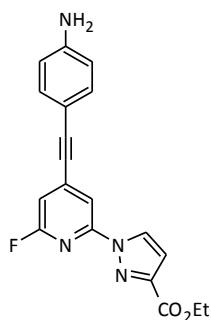
**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,43 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 8,10 (m, 1 H); 7,71 (dd, J= 0,9 Hz, 3,5 Hz, 1 H); 7,53 (d, J= 5,0 Hz, 1 H); 7,15 (s, 1 H); 7,08 (dd, J= 3,5 Hz, 5,0 Hz, 1 H); 6,84 (d, J= 2,5 Hz, 1 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 184,2; 164,9; 158,2; 145,7; 143,8; 137,3; 132,8; 130,8; 125,0; 118,1; 113,3; 112,1; 104,8.

**E.M.** (FB<sup>+</sup>): m/z= 290,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**UV/Vis (CH<sub>3</sub>CN):** 267 nm (34490); 304 nm (29375).

### Síntesis de 4-(4-aminofeniletinil)-2-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-6-fluorpiridina (**17**)

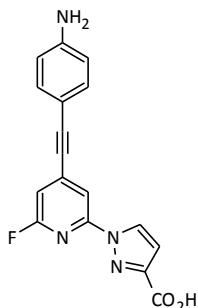


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **7** (1,27 mmol) y el 4-aminofenilacetileno. Se obtiene **17** como un sólido marrón (202 mg, 48%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,57 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 7,79 (s, 1 H); 7,5 (dd, J= 8,4 Hz, 2,1 Hz, 2 H); 7,13 (d, J= 10,3 Hz, 1 H); 7,04 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 6,57 (dd, J= 8,4 Hz, 2,1 Hz, 1 H); 4,05 (c, J= 7,0 Hz, 2 H); 1,45 (t, J= 7,0 Hz, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 164,1; 161,8; 158,3; 147,6; 145,4; 134,2; 129,7; 128,4; 121,1; 118,6; 117,6; 112,3; 110,2; 91,2; 88,3; 61,3; 14,3.

### Síntesis de 4-(4-aminofeniletinil)-2-(3-carboxi-1-pirazolil)-6-fluorpiridina (**18**)



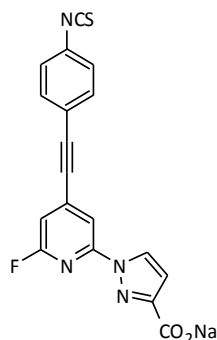
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **17** (0,06 mmol). Se obtiene **18** (17,3 mg, 94%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,59 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 8,10 (s, 1 H); 7,81 (d, J= 8,5 Hz, 2 H); 7,5 (d, J= 8,5 Hz, 2 H); 7,20 (s, 1 H); 7,00 (d, J= 2,6 Hz, 1 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 184,2; 165,0; 157,5; 147,6; 145,7; 135,1; 130,8; 129,7; 121,3; 118,6; 113,3; 112,3; 91,2; 88,3.

**UV/Vis (CH<sub>3</sub>CN):** 290 nm (4390); 307 nm (3530).

### Síntesis de la sal sódica de 2-(3-carboxi-1-pirazolil)-6-fluor-4-(4-feniletinilisotiocianato) piridina (19)

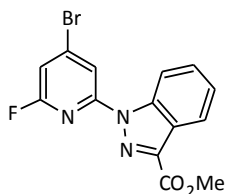


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **18** (0,64 mmol). Se obtiene **19** (204 mg, 94%).

**E.M.** (ESI<sup>+</sup>): m/z= 363,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**I.R.** (KBr) ( $\nu$  cm<sup>-1</sup>): 2096 cm<sup>-1</sup> (-NCS).

### Síntesis de 4-bromo-2-fluor-6-(3-metoxycarbonil-1-indazolil)piridina (20)



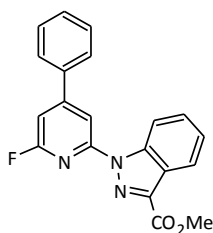
A una disolución del 3-metoxycarbonilindazol (900 mg, 5,11 mmol) en THF seco (15 mL) a 0°C, se añade progresivamente hidruro sódico (80% en aceite mineral, 107 mg, 4,468 mmol). La disolución se mantiene en frío y con agitación durante 15 minutos y se añade gota a gota sobre una disolución de 4-bromo-2,6-difluoropiridina (1 g, 5,15 mmol) en THF seco (20 mL) a 0°C. Se agita durante 4 horas dejando que la disolución alcance temperatura ambiente. El disolvente se elimina a presión reducida. Después de la adición de agua, el producto se extrae con diclorometano y se purifica mediante cromatografía en sílice (hexano y diclorometano, 3/1). Se obtiene **20** como un sólido blanco (1,5 g, 84%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,78 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,28-8,26 (m, 2 H); 7,60 (t, J= 7,5 Hz, 1 H); 7,44 (t, J= 7,5 Hz, 1 H); 7,04 (d, J= 3,0 Hz, 1 H); 4,10 (s, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 163,7; 161,8; 159,7; 157,2; 142,0; 137,2; 131,4; 126,6; 122,9; 121,7; 119,4; 114,0; 108,5; 107,4; 53,0.

**E.M.** (ESI<sup>+</sup>): m/z= 350,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%), 352,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 4-fenil-2-fluor-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)piridina (**21**)



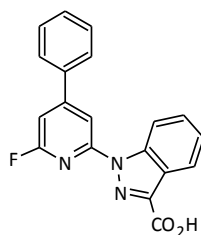
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **20** (1,32 mmol) y el ácido fenilborónico. Se obtiene **21** como un sólido blanco (240 mg, 78%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,87 (d, J= 8,7 Hz, 1 H); 8,30-8,27 (m, 2 H); 7,77-7,73 (m, 2 H); 7,63-7,57 (m, 1 H); 7,53-7,50 (m, 3 H); 7,46 (m, 1 H); 7,07 (d, J= 8,7 Hz, 1H); 4,09 (s, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 163,7; 158,3; 153,5; 140,5; 137,2; 134,3; 132,3; 129,0; 129,0; 127,2; 126,6; 122,9; 121,2; 121,1; 119,4; 106,7; 103,4; 53,0.

**E.M. (ESI<sup>+</sup>):** m/z= 348,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(3-carboxi-1-indazolil)-4-fenil-6-fluorpiridina (**22**)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **21** (0,23 mmol). Se obtiene **22** como un sólido blanco (66,7 mg, 87%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,82 (d, J= 8,3 Hz, 1 H); 8,41 (d, J= 5,5 Hz, 1 H); 8,26 (d, J= 8,3 Hz, 1 H); 7,90 (m, 2 H); 7,67-7,43 (m, 5 H); 7,29 (d, J= 5,5 Hz, 1 H).

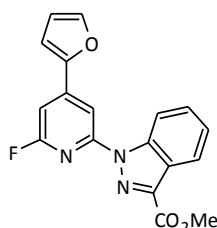
**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 159,2; 153,2; 152,7; 139,6; 139,1; 134,3; 133,2; 129,0; 127,2; 126,8; 122,1; 121,4; 120,4; 118,5; 105,9; 103,4.

**E.M. (FB<sup>+</sup>):** m/z= 334,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**UV/Vis (CH<sub>3</sub>CN):** 329 nm (21625).



### Síntesis de 2-fluor-4-furil-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)piridina (**23**)

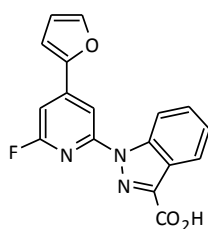


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **20** (1,36 mmol) y el ácido 2-furilborónico. Se obtiene **23** como un sólido blanco (200 mg, 68%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,84 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,29-8,25 (m, 2 H); 7,60-7,57 (m, 2 H); 7,45-7,41 (m, 1 H); 7,08 (m, 2 H); 6,58 (m, 1 H); 4,11 (s, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 163,7; 161,0; 155,3; 143,6; 142,5; 141,2; 137,2; 133,4; 126,6; 122,9; 120,6; 119,5; 119,4; 108,4; 106,3; 101,5; 96,5; 53,0.

### Síntesis de 2-(3-carboxi-1-indazolil)-6-fluor-4-furilpiridina (**24**)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **23** (0,06 mmol). Se obtiene **24** como un sólido blanco (15,8 mg, 86%).

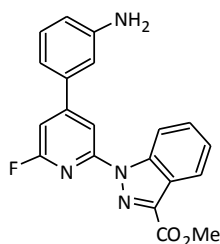
**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,84 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,29-8,25 (m, 2 H); 7,60-7,57 (m, 2 H); 7,45-7,41 (m, 1 H); 7,08 (m, 2 H); 6,58 (dd, J= 1,7 Hz, 3,3 Hz, 1 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 161,9; 154,4; 153,2; 143,6; 141,6; 141,2; 139,1; 134,3; 126,8; 122,1; 119,9; 119,5; 118,5; 108,7; 105,4; 101,5; 96,5.

**E.M. (FB<sup>+</sup>):** m/z= 324,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**UV/Vis (CH<sub>3</sub>CN):** 298 nm (25820); 331 nm (31750).

### Síntesis de 4-(3-aminofenil)-2-fluor-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)piridina (**25**)

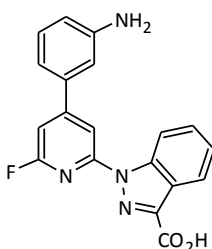


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **20** (0,85 mmol) y el ácido 3-aminofenilborónico. Se obtiene **25** como un sólido blanco (203 mg, 66%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,86 (d, J= 8,6 Hz, 1 H); 8,29-8,24 (m, 2 H); 7,62-7,57 (m, 1 H); 7,46-7,41 (m, 1 H); 7,32-7,29 (m, 1 H); 7,12-7,10 (m, 1 H); 7,05-7,03 (m, 2 H); 6,80 (d, J= 8,6 Hz, 1 H); 4,09 (s, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 163,7; 156,7; 151,9; 147,7; 140,5; 140,3; 137,2; 130,6; 126,6; 123,2; 122,9; 122,8; 121,1; 119,4; 119,0; 115,3; 114,0; 106,7; 105,0; 53,0.

### Síntesis de 4-(3-aminofenil)-2-(3-carboxi-1-indazolil)-6-fluorpiridina (**26**)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **25** (0,35 mmol). Se obtiene **26** como un sólido blanco (105,2 mg, 86%).

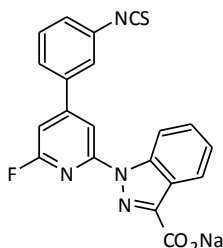
**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,84 (d, J= 8,6 Hz, 1 H); 8,43 (m, 1 H); 8,28 (m, 1 H); 8,06 (d, J= 8,4 Hz, 1 H); 7,91 (s, 1 H); 7,77 (m, 1 H); 7,68-7,58 (m, 2 H); 7,51-7,46 (m, 1 H); 7,37 (s, 1 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 157,6; 153,2; 151,1; 147,7; 140,3; 139,6; 139,1; 130,6; 126,8; 124,1; 123,0; 122,1; 120,4; 119,0; 118,5; 115,3; 114,0; 105,9; 105,0.

**E.M. (FB<sup>+</sup>):** m/z= 349,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**UV/Vis (CH<sub>3</sub>CN):** 330 nm (10000).

### Síntesis de la sal sódica de 2-(3-carboxi-1-indazolil)-6-fluor-4-(3-fenilisotiocianato) piridina (27)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **26** (0,30 mmol). Se obtiene **27** como un sólido blanco (109 mg, 92%).

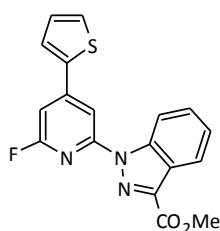
**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,78 (d, J= 8,2 Hz, 1 H); 8,49 (s, 1 H); 8,32 (d, J= 7,4 Hz, 1 H); 7,89-7,86 (m, 2 H); 7,63-7,56 (m, 2 H); 7,45-7,38 (m, 2 H); 7,28 (s, 1 H).

**E.M. (ESI<sup>+</sup>):** m/z= 413,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**I.R. (KBr) (ν cm<sup>-1</sup>):** 2108 cm<sup>-1</sup> (-NCS).

**UV/Vis (CH<sub>3</sub>CN):** 315 nm (23840); 331 nm (30810).

### Síntesis de 2-fluor-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)-4-tienilpiridina (28)



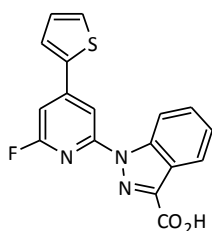
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **20** (0,85 mmol) y el ácido 2-tienilborónico. Se obtiene **28** como un sólido blanco (213,5 mg, 71%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,83 (d, J= 8,6 Hz, 1 H); 8,29-8,24 (m, 2 H); 7,68 (dd, J= 0,4 Hz, 1,1 Hz, 1 H); 7,62-7,56 (m, 1 H); 7,50 (dd, J= 0,4 Hz, 1,1 Hz, 1 H); 7,46-7,41 (m, 1 H); 7,20-7,15 (m, 1 H); 7,03 (m, 1 H); 4,10 (s, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 163,7; 162,1; 156,4; 142,0; 141,1; 137,3; 137,2; 132,8; 126,6; 125,0; 122,9; 120,6; 119,4; 118,1; 109,5; 106,3; 102,5; 53,0.

**E.M. (ESI<sup>+</sup>):** m/z= 354,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(3-carboxi-1-indazolil)-6-fluor-4-tienilpiridina (29)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **28** (0,10 mmol). Se obtiene **29** como un sólido blanco (31,2 mg, 93%).

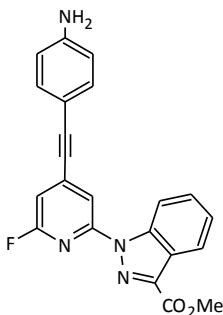
**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,81 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,39 (m, 1 H); 8,28 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 7,89 (d, J= 3,6 Hz, 1 H); 7,69-7,60 (m, 2 H); 7,46 (m, 1 H); 7,27-7,23 (m, 2 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 163,1; 155,6; 153,2; 142,0; 141,0; 139,1; 137,3; 132,8; 126,8; 125,0; 122,1; 119,9; 118,5; 118,1; 109,7; 105,4; 102,5.

**E.M. (FB<sup>+</sup>):** m/z= 340,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**UV/Vis (CH<sub>3</sub>CN):** 277 nm (12015); 324 nm (31340).

### Síntesis de 4-(4-aminofeniletinil)-6-fluor-2-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)piridina (30)

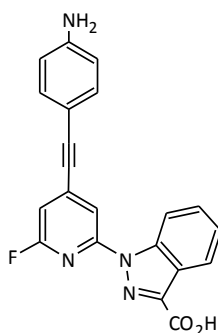


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **20** (1 mmol) y el 4-aminofenilacetileno. Se obtiene **30** como un sólido marrón (200 mg, 52%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,82 (d, J= 8,8 Hz, 1 H); 8,27 (d, J= 8,0 Hz, 1 H); 8,13 (s, 1 H); 7,61-7,56 (m, 1 H); 7,40-7,37 (m, 3 H); 6,87 (d, J= 8,8 Hz, 1 H); 6,67 (d, J= 8,4 Hz, 2 H); 4,10 (s, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 163,7; 162,3; 155,7; 147,6; 137,2; 132,4; 131,4; 129,7; 126,6; 122,9; 122,7; 119,4; 118,7; 118,6; 117,6; 110,0; 108,3; 91,2; 88,3; 53,0.

### Síntesis de 4-(4-aminofeniletinil)-2-(3-carboxi-1-indazolil)-6-fluorpiridina (31)



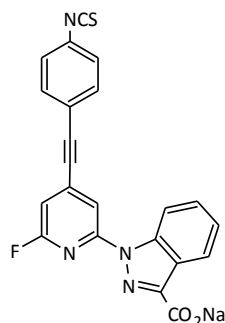
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **30** (0,06 mmol). Se obtiene **31** como un sólido blanco (17 mg, 72%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,78 (d, J= 8,8 Hz, 1 H); 8,27 (d, J= 7,9 Hz, 1 H); 8,22 (s, 1 H); 7,82 (d, J= 8,5 Hz, 2 H); 7,71 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 7,52-7,49 (m, 3 H); 7,14 (d, J= 8,8 Hz, 1 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 163,2; 154,8; 153,2; 147,6; 139,1; 133,3; 130,4; 129,7; 126,8; 122,1; 122,0; 118,9; 118,6; 118,5; 117,6; 110,0; 107,5; 91,2; 88,3.

**E.M. (FB<sup>+</sup>):** m/z= 373,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de la sal 2-(3-carboxi-1-indazolil)-6-fluor-4-(4-feniletinilisotiocianato)piridina (32)

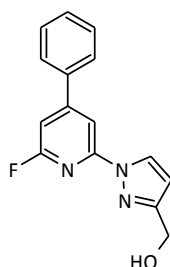


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **31** (0,38 mmol). Se obtiene **32** como un sólido blanco (146 mg, 94%).

**E.M. (ESI<sup>+</sup>):** m/z= 437,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**I.R. (KBr) (ν cm<sup>-1</sup>):** 2096 cm<sup>-1</sup> (-NCS).

### Síntesis de 1-(4-fenilpiridil-6-fluor-2-pirazolil)metanol (**33**)

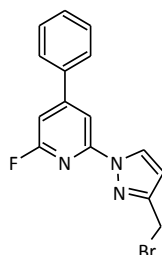


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **8** (0,69 mmol) obteniéndose el producto **33** (167,4 mg, 90%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 8,45 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 8,04 (s, 1 H); 7,69 (m, 2 H); 7,49 (m, 3 H); 6,98 (s, 1 H); 6,46 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 4,79 (s, 2 H).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 160,6; 155,3; 154,7; 136,6; 134,7; 129,1; 129,0; 128,2; 127,2; 122,9; 107,0; 105,7; 58,1.

### Síntesis de 2-[(3-bromometilpirazolil)]-4-fenil-6-fluorpiridina (**34**)

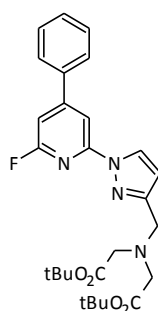


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **33** (0,62 mmol) obteniéndose el producto **34** (185,6 mg, 90%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 8,45 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 8,05 (s, 1 H); 7,71 (m, 2 H); 7,50 (m, 3 H); 7,00 (s, 1 H); 6,53 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 4,55 (s, 2 H).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 160,0; 156,3; 151,4; 136,6; 134,1; 129,1; 129,0; 128,4; 127,2; 123,5; 108,0; 105,7; 24,7.

### Síntesis de 2-[(3-di-tert-butiliminodiacetipirazolil)]-4-fenil-6-fluorpiridina (35)

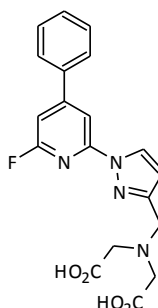


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **34** (0,56 mmol) obteniéndose el producto **35** (232,5 mg, 84%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,42 (d, J= 2,52 Hz, 1 H); 8,05 (s, 1 H); 7,69 (m, 2 H); 7,48 (m, 3 H); 6,95 (s, 1 H); 6,53 (d, J= 2,58 Hz, 1 H); 4,03 (s, 2 H); 3,49 (s, 4 H); 1,45 (s, 18 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 170,0; 160,8; 155,4; 150,0; 136,6; 134,9; 129,1; 129,0; 127,2; 127,0; 122,8; 108,0; 105,7; 80,0; 55,0; 51,0; 28,0.

### Síntesis de 2-[(3-dicarboxildiacetipirazolil)]-4-fenil-6-fluorpiridina (36)



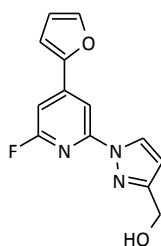
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **35** (0,47 mmol). Se obtiene el sólido **36** (384,36 mg, 51%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,57 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 8,13 (s, 1 H); 7,82 (m, 2 H); 7,54 (m, 3 H); 7,27 (s, 1 H); 6,68 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 4,45 (s, 2 H); 3,96 (s, 4 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 171,5; 160,8; 155,4; 150,4; 136,6; 134,9; 129,1; 129,0; 127,2; 127,0; 122,8; 108,0; 105,7; 56,6; 52,3.

**E.M. (FB<sup>+</sup>):** m/z= 385,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 1-(6-fluor-4-furilpiridil-2-pirazolil)metanol (**37**)

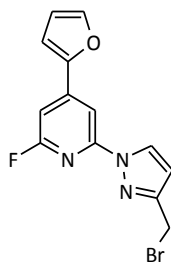


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **10** (0,67 mmol) obteniéndose el producto **37** (153,2 mg, 87%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,37 (d, J= 2,3 Hz, 1 H); 7,95 (s, 1 H); 7,55 (d, J= 1,0 Hz, 1 H); 6,97 (m, 2 H); 6,53 (dd, J= 1,7 Hz, 3,3 Hz, 1 H); 6,43 (d, J= 2,3 Hz, 1 H); 4,76 (s, 2 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 163,3; 156,5; 155,3; 143,6; 141,2; 135,8; 128,2; 119,5; 110,2; 107,0; 103,8; 96,5; 58,1.

### Síntesis de 2-[(3-bromometilpirazolil)]-6-fluor-4-furilpiridina (**38**)



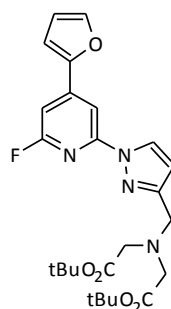
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **37** (0,59 mmol) obteniéndose el sólido **38** (161,1 mg, 85%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,41 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 8,00 (s, 1 H); 7,58 (d, J= 1,5 Hz, 1 H); 7,01 (m, 2 H); 6,56 (dd, J= 1,5 Hz, 3,4 Hz, 1 H); 6,52 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 4,55 (s, 2 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 162,6; 158,0; 151,4; 143,6; 141,2; 135,2; 128,4; 119,5; 110,8; 108,0; 103,8; 96,5; 24,7.



### Síntesis de 2-[(3-di-tert-butyliminodiacetipirazolil)]-6-fluor-4-furilpiridina (39)

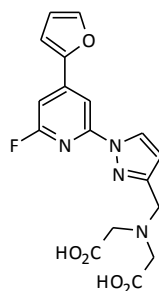


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **38** (0,50 mmol) obteniéndose el producto **39** (136,8 mg, 56%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,41 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 8,00 (s, 1 H); 7,58 (d, J= 1,5 Hz, 1 H); 7,01 (m, 2 H); 6,56 (dd, J= 1,5 Hz, 3,4 Hz, 1 H); 6,52 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 4,04 (s, 2 H); 3,49 (s, 4 H); 1,45 (s, 18 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 170,0; 163,5; 157,2; 150,0; 143,6; 141,2; 136,0; 127,0; 119,5; 110,1; 108,0; 103,8; 96,5; 80,0; 55,0; 51,0; 28,0.

### Síntesis de 2-[(3-dicarboxildiacetipirazolil)]-6-fluor-4-furilpiridina (40)



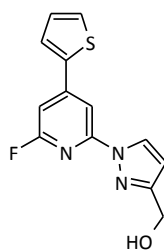
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **39** (0,28 mmol). Se obtiene el sólido **40** (98 mg, 93%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,55 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 8,11 (s, 1 H); 7,75 (d, J= 1,5 Hz, 1 H); 7,25 (m, 2 H); 6,69 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 6,66 (dd, J= 1,5 Hz, 3,4 Hz, 1 H); 4,51 (s, 2 H); 4,03 (s, 4 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 171,5; 163,5; 157,2; 150,4; 143,6; 141,2; 136,0; 127,0; 119,5; 110,1; 108,0; 103,8; 96,5; 55,6; 52,3.

**E.M.** (FB<sup>+</sup>): m/z= 375,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 1-(6-fluor-2-pirazolil-4-tienil)metanol (41)

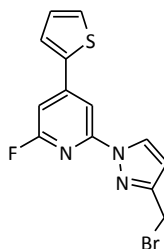


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **15** (0,93 mmol) obteniéndose el producto **41** (235,8 mg, 92%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,42 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 8,00 (s, 1 H); 7,61 (dd, J= 1,0 Hz, 3,7 Hz, 1 H); 7,47 (dd, J= 1,0 Hz, 5,04Hz, 1 H); 7,16 (dd, J= 3,7 Hz, 5,0 Hz, 1 H); 6,95 (s, 1 H); 6,45 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 4,79 (s, 2 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 164,4; 157,6; 155,3; 143,4; 137,3; 132,8; 128,2; 125,0; 118,1; 111,2; 107,0; 104,8; 58,1.

### Síntesis de 2-[(3-bromometilpirazolil)]-6-fluor-4-tienilpiridina (42)

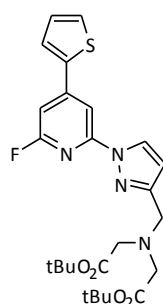


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **41** (0,87 mmol) obteniéndose el sólido **42** (231,2 mg, 80%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,42 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 8,01 (s, 1 H); 7,62 (dd, J= 1,0 Hz, 3,8 Hz, 1 H); 7,48 (dd, J= 1,0 Hz, 5,0 Hz, 1 H); 7,16 (dd, J= 3,8 Hz, 5,0 Hz, 1 H); 6,96 (s, 1 H); 6,53 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 4,56 (s, 2 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 163,8; 159,2; 151,4; 142,7; 137,3; 132,8; 128,4; 125,0; 118,1; 111,9; 108,0; 104,8; 24,7.

### Síntesis de 2-[(3-di-tert-butiliminodiacetipirazolil)]-6-fluor-4-tienilpiridina (**43**)

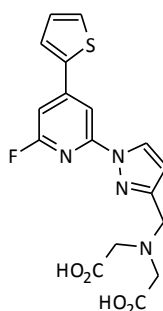


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **42** (0,68 mmol) obteniéndose el producto **43** (215,5 mg, 63%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,38 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 8,00 (s, 1 H); 7,58 (dd, J= 1,0 Hz, 3,7 Hz, 1 H); 7,45 (dd, J= 1,0 Hz, 5,0 Hz, 1 H); 7,13 (dd, J= 3,7 Hz, 5,0 Hz, 1 H); 6,90 (s, 1 H); 6,52 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 4,03 (s, 2 H); 3,49 (s, 4 H); 1,46 (s, 18 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 170,0; 164,6; 158,3; 150,0; 143,6; 137,3; 132,8; 127,0; 125,0; 118,1; 111,2; 108,0; 104,8; 80,0; 55,0; 51,0; 28,0.

### Síntesis del 2-[(3-dicarboxildiacetipirazolil)]-6-fluor-4-tienilpiridina (**44**)



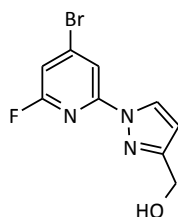
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **43** (0,43 mmol). Se obtiene el sólido **44** (72,5 mg, 43%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,52 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 8,06 (s, 1 H); 7,81 (dd, J= 1,0 Hz, 3,7 Hz, 1 H); 7,67 (dd, J= 1,0 Hz, 5,0 Hz, 1 H); 7,22 (m, 2 H); 6,66 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 4,38 (s, 2 H); 3,84 (s, 4 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 171,5; 164,6; 158,3; 150,4; 143,6; 137,3; 132,8; 127,0; 125,0; 118,1; 111,2; 108,0; 104,8; 56,6; 52,3.

**E.M. (FB<sup>+</sup>):** m/z= 391,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 1-(4-bromo-6-fluor-2-pirazolil)metanol (45)

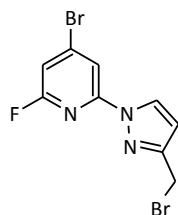


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **7** (1,48 mmol) obteniéndose el producto **45** como un sólido blanco (360 mg, 90%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 8,31 (dd,  $J = 2,5$  Hz, 12,4 Hz, 1 H); 7,90 (s, 1 H); 6,90 (m, 1 H); 6,41 (dd,  $J = 2,5$  Hz, 4,7 Hz, 1 H); 4,70 (s, 2 H).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 163,0; 157,8; 155,4; 133,7; 128,6; 115,7; 110,8; 106,6; 59,2.

### Síntesis de 4-bromo-2-[(3-bromometilpirazolil)]-6-fluorpiridina (46)

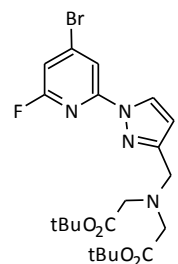


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **45** (1,32 mmol) obteniéndose el sólido **46** (376,7 mg, 85%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 8,38 (dd,  $J = 2,5$  Hz, 12,4 Hz, 1 H); 7,99 (s, 1 H); 6,97 (m, 1 H); 6,52 (dd,  $J = 2,5$  Hz, 4,7 Hz, 1 H); 4,51 (s, 2 H).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 162,4; 159,3; 151,4; 133,1; 128,4; 116,3; 110,8; 108,0; 24,7.

### Síntesis del 4-bromo-2-[(3-di-tert-butiliminodiacetilpirazolil)]-6-fluorpiridina (47)

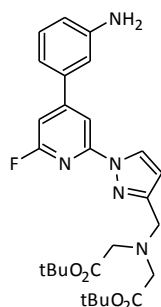


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **46** (1,46 mmol) obteniéndose el producto **47** (512,1 mg, 70%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 8,35 (dd,  $J = 2,6$  Hz, 13,1 Hz, 1 H); 8,00 (s, 1 H); 6,92 (m, 1 H); 6,52 (dd,  $J = 2,6$  Hz, 4,7 Hz, 1 H); 4,00 (s, 2 H); 3,47 (s, 4 H); 1,46 (s, 18 H).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 170,0; 163,3; 158,5; 150,0; 133,9; 127,0; 115,6; 110,8; 108,0; 80,0; 55,0; 51,0; 28,0.

### Síntesis de 4-(3-aminofenil)-2-[(3-di-tert-butiliminodiacetipirazolil)]-6-fluorpiridina (**48**)

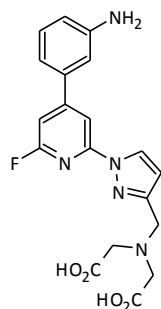


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **47** (0,85 mmol) y el ácido 3-aminofenilborónico. Se obtiene **48** como un sólido blanco (432 mg, 70%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 8,44 (d,  $J = 2,5$  Hz, 13,1 Hz, 1 H); 8,04 (s, 1 H); 7,29 (d,  $J = 6,1$  Hz, 1 H); 7,09-6,79 (m, 4 H); 6,56 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1 H); 4,07 (s, 2 H); 3,53 (s, 4 H); 1,49 (s, 18 H).

$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 170,0; 159,2; 153,8; 150,0; 147,7; 142,6; 130,6; 127,0; 125,8; 124,4; 119,0; 115,3; 114,0; 108,0; 107,2; 80,0; 55,0; 51,0; 28,0.

### Síntesis de 4-(3-aminofenil)-2-[(3-dicarboxildiacetipirazolil)]-6-fluorpiridina (**49**)

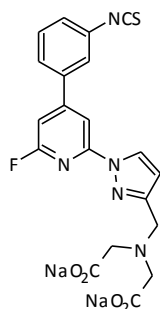


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **48** (0,18 mmol). Se obtiene el sólido **49** (71 mg, 98%).

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,59 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H); 8,13 (s, 1 H); 7,50 (m, 3 H); 7,23 (m, 2 H); 6,71 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H); 4,54 (s, 2 H); 4,06 (s, 4 H).

**$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 171,5; 159,2; 153,8; 150,4; 147,7; 142,6; 130,6; 127,0; 125,8; 124,4; 119,0; 115,3; 114,0; 108,0; 107,2; 56,6; 52,3.

### Síntesis de la sal disódica 2-[(3-dicarboxildiacetipirazolil)]-4-(fenil-3-isotiocianato)-6-fluorpiridina (50)



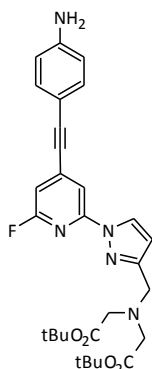
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **49** (0,18 mmol). Se obtiene **50** como un sólido blanco (74,2 mg, 95%).

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,62 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H); 8,14 (s, 1 H); 7,79-7,34 (m, 5 H); 6,75 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H); 4,65 (s, 2 H); 4,21 (s, 4 H).

**E.M.** (MALDI $^+$ ):  $m/z = 486,0$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

**I.R.** (KBr) ( $\nu \text{ cm}^{-1}$ ):  $2110 \text{ cm}^{-1}$  (-NCS).

### Síntesis de 4-(4-aminofeniletinil)-2-[(3-di-tert-butyliminodiacetipirazolil)]-6-fluorpiridina (51)

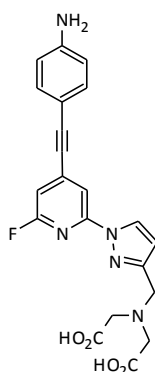


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **47** (0,58 mmol) y el 4-aminofenilacetileno. Se obtiene **51** como un sólido marrón (57,5 mg, 30%).

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,65 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 7,71 (s, 1 H); 7,46-7,10 (m, 5 H); 6,79 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 4,14 (s, 2 H); 3,44 (s, 4 H); 1,45 (s, 6 H).

**$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 170,0; 159,2; 157,6; 150,0; 147,6; 134,9; 129,7; 127,0; 120,3; 118,6; 117,6; 112,3; 108,0; 91,2; 88,3; 80,0; 55,0; 51,0; 28,0.

### Síntesis de 4-(4-aminofeniletinil)-2-[(3-dicarboxildiacetipirazolil)]-6-fluorpiridina (**52**)

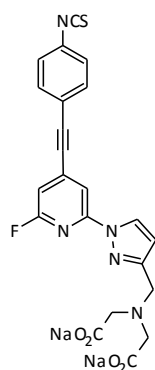


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **51** (0,17 mmol). Se obtiene el sólido **52** (70 mg, 96%).

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,72 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 7,73 (s, 1 H); 7,55 (d,  $J = 10,4$  Hz, 2 H); 7,43-7,12 (m, 3 H); 6,84 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 4,61 (s, 2 H); 4,06 (s, 4 H).

**$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 171,5; 159,2; 157,6; 150,4; 147,6; 134,9; 129,7; 127,0; 120,3; 118,6; 117,6; 112,3; 108,0; 91,2; 88,3; 56,6; 52,3.

### Síntesis de la sal disódica 2-[(3-dicarboxildiacetipirazolil)]-6-fluor-4-(feniletinil-4-isotiocianato)piridina (**53**)



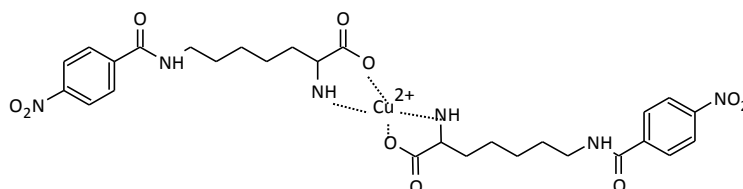
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **52** (0,16 mmol). Se obtiene **53** como un sólido blanco (15 mg, 20%).

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,73 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 8,05 (s, 1 H); 7,60 (d,  $J = 10,4$  Hz, 2 H); 7,43-7,12 (m, 3 H); 7,01 (d,  $J = 2,6$  Hz, 1 H); 4,68 (s, 2 H); 4,07 (s, 4 H).

**E.M.** (MALDI<sup>+</sup>):  $m/z = 510,0$  ( $[M]^+$ , 100%).

**I.R.** (KBr) ( $\nu \text{ cm}^{-1}$ ):  $2108 \text{ cm}^{-1}$  (-NCS).

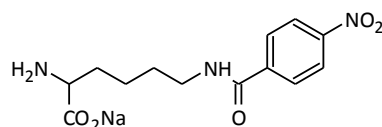
### Síntesis de bis-[2-amino-6-(4-nitrobenzoil)amino]hexanoato de cobre (II) (54)



Una disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$  (12,5 g, 50 mmol) en agua (170 ml) se añade sobre una disolución del hidrocloreto de L-lisina (18,3 g, 100 mmol), NaOH (4 g, 100 mmol) y agua (170 ml). Se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente y se añade NaOH (4,0 g, 100 mmol). La mezcla se enfría en baño de hielo. Se añade una disolución de cloruro de 4-nitrobenzoilo (37,1 g, 200 mmol) y 1,4-dioxano (250 ml) y la mezcla se mantiene a pH básico con NaOH (1M). Después de agitar durante 30 min en un baño de hielo, la mezcla se mantiene con agitación durante 14 horas a temperatura ambiente y se filtra. El precipitado se lava con agua fría y etanol. Se obtiene **54** (31,2 g, 96%).

**I.R.** (KBr) ( $\nu \text{ cm}^{-1}$ ): 3412; 3279; 3151 (N-H); 1640; 1620; 1605 (C=O); 1528; 1349 ( $\text{NO}_2$ ).

### Síntesis de 2-amino-6-[(4-nitrobenzoil)amino]hexanoato de sodio (55)



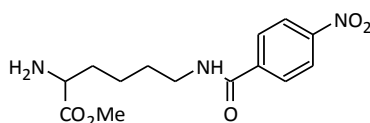
Una mezcla de **54** (31,2 g, 47,8 mmol),  $\text{NaH}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (21,9 g, 58,8 mmol), y agua (410 ml) se agita a  $80^\circ\text{C}$  durante 3 horas. Enfrizada la mezcla se filtra y el precipitado se lava con agua fría y etanol. Se obtiene **55** (19,1 g, 63%).

**<sup>1</sup>H-RMN ( $\text{D}_2\text{O} + \text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 8,34 (d,  $J = 8,8 \text{ Hz}$ , 2 H); 8,01 (d,  $J = 8,8 \text{ Hz}$ , 2 H); 3,42 (t,  $J = 5,8 \text{ Hz}$ , 1 H); 3,33 (t,  $J = 7,0 \text{ Hz}$ , 2 H); 1,87-1,68 (m, 2 H); 1,64-1,55 (m, 2 H); 1,47-1,33 (m, 2 H).

**I.R.** (KBr) ( $\nu \text{ cm}^{-1}$ ): 3422; 3334 (N-H); 1639; 1603 (C=O); 1522; 1352 ( $\text{NO}_2$ ).



### Síntesis de 2-amino-6-[(4-nitrobenzoi)amino]hexanoato de metilo (56)

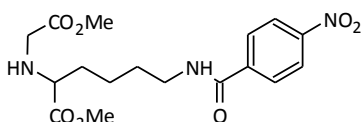


Una disolución de  $\text{SOCl}_2$  (12,4 ml, 0,17 mmol) se añade lentamente sobre metanol frío (250 ml) y se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Esta mezcla se añade sobre **55** (13,5 g, 42,5 mmol) manteniendo la disolución a reflujo durante 3 horas. Pasado este tiempo, se elimina el disolvente, el residuo se redissuelve en cloroformo (150 ml) y se lava con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro. El sólido resultante, después de la evaporación del disolvente, se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo y metanol al 5%). Se obtiene **56** como un aceite amarillo (8,54 g, 65 %).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 8,24 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2 H); 7,95 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2 H); 6,64 (t,  $J = 5,4$  Hz, 1 H); 3,73 (s, 3 H); 3,53-3,46 (m, 3 H); 1,89-1,58 (m, 4 H); 1,57-1,46 (m, 2 H).

I.R. (KBr) ( $\nu \text{ cm}^{-1}$ ): 3380; 3299 (N-H); 1732; 1650 (C=O); 1524; 1347 ( $\text{NO}_2$ ); 1200 (C-O).

### Síntesis de 2-[(metoxicarbonil)metilamino]-6-[(4-nitrobenzoi)amino]]hexanoato de metilo (57)

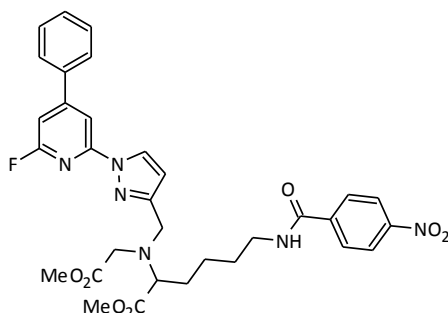


Una mezcla de **56** (4,27 g, 13,8 mmol), bromoacetato de metilo (1,31 ml, 13,8 mmol), carbonato potásico (9,53 g, 69 mmol) y acetonitrilo (80 ml) se calienta a reflujo durante 4 horas. Las sales se filtran y el filtrado se lleva a sequedad. El producto se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano y acetato de etilo, 2/5). Se obtiene **57** como un aceite (4,52 g, 86%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 8,25 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2 H); 7,99 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2 H); 7,00 (t,  $J = 5,4$  Hz, 1 H); 3,73 (s, 3 H); 3,71 (s, 3 H); 3,47 (d,  $J = 17,4$  Hz, 1 H); 3,44-3,50 (m, 2 H); 3,55 (d,  $J = 17,4$  Hz, 1 H); 3,31 (dd,  $J = 5,6, 7,1$  Hz, 1 H); 2,18 (s, 1 H); 1,60-1,81 (m, 4 H); 1,42-1,60 (m, 2 H).

I.R. (KBr) ( $\nu \text{ cm}^{-1}$ ): 333 (N-H); 1738; 1651 (C=O); 1526; 1348 ( $\text{NO}_2$ ); 1207 (C-O).

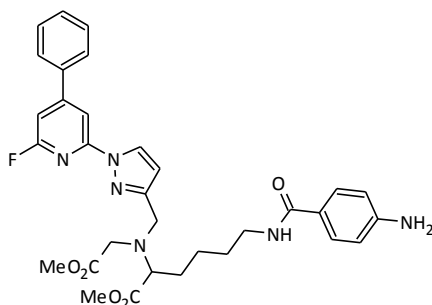
Síntesis de 4-fenil-2-fluor-6-[(3-metil-N-[(metoxicarbonil)metil]amino-6-[[4-nitrobenzoil)amino)hexanoato de etilpirazolil]]piridina (58)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **34** (0,65 mmol) con el producto **57** (0,65 mmol). El producto se purifica mediante cromatografía en columna de alúmina (diclorometano, 100%). Se obtiene **58** como un sólido blanco (215,5 mg, 52%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 8,24 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H); 8,10 (m, 2 H); 7,89 (m, 3 H); 7,61 (m, 2 H); 7,41 (m, 3 H); 6,89 (s, 1 H); 6,39 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H); 5,23 (s, 1 H); 3,90 (m, 2 H); 3,65 (s, 2 H); 3,57 (s, 6 H); 3,46 (m, 4 H).

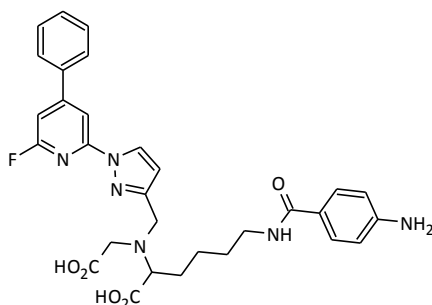
Síntesis de 4-fenil-2-fluor-6-[(3-metil-N-[(metoxicarbonil)metil]amino-6-[[4-aminobenzoil)amino) hexanoato de etilpirazolil]]piridina (59)



A una disolución del compuesto **58** (215,5mg, 0,34 mmol) en metanol (35 mL) se añade Pd/C (80 mg, 0,75 mmol). La reacción se agita bajo presión de  $\text{H}_2$  (30psi) durante 30 minutos. La mezcla se filtra sobre celita y el disolvente se lleva a sequedad obteniéndose **59** como un sólido blanco (158,7 mg, 77%).

$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 8,32 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H); 7,98 (s, 1 H); 7,69-7,47 (m, 9 H); 6,94 (s, 1 H); 6,47 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H); 3,98 (m, 2 H); 3,68-3,40 (m, 12 H).

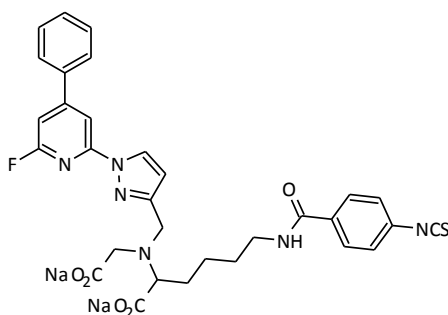
### Síntesis de 4-fenil-2-fluor-6-[(3-metil-N-[(carboxil)metil] amino-6-[(4-aminobenzoil) amino) hexanoato de etilpirazolil]]piridina (60)



En un tubo sellado se pone el compuesto **59** (0,26 mmol), etanol (12 mL) e hidróxido potásico (6,06 mmol), Se agita durante 4 horas a temperatura ambiente. Se elimina completamente el disolvente y se añade una disolución de ácido clorhídrico al 10% hasta que precipita el producto deseado. El producto es aislado por centrifugación y lavado dos veces con agua. Se obtiene **60** como un sólido blanco (82,1 mg, 63%).

**<sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O) δ (ppm) (300 MHz):** 8,47 (d, J= 2,4 Hz, 1 H); 8,02 (s, 1 H); 7,83 (m, 2 H); 7,70-7,66 (m, 2 H); 7,43-7,31 (m, 5 H); 7,18 (s, 1 H); 6,64 (d, J= 2,4 Hz, 1 H); 4,63 (m, 2 H); 4,36-4,22 (m, 4 H); 3,29 (m, 2 H).

### Síntesis de la sal disódica 4-fenil-2-fluor-6-[(3-Metil-N-[(carboxil)metil]amino-6-[(4-isotiocianatobenzoil)amino) hexanoato de etilpirazolil]]piridina (61)

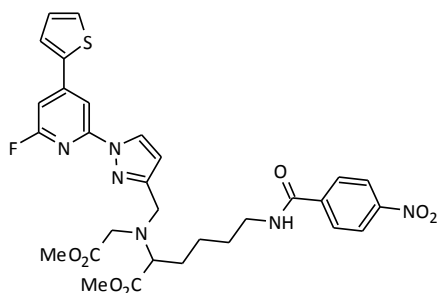


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **60** (0,16 mmol). Se obtiene **61** como un sólido blanco (96,5 mg, 95%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,60 (d, J= 2,4 Hz, 1 H); 8,11 (s, 1 H); 7,80 (m, 4 H); 7,53 (m, 5 H); 7,28 (s, 1 H); 6,75 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 4,75 (m, 2 H); 4,49-4,34 (m, 4 H); 3,41 (m, 2 H).

**E.M. (MALDI<sup>+</sup>):** m/z= 661,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

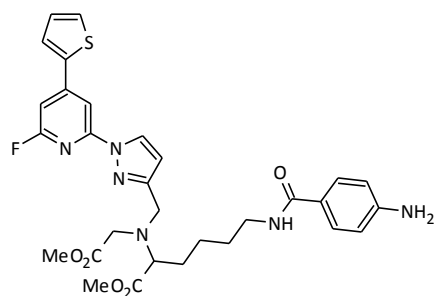
Síntesis de 2-fluor-6-[(3-metil-N-[(metoxicarbonil)metil] amino-6-[(4-nitrobenzoil)amino)hexanoato de etilpirazolil]-4-tienilpiridina (62)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **42** (0,61 mmol) con el producto **57** (0,65 mmol). El producto se purifica mediante cromatografía en columna de alúmina (diclorometano, 100%). Se obtiene **62** como un sólido blanco (101 mg, 26%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,27 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 8,18 (m, 2 H); 7,93 (m, 3 H); 7,58 (dd, J= 1,1 Hz, 3,7 Hz, 1 H); 7,46 (dd, J= 1,1 Hz, 5,1 Hz, 1 H); 7,14 (dd, J= 3,7 Hz, 5,1 Hz, 1 H); 6,91 (m, 1 H); 6,42 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 3,95 (d, J= 2,6 Hz, 2 H); 3,72 (s, 3 H); 3,62 (s, 6 H); 1,80 (m, 2 H); 1,64 (m, 6 H).

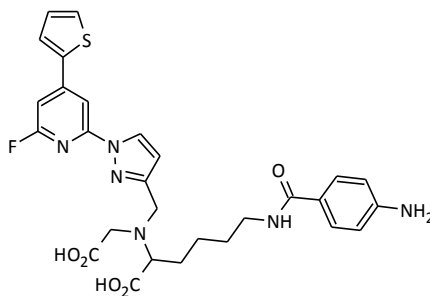
Síntesis de 2-fluor-6-[(3-metil-N-[(metoxicarbonil)metil] amino -6-[(4-aminobenzoil)amino)hexanoato de etilpirazolil]-4-tienilpiridina (63)



A una disolución del compuesto **62** (0,16 mmol) en metanol (20 mL) se añade Pd/C (0,38 mmol). La reacción se agita bajo presión de H<sub>2</sub> (30psi) durante 30 minutos. La mezcla se filtra sobre celita y el disolvente se lleva a sequedad obteniéndose **63** como un sólido blanco (87,5 mg, 91%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,27 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 7,93 (m, 1 H); 7,59 (m, 4 H); 7,44 (dd, J= 1,0 Hz, 5,1 Hz, 1 H); 7,12 (dd, J= 3,9 Hz, 5,1 Hz, 1 H); 6,88 (m, 2 H); 6,42 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 3,95 (m, 2 H); 3,61 (s, 3 H); 3,56 (m, 2 H); 1,76 (m, 3 H); 1,58 (m, 6 H).

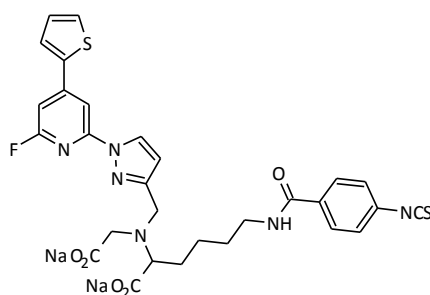
### Síntesis de 2-fluor-6-[(3-metil-N-[(carboxil)metil] amino-6-[(4-aminobenzoil)amino] hexanoato de etilpirazolil)]-4-tienilpiridina (**64**)



En un tubo sellado se pone el compuesto **63** (0,21 mmol), etanol (8 mL) e hidróxido potásico (4,01 mmol). Se agita durante 4 horas a temperatura ambiente. Se elimina completamente el disolvente y se añade una disolución de ácido clorhídrico al 10% hasta que precipita el producto deseado. El producto se aísla por centrifugación y lavado dos veces con agua. Se obtiene **64** como un sólido blanco (50 mg, 41%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,58 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 8,30-8,26 (m, 1 H); 8,14-8,11 (m, 1 H); 7,95-7,84 (m, 2 H); 7,70-7,64 (m, 2 H); 7,56 (d, J= 3,9 Hz, 1 H); 7,16 (d, J= 3,9 Hz, 1 H); 6,87 (s, 1 H); 6,70 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 4,69 (s, 2 H); 4,49-4,26 (m, 4 H); 3,54-3,48 (m, 1 H); 2,21-2,05 (m, 2 H); 1,83-1,61 (m, 4 H).

### Síntesis de la sal disódica 2-fluor-6-[(3-Metil-N-[(carboxil)metil] amino-6-[(4-isotiocianatobenzoil)amino] hexanoato de etilpirazolil)]-4-tienilpiridina (**65**)



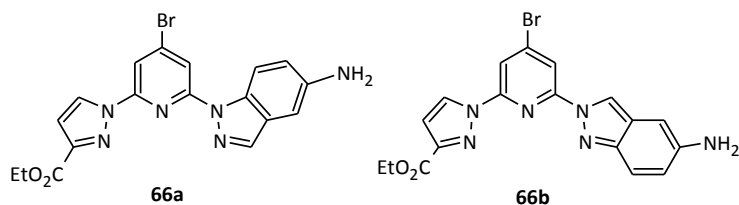
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **64** (0,16 mmol). Se obtiene **65** (54,5 mg, 95%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,58 (d, J= 2,2 Hz, 1 H); 8,28-8,26 (m, 1 H); 8,13-8,10 (m, 1 H); 7,98-7,88 (m, 2 H); 7,68-7,61 (m, 2 H); 7,55 (d, J= 4,4 Hz, 1 H); 7,16 (d, J= 3,3 Hz, 1 H); 6,86 (s, 1 H); 6,71 (d, J= 2,2 Hz, 1 H); 4,74 (d, J= 5,6 Hz, 2 H); 4,46-4,34 (m, 4 H); 3,84-3,37 (m, 1 H); 2,25-2,10 (m, 2 H); 1,81-1,67 (m, 4 H).

**E.M. (MALDI<sup>+</sup>):** m/z= 667,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

## 7.2.4. Ligandos sustituidos por 3-carboxipirazol y 5-aminoindazol

## Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-4-bromo-6-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)piridina (66ab)



El producto **7** (150 mg, 0,478 mmol), 5-aminoindazol (71 mg, 0,573 mmol) y carbonato potásico anhidro (70 mg, 0,506 mmol) se ponen en un tubo de microondas equipado con imán y bajo atmósfera de argón. Se añade DMF destilada y seca (5 mL). La disolución inicialmente se agita 2 minutos y luego se calienta 2 horas a 140<sup>0</sup>C. Se añade agua y el producto precipita. El sólido es aislado mediante centrifugación y lavado varias veces con agua. El producto se purifica mediante cromatografía en sílice (hexano y acetato de etilo, 1/1). Se obtiene **66** como mezcla de isómeros (130 mg, 64%).

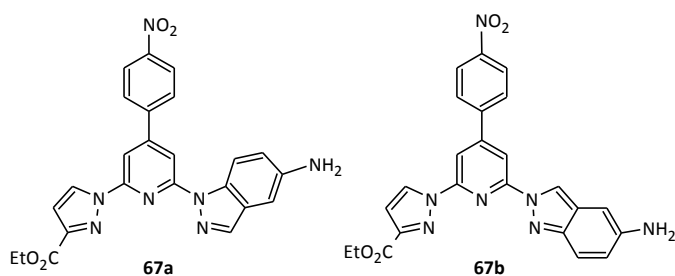
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):**

Isómero a: 8,55 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 8,38 (d, J= 8,7 Hz, 1 H); 8,13 (d, J= 1,2 Hz, 1 H); 8,08 (d, J= 1,2 Hz, 1 H); 8,01 (s, 1 H); ; 7,04-6,95 (m, 4 H); 6,87 (dd, J= 1,9 Hz, 8,7 Hz, 1 H); 4,47 (c, J= 7,1 Hz, 4 H); 1,45 (t, J= 7,1 Hz, 6 H).

Isómero b: 8,68 (m, 1 H); 8,60 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 8,31 (d, J= 1,2 Hz, 1 H); 8,23 (d, J= 1,2 Hz, 1 H); 7,55 (d, J= 9,2 Hz, 1 H); 7,04-6,95 (m, 4 H); 6,71 (d, J= 1,2 Hz, 1 H); 4,47 (c, J= 7,1 Hz, 4 H); 1,45 (t, J= 7,1 Hz, 6 H).

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>): m/z= 427,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%); 429,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

## Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-4-(4-nitrofenil)piridina (67ab)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **66ab** (0,12 mmol) y el ácido 4-nitrofenilborónico. Se obtiene **67** como mezcla de isómeros (20 mg, 36%).

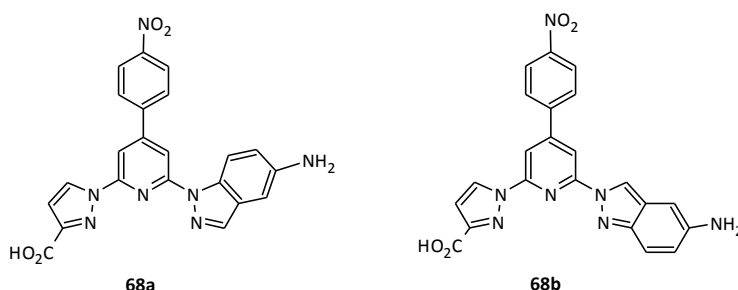
**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):**

**Isómero a:** 8,65 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1 H); 8,48 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1 H); 8,37 (m, 5 H); 8,21 (d,  $J = 0,9$  Hz, 1 H); 8,13 (d,  $J = 0,9$  Hz, 1 H); 8,05 (d,  $J = 0,9$  Hz, 1 H); 8,00-7,95 (m, 4 H); 7,06-6,99 (m, 4 H); 4,46 (c,  $J = 7,0$  Hz, 4 H); 1,44 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6 H).

**Isómero b:** 8,79 (s, 1 H); 8,70 (d,  $J = 2,7$  Hz, 1 H); 8,37 (m, 5 H); 8,28 (d,  $J = 0,9$  Hz, 1 H); 8,00-7,95 (m, 4 H); 7,58 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1 H); 7,06-6,99 (m, 4 H); 6,89 (dd,  $J = 1,5$  Hz, 8,5 Hz, 1 H); 6,75 (d,  $J = 0,9$  Hz, 1 H); 4,46 (c,  $J = 7,0$  Hz, 3 H); 1,44 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6 H).

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>):  $m/z = 470,1$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

**Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-carboxi-1-pirazolil)-4-(4-nitrofenil)piridina (68ab)**



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **67ab** (0,03 mmol). Se obtiene **68** como mezcla de isómeros (15,5 mg, 100%).

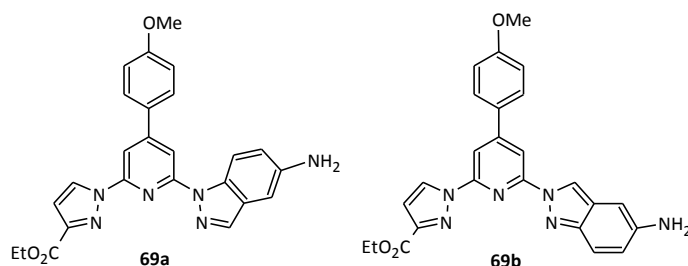
 **$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):**

**Isómero a:** 8,89 (d,  $J = 2,58$  Hz, 1 H); 8,35-8,29 (m, 4 H); 8,07 (m, 2 H); 7,93 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1 H); 7,79 (m, 1 H); 7,78-7,74 (m, 5 H); 7,16 (m, 2 H); 6,89 (m, 2 H); 6,73 (m, 1 H).

**Isómero b:** 9,32 (s ancho, 1 H); 8,89 (d,  $J = 2,6$  Hz, 2 H); 8,35-8,29 (m, 4 H); 8,07 (m, 2 H); 7,85 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1 H); 7,78-7,74 (m, 5 H); 7,30-7,26 (m, 1 H); 7,16 (m, 2 H); 6,89 (m, 2 H); 6,86 (m, 1 H).

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>):  $m/z = 442,1$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

**Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-4-(4-metoxifenil)piridina (69ab)**



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **66ab** (0,12 mmol) y el ácido 4-metoxifenilborónico. Se obtiene **69** como mezcla de isómeros (18 mg, 34%).

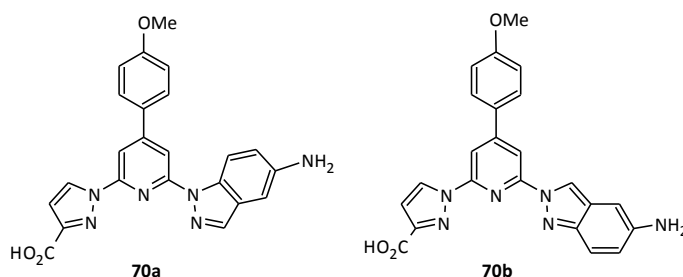
**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):**

Isómero a: 8,65 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H); 8,51 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1 H); 8,17 (s, 1 H); 8,12 (s, 1 H); 8,04 (s, 1 H); 7,82 (m, 4 H); 7,06-7,01 (m, 8 H); 4,47 (c,  $J = 7,0$  Hz, 4 H); 3,88 (s, 6 H); 1,46 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6 H).

Isómero b: 8,81 (s, 1 H); 8,69 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1 H); 8,36 (s, 1 H); 8,25 (s, 1 H); 7,82 (m, 4 H); 7,61 (d,  $J = 9,4$  Hz, 1 H); 7,06-7,01 (m, 8 H); 6,89 (dd,  $J = 1,4$  Hz, 9,32 Hz, 1 H); 6,78 (s, 1 H); 4,47 (c,  $J = 7,0$  Hz, 4 H); 3,88 (s, 6 H); 1,46 (t,  $J = 7,0$  Hz, 6 H).

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>):  $m/z = 455,2$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

**Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-carboxi-1-pirazolil)-4-(4-metoxifenil)piridina (70ab)**



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **69ab** (0,02 mmol). Se obtiene **70** como mezcla de isómeros (10 mg, 98%).

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):**

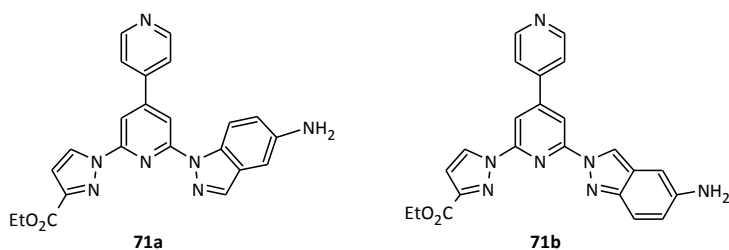
Isómero a: 8,89 (d,  $J = 2,5$  Hz, 2 H); 8,01 (m, 2 H); 7,88 (d,  $J = 1,4$  Hz, 1 H); 7,75 (m, 1 H); 7,60-7,57 (m, 4H); 7,15 (m, 2 H); 7,07-7,04 (m, 4 H); 6,89 (m, 3 H); 6,83 (m, 1 H); 3,81 (s, 6 H).

Isómero b: 8,96 (s ancho, 1 H); 8,89 (d,  $J = 2,5$  Hz, 2 H); 8,01 (m, 2 H); 7,80 (m, 1 H); 7,60-7,57 (m, 4H); 7,28 (m, 1 H); 7,07-7,04 (m, 4 H); 6,89 (m, 3 H); 6,86 (m, 1 H); 3,81 (s, 6 H).

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>):  $m/z = 427,1$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).



### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-4-piridilpiridina (71ab)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **66ab** (0,12 mmol) y el ácido piridilborónico. Se obtiene **71** como mezcla de isómeros (48 mg, 96%).

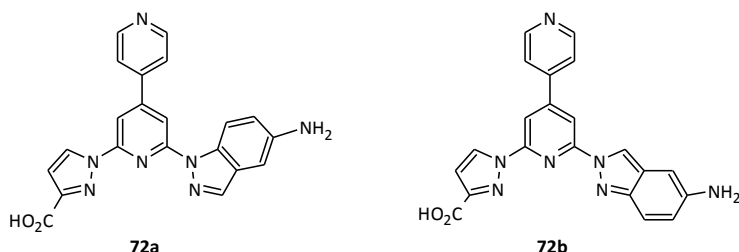
#### $^1\text{H-RMN}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ (ppm) (300 MHz):

Isómero a: 8,74 (s ancho, 4 H); 8,60 (m, 2 H); 8,41 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1 H); 8,15 (s, 1 H); 8,08 (s, 1 H); 8,00 (s, 1 H); 7,66 (s ancho, 4 H); 7,02-6,94 (m, 4 H); 4,46 (c,  $J = 6,0$  Hz, 4 H); 1,45 (t,  $J = 6,0$  Hz, 6 H).

Isómero b: 8,74 (s ancho, 4 H); 8,60 (m, 2 H); 8,33 (s, 1 H); 8,23 (s, 1 H); 7,66 (s ancho, 4 H); 7,54 (m, 1 H); 7,02-6,94 (m, 4 H); 6,87 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1 H); 6,71 (s, 1 H); 4,46 (c,  $J = 6,0$  Hz, 4 H); 1,45 (t,  $J = 6,0$  Hz, 6 H).

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>):  $m/z = 426,2$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-carboxil-1-pirazolil)-4-piridilpiridina (72ab)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **71ab** (0,11 mmol). Se obtiene **72** como mezcla de isómeros (42 mg, 93%).

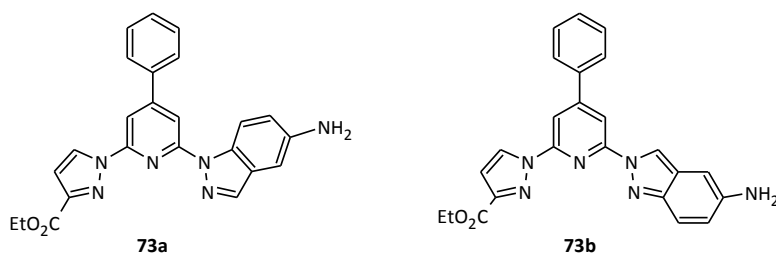
#### $^1\text{H-RMN}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ (ppm) (300 MHz):

Isómero a: 8,89 (d,  $J = 2,5$  Hz, 2 H); 8,69-8,67 (m, 4 H); 8,18 (m, 2 H); 8,04 (d,  $J = 1,4$  Hz, 1 H); 7,80-7,74 (m, 2 H); 7,58-7,56 (m, 4 H); 7,16 (m, 2 H); 6,89 (m, 2 H); 6,73 (m, 1 H).

Isómero b: 8,96 (s ancho, 1 H); 8,89 (d,  $J = 2,5$  Hz, 2 H); 8,69-8,67 (m, 4 H); 8,18 (m, 2 H); 7,96 (d,  $J = 1,4$  Hz, 1 H); 7,58-7,56 (m, 4 H); 7,28 (m, 1 H); 7,16 (m, 2 H); 6,89 (m, 2 H); 6,86 (m, 1 H).

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>):  $m/z = 398,1$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

## Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-4-fenilpiridina (73ab)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **66ab** (0,18 mmol) y el ácido fenilborónico. Se obtiene **73** como mezcla de isómeros (28 mg, 40%).

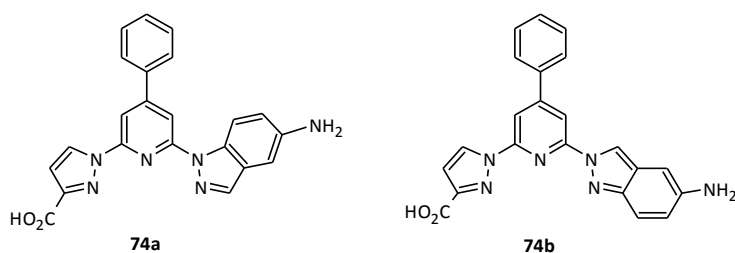
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):**

**Isómero a:** 8,63 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 8,48 (d, J= 8,8 Hz, 1 H); 8,19 (d, J= 0,8 Hz, 1 H); 8,14 (d, J= 0,8 Hz, 1 H); 8,02 (s, 1 H); 7,85-7,81 (m, 4 H); 7,51-7,46 (m, 6 H); 7,05-6,97 (m, 4 H); 4,47 (c, J= 7,1 Hz, 4 H); 1,45 (t, J= 7,1 Hz, 6 H).

**Isómero b:** 8,78 (s, 1 H); 8,68 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 8,37 (d, J=0,8 Hz, 1 H); 8,27 (d, J= 0,8 Hz, 1 H); 7,85-7,81 (m, 4 H); 7,59 (d, J= 8,8 Hz, 1 H); 7,51-7,46 (m, 6 H); 7,05-6,97 (m, 4 H); 6,87 (dd, J= 1,7 Hz, 8,8 Hz, 1 H); 6,76 (s, 1 H); 4,47 (c, J= 7,1 Hz, 4 H); 1,45 (t, J= 7,1 Hz, 6 H).

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>): m/z= 425,2 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

## Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-carboxil-1-pirazolil)-4-fenilpiridina (74ab)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **73ab** (0,06 mmol). Se obtiene **74** como mezcla de isómeros (24,5 mg, 95%).

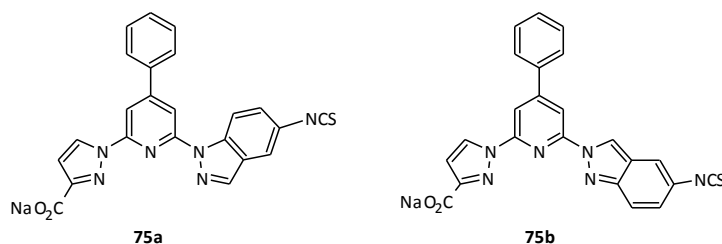
**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):**

**Isómero a:** 8,89 (d, J= 2,5 Hz, 2 H); 8,05 (m, 2 H); 7,91 (d, J= 1,5 Hz, 1 H); 7,79 (m, 1 H); 7,78-7,74 (m, 1 H); 7,59-7,54 (m, 10 H); 7,16 (m, 2 H); 6,89 (m, 2 H); 6,73 (m, 1 H).

**Isómero b:** 8,96 (s ancho, 1 H); 8,89 (d, J= 2,5 Hz, 2 H); 8,05 (m, 2 H); 7,83 (d, J= 1,5 Hz, 1 H); 7,59-7,54 (m, 10 H); 7,28 (m, 1 H); 7,16 (m, 2 H); 6,89 (m, 2 H); 6,86 (m, 1 H).

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>): m/z= 397,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de la sal sódica 2-(3-carboxil-1-pirazolil)-4-fenil-6-(5-isotiocanoindazolil)piridina (75ab)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **74ab** (0,13 mmol). Se obtiene **75** como mezcla de isómeros (54,5 mg, 97%).

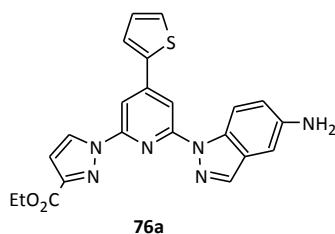
#### <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) (300 MHz):

Isómero a: 8,89 (d, J= 2,5 Hz, 2 H); 8,05 (m, 2 H); 7,95 (m, 1 H); 7,91 (d, J= 1,5 Hz, 1 H); 7,77 (s ancho, 1 H); 7,67-7,63 (m, 3 H); 7,59-7,51 (m, 12 H); 6,89 (d, J= 2,5 Hz, 2 H).

Isómero b: 8,94 (s ancho, 1 H); 8,89 (d, J= 2,5 Hz, 2 H); 8,05 (m, 2 H); 7,83 (d, J= 1,5 Hz, 1 H); 7,67-7,63 (m, 3 H); 7,59-7,51 (m, 12 H); 6,89 (d, J= 2,5 Hz, 2 H).

**E.M.** (MALDI): m/z= 461,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-amino-1-indazolil)-6-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-4-tienilpiridina (76a)



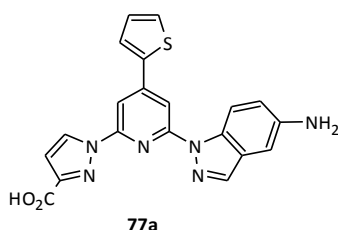
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **66ab** (0,12 mmol) y el ácido 2-tienilborónico. Se obtiene **76a** (30 mg, 60%).

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz): 8,63 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 8,48 (d, J= 8,7 Hz, 1 H); 8,17 (s, 1 H); 8,10 (s, 1 H); 8,05 (s, 1 H); 7,74 (d, J= 4,0 Hz, 1 H); 7,47 (d, J= 4,0 Hz, 1 H); 7,17 (t, J= 4,0 Hz, 1 H); 7,06-6,99 (m, 3 H); 4,48 (c, J= 7,1 Hz, 2 H); 1,47 (t, J= 7,1 Hz, 3 H).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz): 161,8; 151,6; 150,3; 149,2; 143,7; 140,5; 139,0; 138,9; 138,3; 135,0; 128,2; 125,0; 118,6; 118,4; 117,0; 110,6; 110,2; 107,3; 101,1; 61,2; 14,2.

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>): m/z= 431,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-amino-1-indazolil)-6-(3-carboxil-1-pirazolil)-4-tienilpiridina (77a)



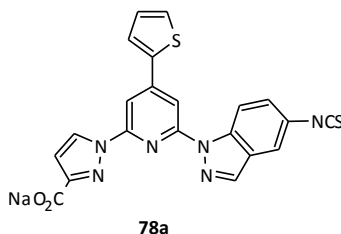
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **76a** (0,03 mmol). Se obtiene **77a** (13 mg, 92%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,72 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 8,57 (d, J= 8,7 Hz, 1 H); 8,26 (s, 1 H); 8,19 (s, 1 H); 8,13 (s, 1 H); 7,85 (d, J= 4,0 Hz, 1 H); 7,56 (d, J= 4,0 Hz, 1 H); 7,23 (t, J= 4,0 Hz, 1 H); 7,11-7,06 (m, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 184,2; 151,1; 150,7; 145,7; 143,7; 140,5; 139,8; 139,0; 138,3; 135,0; 130,6; 125,0; 118,6; 118,4; 116,9; 113,3; 110,8; 110,3; 107,3; 101,1.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 403,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de la sal sódica 2-(3-carboxi-1-pirazolil)-6-(5-isotiocianato-1-indazolil)-4-tienilpiridina (78a)

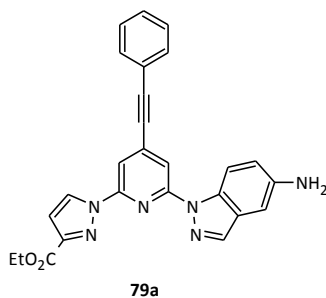


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **77a** (0,15 mmol). Se obtiene **78a** (62 mg, 95%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,78 (d, J= 2,5 Hz, 1 H); 8,75 (d, J= 8,7 Hz, 1 H); 8,60 (s, 1 H); 8,18 (s, 1 H); 8,07-8,04 (m, 2 H); 7,96-7,88 (m, 2H); 7,71-7,68 (m, 1 H); 7,35-7,31 (m, 1 H); 7,02 (m, 1 H).

**E.M. (MALDI):** m/z= 467,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-amino-1-indazolil)-6-(3-etoxicarbonil-1-pirazolil)-4-feniletinilpiridina (79a)



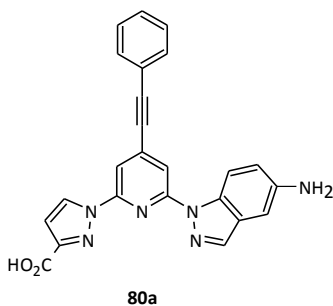
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **66a** (0,12 mmol) y el fenilacetileno. Se obtiene **79a** (30 mg, 54%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,59 (d, J= 2,6 Hz, 1 H); 8,45 (d, J= 8,8 Hz, 1 H); 8,10 (d, J= 0,8 Hz, 1 H); 8,06 (d, J= 0,8 Hz, 1 H); 8,02-7,99 (m, 3 H); 7,60-7,56 (m, 1 H); 7,41-7,39 (m, 2 H); 7,06-6,98 (m, 3 H); 4,48 (c, J= 7,1 Hz, 2 H); 1,45 (t, J= 7,1 Hz, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 161,9; 151,6; 150,2; 144,3; 143,7; 138,3; 131,7; 129,9; 128,8; 128,6; 128,2; 124,0; 120,7; 118,6; 118,4; 118,3; 110,2; 109,4; 101,1; 91,9; 91,2; 51,8.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 449,2 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis del 2-(5-amino-1-indazolil)-6-(3-carboxil-1-pirazolil)-4-feniletinilpiridina (80a)



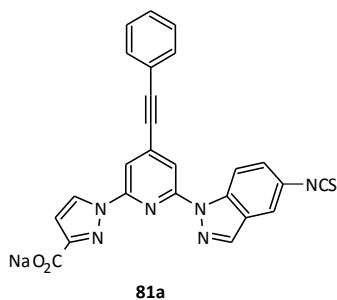
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 220 a partir de **80a** (0,06 mmol). Se obtiene **80a** (26 mg, 95%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,85 (d, J= 0,8 Hz, 1 H); 8,77-8,75 (m, 1 H); 8,43 (d, J= 2,4 Hz, 1 H); 8,25 (d, J= 1,3 Hz, 1 H); 8,17 (d, J= 1,3 Hz, 1 H); 8,12 (d, J= 0,8 Hz, 1 H); 8,05 (d, J= 0,8 Hz, 1 H); 7,88 (dd, J= 1,5 Hz, 6,8 Hz, 1 H); 7,66-7,60 (m, 3 H); 7,47 (d, J= 1,5 Hz, 1 H); 7,09 (m, 1 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 184,2; 151,1; 150,7; 145,7; 143,7; 138,3; 131,7; 130,80; 130,6; 129,9; 128,8; 128,6; 124,0; 120,7; 118,8; 118,4; 118,3; 113,3; 109,4; 101,1; 91,9; 91,2.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 421,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de la sal 2-(3-carboxi-1-pirazolil)-4-feniletinil-6-(5-isotiociano-1-indazolil) piridina (81a)



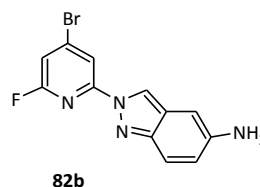
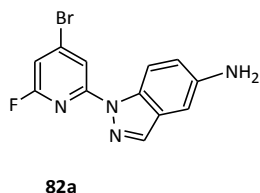
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **80a** (0,27 mmol). Se obtiene **81a** (120 mg, 95%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,86 (d, J= 0,8 Hz, 1 H); 8,82-8,74 (m, 2 H); 8,60 (d, J= 1,3 Hz, 1 H); 8,16 (d, J= 1,3 Hz, 1 H); 8,08 (d, J= 0,8 Hz, 1 H); 7,94 (d, J= 0,8 Hz, 1 H); 7,76 (dd, J= 1,5 Hz, 6,85 Hz, 1 H); 7,70-7,67 (m, 2 H); 7,52 (m, 1 H); 7,14 (d, J= 1,5 Hz, 1 H); 7,09 (m, 1 H).

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 485,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

#### 7.2.5. Ligandos sustituidos por 3-carboxiindazol y 5-aminoindazol

##### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-4-bromo-6-fluorpiridina (82ab)



A un matraz que contiene THF seco (50 mL), 4-bromo-2,6-difluorpiridina (1 g, 5,26 mmol) y 5-aminoindazol (700 mg, 5,26 mmol), se añade bajo atmósfera de argón hidruro sódico (80% en aceite mineral, 126,2 mg, 5,26 mmol). Se agita durante 3 días a 45<sup>0</sup>C. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se disuelve en diclorometano (50 ml), se lava con agua (2 x 50 ml) y con una disolución de cloruro sódico saturada (50 ml). La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro y se filtra, eliminando el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se purifica mediante cromatografía en sílice (diclorometano y metanol al 1%). Se obtiene **82** como mezcla de isómeros (1,4 g, 87%).

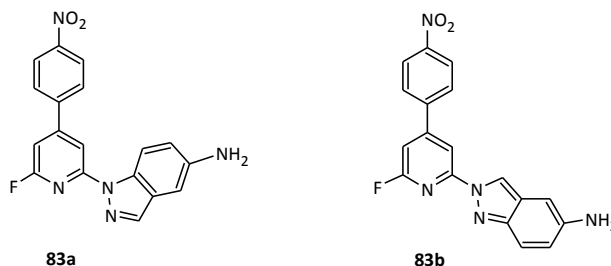
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):**

Isómero a: 8,53 (d, J= 8,8 Hz, 1 H); 8,06 (s, 1 H); 8,00 (s, 1 H); 6,97 (d, J= 2,2 Hz, 1 H); 6,95-6,93 (m, 1 H); 6,86 (m, 1 H).

**Isómero b:** 8,64 (s, 1 H); 8,27 (s, 1 H); 7,54 (d, J= 9,20 Hz, 1 H); 7,03 (m, 1 H); 6,89 (d, J= 2,2 Hz, 1 H); 6,71 (m, 1 H).

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>): m/z= 306,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%); 308,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-fluor-4-(4-nitrofenil)piridina (83ab)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **82ab** (0,33 mmol) y el ácido 4-nitrofenilborónico. Se obtiene **83** como mezcla de isómeros (39 mg, 33%).

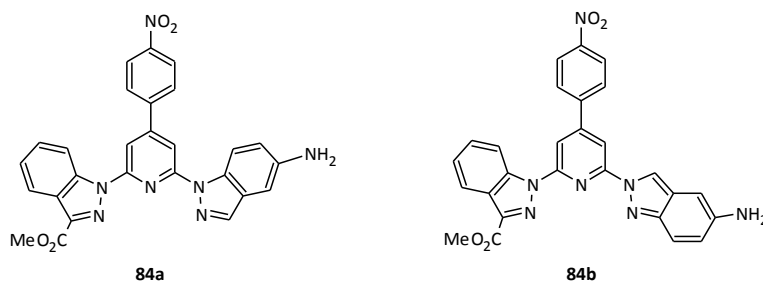
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):**

**Isómero a:** 8,61 (d, J= 8,88 Hz, 1 H); 8,38-8,33 (m, 6 H); 8,12 (s, 1 H); 8,03 (s, 1 H); 7,89 (m, 3 H); 7,01-6,96 (m, 1 H); 6,88 (m, 2 H).

**Isómero b:** 8,73 (s, 1 H); 8,38-8,33 (m, 6 H); 7,89 (m, 3 H); 7,56 (d, J= 9,26 Hz, 2 H); 7,07 (s, 1 H); 6,88 (m, 2 H); 6,75 (s, 1 H).

**E.M.** (ESI<sup>+</sup>): m/z= 350,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)-4-(4-nitrofenil)piridina (84ab)

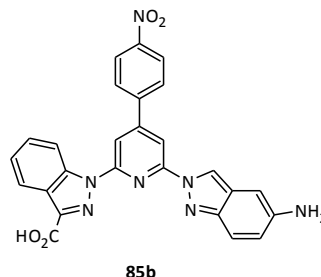
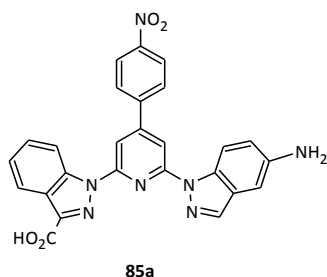


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **83ab** (0,11 mmol). Se obtiene **84** como mezcla de isómeros (16 mg, 28%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,81 (s ancho, 2 H); 8,37-8,30 (m, 9 H); 8,08 (dd, J= 0,8 Hz, 5,2 Hz, 1 H); 7,98 (m, 4 H); 7,71-7,46 (m, 7 H); 7,01-6,90 (m, 4 H); 6,81 (d, J= 0,8 Hz, 1 H); 4,11 (s, 6 H).

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>): m/z= 506,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-amino-indazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)-4-(4-nitrofenil)piridina (85ab)

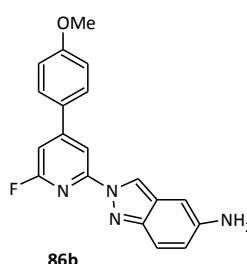
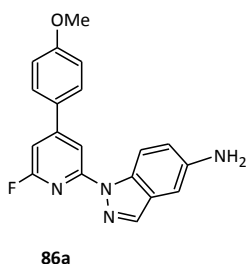


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **84ab** (0,03 mmol). Se obtiene **85** como mezcla de isómeros (14,5 mg, 95%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 9,21 (s ancho, 2 H); 8,59-8,52 (m, 9 H); 8,30 (dd, J= 0,9 Hz, 5,2 Hz, 1 H); 8,20 (m, 4 H); 7,93-7,68 (m, 7 H); 7,23-7,12 (m, 4 H), 7,01 (d, J= 0,9 Hz, 1 H).

**E.M. (ESI<sup>+</sup>):** m/z= 492,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-fluorpiridina-4-(4-metoxifenil)piridina (86ab)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **82ab** (0,33 mmol) y el ácido 4-metoxifenilborónico. Se obtiene **86** como mezcla de isómeros (39 mg, 35%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):**

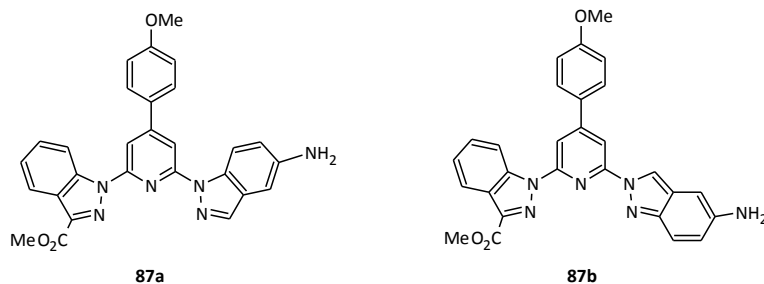
**Isómero a:** 8,63 (d, J= 8,8 Hz, 1 H); 8,07 (s ancho, 1 H); 8,02 (s, 1 H); 7,73-7,68 (m, 4 H); 7,03-6,99 (m, 7 H); 6,87 (m, 1 H); 3,88 (s, 6 H).

**Isómero b:** 8,74 (s, 1 H); 8,28 (s ancho, 1 H); 7,73-7,68 (m, 4 H); 7,58 (d, J= 9,21 Hz, 1 H); 7,03-6,99 (m, 7 H); 6,89 (d, J= 1,9 Hz, 1 H); 6,76 (d, J= 1,4 Hz, 1 H); 3,88 (s, 6 H).

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 335,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).



### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)-4-(4-metoxifenil)piridina (87ab)

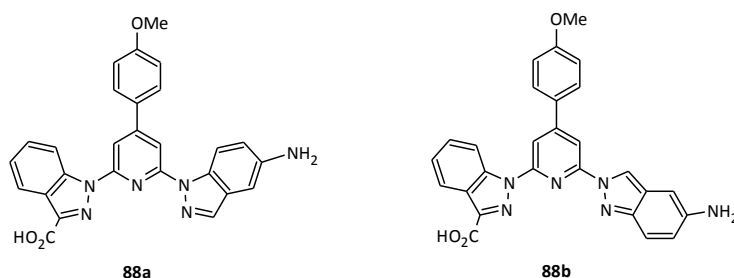


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **86ab** (0,11 mmol). Se obtiene **87** como mezcla de isómeros (22 mg, 40%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,81 (s ancho, 1 H); 8,68 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,62 (d, J= 9,3 Hz, 1 H); 8,50 (d, J= 9,3 Hz, 1 H); 8,33 (d, J= 7,8 Hz, 1 H); 8,26 (s ancho, 1 H); 8,15 (s, 1 H); 8,06 (m, 3 H); 8,00 (s, 1 H); 7,81 (d, J= 8,5 Hz, 2 H); 7,67 (d, J= 9,3 Hz, 3 H); 7,54-7,41 (m, 2 H); 7,04-6,83 (m, 10 H); 4,11 (s, 6 H); 3,88 (s, 6 H).

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 491,2 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)-4-(4-metoxifenil)piridina (88ab)

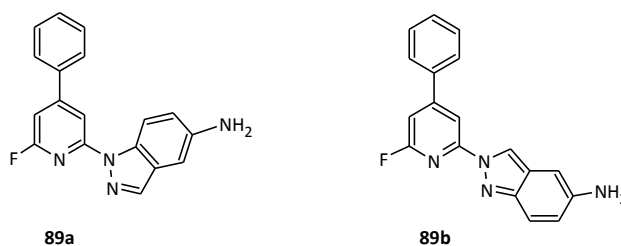


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **87ab** (0,04 mmol). Se obtiene **88** como mezcla de isómeros (21 mg, 98%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 9,21 (s, 1 H); 8,90 (d, J= 8,6 Hz, 2 H); 8,32 (m, 2 H); 8,08 (s, 2 H); 8,02-7,98 (m, 3 H); 7,92 (m, 2 H); 7,71-7,65 (m, 4 H); 7,56-7,48 (m, 4 H); 7,43-7,37 (m, 2 H); 7,08-6,91 (m, 6 H).

**E.M. (ESI<sup>+</sup>):** m/z= 477,2 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-4-fenil-6-fluorpiridina (89ab)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **82ab** (0,33 mmol) y el ácido fenilborónico. Se obtiene **89** como mezcla de isómeros (40 mg, 40%).

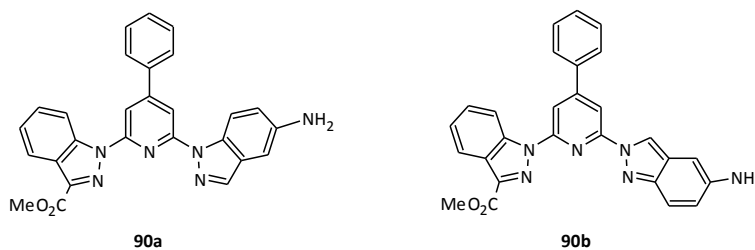
#### <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):

Isómero a: 8,63 (d, J = 8,8 Hz, 1 H); 8,11 (s, 1 H); 8,02 (s, 1 H); 7,76-7,71 (m, 4 H); 7,52-7,48 (m, 6 H); 7,00-6,86 (m, 4 H).

Isómero b: 8,74 (s, 1 H); 8,32 (s, 1 H); 7,76-7,71 (m, 4 H); 7,58 (d, = 8,8 Hz, 1 H); 7,52-7,48 (m, 6 H); 7,06 (s, 1 H); ); 7,00-6,86 (m, 4 H); 6,77 (d, J = 0,9 Hz, 1 H).

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>): m/z = 305,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-4-fenil-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)piridina (90ab)



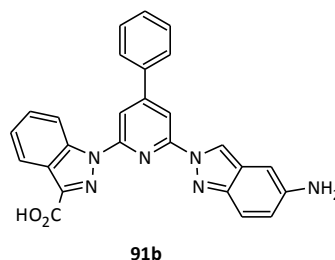
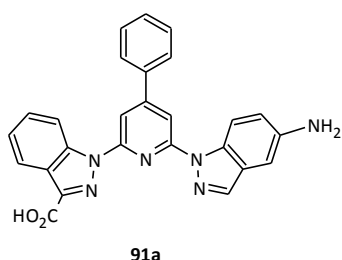
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **89ab** (0,13 mmol). Se obtiene **90** como mezcla de isómeros (16 mg, 26%).

#### <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):

8,81 (s, 1 H); 8,78 (d, J = 3,1 Hz, 1 H); 8,68 (d, J = 8,5 Hz, 1 H); 8,50 (d, J = 8,5 Hz, 1 H); 8,35-8,29 (m, 4 H); 8,16 (s, 1 H); 8,07 (d, J = 8,5 Hz, 1 H); 7,86-7,83 (m, 3 H); 7,70 (d, J = 7,5 Hz, 1 H); 7,67-7,60 (m, 3 H); 7,53-7,42 (m, 9 H); 6,99 (d, J = 0,9 Hz, 1 H); 6,94-6,87 (m, 2 H); 6,81 (s, 1 H); 4,09 (s, 6 H).

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>): m/z = 461,2 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)4-fenilpiridina (91ab)

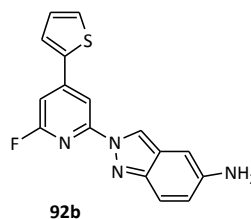
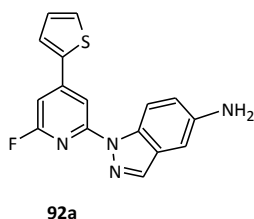


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **90ab** (0,03 mmol). Se obtiene **91** como mezcla de isómeros (13 mg, 87%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 9,52 (s, 1 H); 8,41 (s, 1 H); 8,31 (s, 1 H); 8,24 (d, J= 7,9 Hz, 2 H); 8,05 (s, 1 H); 7,89 (m, 2 H); 7,82-7,77 (m, 2 H); 7,61-7,49 (m, 8 H); 7,38 (dd, J= 1,1 Hz, 9,48 Hz, 2 H).

**E.M. (ESI<sup>+</sup>):** m/z= 447,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-fluor-4-tienilpiridina (92ab)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **82ab** (0,33 mmol) y el ácido 2-tienilborónico. Se obtiene **92** (30 mg, 28%).

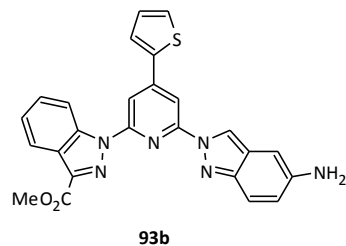
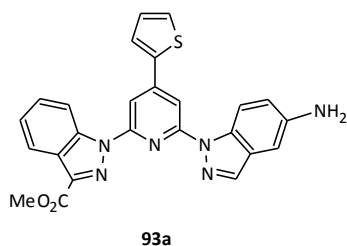
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):**

**Isómero a:** 8,59 (d, J= 7,2 Hz, 1 H); 8,47 (d, J= 8,9 Hz, 1 H); 8,14 (s, 1 H); 8,07-8,04 (m, 3 H); 8,01 (s, 1 H); 7,60 (m, 2 H); 7,53-7,40 (m, 2 H); 7,18-7,12 (m, 2 H); 6,94-6,87 (m, 3 H).

**Isómero b:** 8,65 (d, J= 8,9 Hz, 1H); 8,32 (d, J= 7,2 Hz, 1H); 8,14 (s, 1 H); 7,60 (m, 2 H); 7,53-7,40 (m, 2 H); 7,18-7,12 (m, 2 H); 6,94-6,87 (m, 3 H).

**E.M. (ESI<sup>+</sup>):** m/z= 311,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)-4-tienilpiridina (93ab)

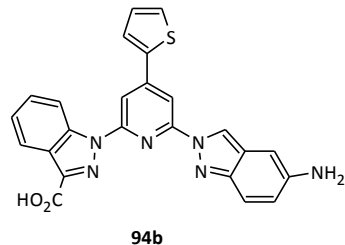
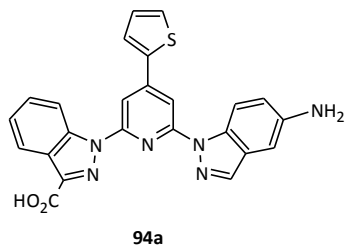


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **92ab** (0,09 mmol). Se obtiene **93** como mezcla de isómeros (22 mg, 52%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,65 (d, J= 8,4 Hz, 1 H); 8,58 (d, J= 8,8 Hz, 1 H); 8,47 (d, J= 8,8 Hz, 1 H); 8,32 (d, J= 8,4 Hz, 1 H); 8,21 (d, J= 8,4 Hz, 1 H); 8,14 (s, 1 H); 8,07-8,04 (m, 3 H); 8,01 (s, 1 H); 7,77 (s, 1 H); 7,72 (d, J= 3,1 Hz, 1 H); 7,59 (d, J= 3,1 Hz, 1 H); 7,53-7,40 (m, 6 H); 7,36-7,30 (m, 1 H); 7,18-7,12 (m, 2 H); 6,99-6,86 (m, 4 H); 4,12 (s, 6 H).

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 467,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis del 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)-4-tienilpiridina (94ab)

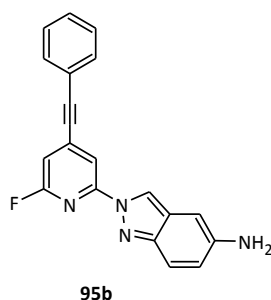


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **93ab** (0,05 mmol). Se obtiene **94** como mezcla de isómeros (20,6 mg, 97%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 9,18 (d, J= 8,3 Hz, 1 H); 8,99 (d, J= 8,9 Hz, 1 H); 8,73 (d, J= 8,9 Hz, 1 H); 8,70 (d, J= 8,3 Hz, 1 H); 8,59 (d, J= 8,3 Hz, 1 H); 8,54 (s, 1 H); 8,50-8,45 (m, 3 H); 8,36 (s, 1 H); 8,29 (s, 1 H); 8,19 (d, J= 3,1 Hz, 1 H); 8,14 (d, J= 3,1 Hz, 1 H); 7,84-7,75 (m, 6 H); 7,69-7,61 (m, 1 H); 7,36-7,30 (m, 2 H); 7,16-7,10 (m, 4 H).

**E.M. (ESI<sup>+</sup>):** m/z= 453,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-amino-2-indazolil)-4-feniletinil-6-fluorpiridina (95b)



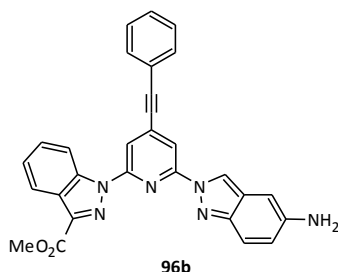
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **82b** (0,33 mmol) y el fenilacetileno. Se obtiene **95b** (40 mg, 37%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,58 (d, J= 8,8 Hz, 1 H); 8,01 (s, 1 H); 7,98 (s, 1 H); 7,57-7,55 (m, 2 H); 7,40 (m, 3 H); 6,99-6,95 (m, 2 H); 6,77 (s ancho, 1 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 163,5; 161,5; 153,8; 143,7; 138,3; 132,7; 131,7; 129,3; 128,8; 128,6; 122,6; 119,3; 118,5; 118,4; 110,0; 108,0; 101,1; 91,2; 88,3.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 329,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-amino-2-indazolil)-4-feniletinil-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)piridina (96b)



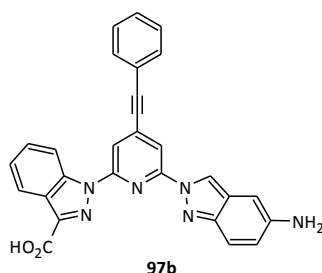
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **95b** (0,11 mmol). Se obtiene **96b** (48 mg, 90%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,64 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,44 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,32 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,05-7,98 (m, 3 H); 7,59-7,56 (m, 2 H); 7,40-7,38 (m, 2 H); 7,29 (d, J= 2,4 Hz, 2 H); 6,97 (d, J= 1,5 Hz, 1 H); 6,91-6,87 (m, 2 H); 4,11 (s, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 163,7; 150,5; 148,4; 143,7; 138,3; 137,2; 132,0; 131,7; 129,9; 128,8; 128,6; 128,1; 126,6; 124,0; 124,0; 122,9; 120,7; 119,4; 118,4; 116,2; 116,0; 109,7; 109,4; 101,1; 91,9; 91,2; 53,0.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 485,2 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-amino-2-indazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)-4-feniletinilpiridina (97b)



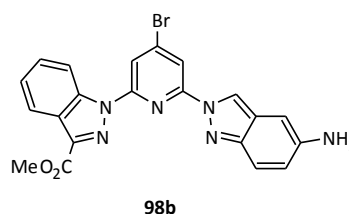
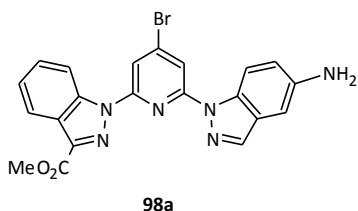
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **96b** (0,11 mmol). Se obtiene **97b** (48 mg, 92%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,60 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,54 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,48 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,34-8,24 (m, 3 H); 7,66-7,61 (m, 2 H); 7,58-7,56 (m, 2 H); 7,54 (d, J= 2,4 Hz, 2 H); 7,42 (d, J= 1,5 Hz, 1 H); 7,33-7,31 (m, 2 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 153,2; 149,7; 149,3; 143,7; 139,1; 138,3; 131,7; 131,0; 129,9; 129,0; 128,8; 128,6; 126,8; 124,0; 123,3; 122,1; 120,7; 118,5; 118,4; 116,4; 116,0; 109,4; 108,8; 101,1; 91,9; 91,2.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 471,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(5-aminoindazolil)-4-bromo-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)piridina (98ab)

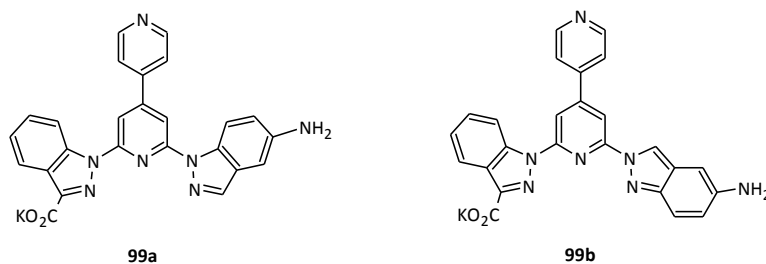


Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **82ab** (0,11 mmol). Se obtiene **98** como mezcla de isómeros (588 mg, 87%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,76 (s, 1 H); 8,73 (s, 1 H); 8,63-8,57 (m, 1 H); 8,36-8,29 (m, 4 H); 8,13-8,06 (m, 3 H); 7,69-7,58 (m, 3 H); 7,52-7,41 (m, 3 H); 6,90 (dd, J= 1,9 Hz, 9,1 Hz, 2 H); 6,83 (d, J= 1,3 Hz, 1 H); 6,79 (d, J= 1,3 Hz, 1 H); 4,10 (s, 6 H).

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 463,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de la sal potásica 2-(5-aminoindazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)-4-piridil piridina (99ab)



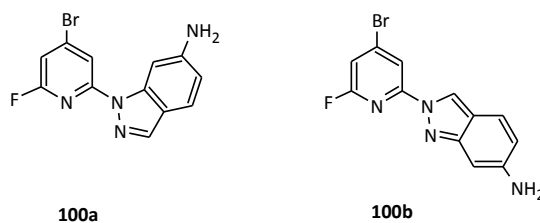
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **98ab** (0,22 mmol) y el ácido piridilborónico. Se obtiene **99** como mezcla de isómeros (47 mg, 44%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 9,06 (s ancho, 4 H); 8,76 (s, 1 H); 8,73 (s, 1 H); 8,63-8,57 (m, 1 H); 8,51 (s ancho, 4 H); 8,36-8,29 (m, 4 H); 8,13-8,06 (m, 3 H); 7,69-7,58 (m, 3 H); 7,52-7,41 (m, 3 H); 6,90 (dd, J= 1,9 Hz, 9,1 Hz, 2 H); 6,83 (d, J= 1,3 Hz, 1 H); 6,79 (d, J= 1,3 Hz, 1 H).

**E.M. (ESI<sup>-</sup>):** m/z= 446,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

#### 7.2.6. Ligandos sustituidos por 3-carboxilindazol y 6-aminoindazol

##### Síntesis de 2-(6-aminoindazolil)-4-bromo-6-fluorpiridina (100a y 100b)



A un matraz que contiene tetrahydrofurano seco (50 mL), 4-bromo-2,6-difluorpiridina (1 g, 5,26 mmol) y 6-aminoindazol (700,4 mg, 5,26 mmol), se añade bajo atmósfera de argón hidruro sódico (80% en aceite mineral, 126,2 mg, 5,26 mmol). Se agita durante 30 minutos a 45<sup>0</sup>C. El disolvente elimina a presión reducida y el residuo se disuelve en diclorometano (50 mL), se lava con agua (2 x 50 mL) y con una disolución de cloruro sódico saturada (50 mL). La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro y se filtra, eliminando el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de sílice (diclorometano y metanol al 1%). Se obtienen los dos isómeros posibles **100** (sólido blanco, 450 mg, 28%) y **101** (sólido amarillo, 430 mg, 27%).

**Isómero 1 (100a)**

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,07 (s, 1 H); 8,00 (s, 1 H); 7,98 (d, J= 1,1 Hz, 1 H); 7,49 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 6,87 (dd, J= 1,1 Hz, 2,6 Hz, 1 H); 6,68 (dd, J= 1,9 Hz, 8,5 Hz, 1 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 162,1; 154,5; 147,8; 140,6; 138,4; 136,6; 121,8; 119,5; 113,8; 113; 106,8; 98,7.

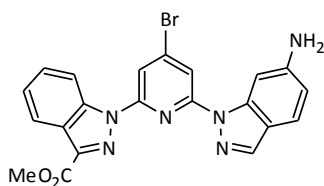
**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 307,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%); m/z= 309,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**Isómero 2 (100b)**

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,78 (s, 1 H); 8,25 (s, 1 H); 7,49 (d, J= 8,9 Hz, 1 H); 7,01 (d, J= 1,4 Hz, 1 H); 6,70 (s, 1 H); 6,60 (dd, J= 1,4 Hz, 8,9 Hz, 1 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 162,1; 150,4; 146,6; 152,5; 137,6; 121,4; 122,3; 118,4; 118; 113,5; 109,9; 95,5.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 307,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%); m/z= 309,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**Síntesis de 2-(6-amino-1-indazolil)-4-bromo-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)piridina (101a)**

Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **100a** (1,16 mmol). Se obtiene **101a** se obtiene como un sólido blanco (478 mg, 89%).

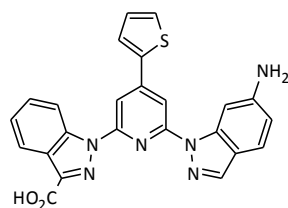
**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,69 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,29 (d, J= 8,1 Hz, 1 H); 8,11 (d, J= 1,3 Hz, 1 H); 8,05 (s, 1 H); 7,99 (d, J= 1,3 Hz, 1 H); 7,97 (s, 1H); 7,58 (m, 1H); 7,55-7,53 (m, 1 H); 7,46-7,41 (m, 1 H); 6,70 (dd, J= 1,8 Hz, 8,5 Hz, 1 H); 4,10 (s, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 163,7; 152,3; 151,2; 148,2; 144,4; 142,6; 137,2; 135,2; 128,9; 126,6; 123,1; 122,9; 122,7; 119,4; 118,6; 113,6; 112,7; 110,9; 108,7; 88,4; 53,0.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 463,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%); m/z= 465,0 ([M]<sup>+</sup>, 100%).



### Síntesis de 2-(6-amino-1-indazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)-4-tienilpiridina (102a)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **101a** (0,15 mmol) y el ácido 2-tienilborónico. Se obtiene **102a** (64 mg, 86%).

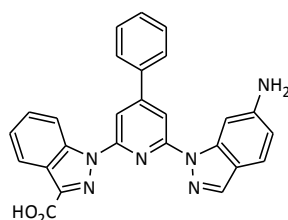
**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,67 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,26 (d, J= 7,7 Hz, 1 H); 8,21 (s, 1 H); 8,17 (s, 1 H); 8,06 (s, 1 H); 8,00 (d, J= 1,0 Hz, 1 H); 7,85 (dd, J= 2,7 Hz, 7,7 Hz, 1 H); 7,63-7,47 (m, 4 H); 7,29 (dd, J= 3,8 Hz, 4,9 Hz, 1 H), 6,69 (dd, J= 1,5 Hz, 8,5 Hz, 1 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 163,2; 153,1; 152,0; 150,3; 145,8; 141,9; 140,5; 139,7; 138,4; 129,4; 129,3; 128,8; 127,7; 124,6; 124,6; 122,1; 121,9; 117,6; 114,5; 114,5; 113,7; 106,7; 105,9; 95,3.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 491,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**UV/Vis (EtOH):** 260 nm (38045); 302 nm (26560); 318 nm (26580); 333 nm (18450).

### Síntesis de 2-(6-amino-1-indazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)-4-fenilpiridina (103a)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **101a** (0,15 mmol) y el ácido fenilborónico. Se obtiene **103a** (65 mg, 89%).

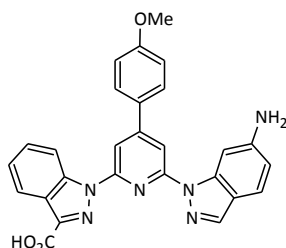
**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 9,11 (s, 1 H); 8,29 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,05 (m, 2 H); 7,93 (s, 1 H); 7,73 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 7,55-7,52 (m, 2 H); 7,41 (m, 1 H); 7,36 (m, 1 H); 7,28-7,24 (m, 3 H); 7,16 (m, 2 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 165,7; 153,8; 153,5; 152,4; 140,7; 139,4; 139,0; 138,9; 138,8; 136,4; 131,7; 131,0; 130,0; 127,4; 127,2; 125,9; 125,1; 124,3; 123,8; 118,6; 115,0; 111,7; 110,6; 108,8.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 485,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**UV/Vis (EtOH):** 259 nm (39020); 318 nm (21545); 339 nm (17440).

### Síntesis de 2-(6-amino-1-indazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)-4-(4-metoxifenil)piridina (104a)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **101a** (0,15 mmol) y el ácido 2-tienilborónico. Se obtiene **104a** (69 mg, 89%).

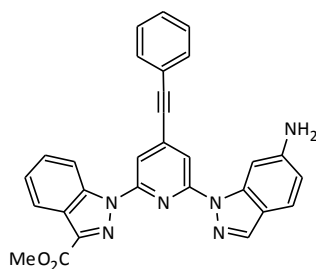
**<sup>1</sup>H-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 8,98 (s, 1 H); 8,16 (d, J= 8,4 Hz, 1 H); 7,89 (d, J= 8,0 Hz, 1 H); 7,78 (s, 1 H); 7,58 (m, 2 H); 7,48-7,45 (m, 1 H); 7,34- 7,31 (m, 1 H); 7,23-7,20 (m, 2 H); 6,83 (d, J= 8,0 H, 2 H); 6,57 (d, J= 8,4 Hz, 2 H); 3,81 (s, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) (300 MHz):** 165,5; 162,5; 153,1; 152,5; 152,0; 140,3; 139,0; 138,6; 138,6; 138,5; 131,2; 131,1; 129,8; 128,2; 127,9; 127,2; 125,7; 124,9; 124,0; 123,6; 118,5; 115,1; 115,0; 111,8; 109,5; 107,5; 55,9.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 515,2 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**UV/Vis (EtOH):** 264 nm (35590); 283 nm (33240); 299 nm (33010); 312 nm (29660); 335 nm (20675).

### Síntesis de 2-(6-amino-1-indazolil)-4-feniletinil-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)piridina (105a)



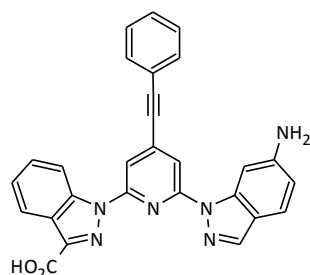
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **101a** (0,15 mmol) y el fenilacetileno. Se obtiene **105a** (49 mg, 67%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,74 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,31 (d, J= 8,1 Hz, 1 H); 8,05-8,03 (m, 3 H); 7,94 (s, 1 H); 7,59-7,51 (m, 4 H); 7,43-7,39 (m, 4 H); 6,72 (dd, J= 1,6 Hz, 8,5 Hz, 1 H); 4,11 (s, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 163,7; 151,6; 150,5; 148,2; 137,2; 135,2; 133,8; 132,0; 131,7; 128,8; 128,6; 128,1; 126,6; 124,0; 124,0; 122,9; 122,7; 119,6; 119,4; 116,2; 114,4; 113,6; 109,7; 91,9; 91,2; 89,3; 53,0.

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>): m/z= 485,2 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(6-amino-1-indazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)-4-feniletinilpiridina (106a)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **105a** (0,06 mmol). Se obtiene **106a** (26 mg, 95%).

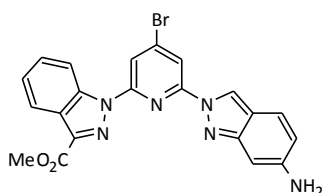
**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,94 (s, 1 H); 8,68 (d, J= 8,4 Hz, 1 H); 8,64 (d, J= 8,0 Hz, 1 H); 8,50 (s, 1 H); 8,28-8,20 (m, 3 H); 7,99 (m, 2 H); 7,93-7,89 (m, 2 H); 7,76-7,73 (m, 3 H); 6,70 (dd, J= 1,6 Hz, 8,4 Hz, 1 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 153,2; 152,5; 149,7; 148,2; 139,1; 135,2; 133,8; 131,7; 131,0; 129,0; 128,8; 128,6; 126,8; 124,0; 123,3; 122,7; 122,1; 119,6; 118,5; 116,4; 114,4; 113,6; 91,9; 91,2; 89,3.

**E.M.** (FAB<sup>+</sup>): m/z= 471,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**UV/Vis (EtOH):** 265 nm (40795); 290 nm (39400); 304 nm (35100); 317 nm (29150); 336 nm (17170).

### Síntesis de 2-(6-amino-2-indazolil)-4-bromo-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)piridina (101b)



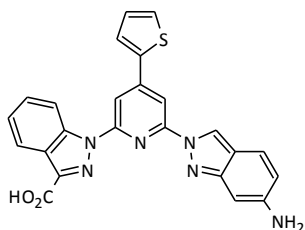
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **100b** (1,11 mmol). Se obtiene **101b** (490 mg, 95%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,89 (s, 1 H); 8,76 (d, J= 8,7 Hz, 1 H); 8,35 (s, 1 H); 8,32-8,30 (m, 1 H); 7,71-7,65 (m, 1 H); 7,58 (d, J= 9,0 Hz, 1 H); 7,51-7,46 (m, 2 H); 6,78 (d, J= 1,3 Hz, 1 H); 6,66 (dd, J= 1,8 Hz, 9,0 Hz, 1 H); 4,11 (s, 3 H).

**$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 165,7; 163,7; 153,8; 151,8; 151,2; 142,6; 137,2; 131,5; 126,6; 123,1; 122,9; 122,6; 121,2; 121,1; 119,4; 117,76; 115,0; 113,6; 108,7; 97,7; 53,0.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):**  $m/z=$  463,0 ( $[\text{M}]^+$ , 100%), 465,0 ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

### Síntesis de 2-(6-amino-2-indazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)-4-tienilpiridina (102b)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **101b** (0,15 mmol) y el ácido 2-tienilborónico. Se obtiene **102b** (61 mg, 82%).

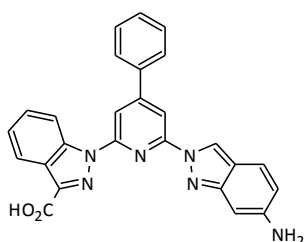
**$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 9,05 (s, 1 H); 8,83 (d,  $J=$  8,4 Hz, 1 H); 8,30 (d,  $J=$  8,4 Hz, 1 H); 8,22 (s, 1 H); 8,13 (s, 1 H); 8,05 (m, 1 H); 7,88 (m, 1 H); 7,74 (t,  $J=$  7,4 Hz, 1 H); 7,58 (d,  $J=$  8,4 Hz, 1 H); 7,49 (t,  $J=$  7,4 Hz, 1 H); 7,31 (m, 1 H); 6,68 (d,  $J=$  8,4 Hz, 1 H); 6,53 (s, 1 H).

**$^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 163,2; 162,3; 152,7; 152,2; 150,9; 148,7; 148,6; 146,1; 139,5; 139,4; 129,5; 129,3; 128,9; 127,9; 124,8; 124,2; 121,8; 121,0; 119,1; 117,2; 114,8; 106,6; 105,3; 92,1.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):**  $m/z=$  491,1 ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

**UV/Vis (EtOH):** 260 nm (10695); 306 nm (10670); 324 nm (11740).

### Síntesis de 2-(6-amino-2-indazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)-4-fenilpiridina (103b)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **101b** (0,15 mmol) y el ácido fenilborónico. Se obtiene **103b** (62 mg, 85%).

**$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 9,07 (s, 1 H); 8,86 (d,  $J=$  8,5 Hz, 1 H); 8,29 (s, 1 H); 8,26 (m, 1 H); 8,19 (d,  $J=$  1,0 Hz, 1 H); 7,96 (d,  $J=$  1,9 Hz, 1 H); 7,94 (d,  $J=$  1,0 Hz, 1 H);

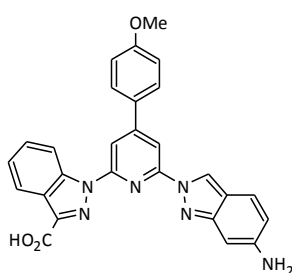
7,76 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1 H); 7,61-7,57 (m, 4 H); 7,40-7,38 (m, 1 H); 6,67 (dd,  $J = 1,9$  Hz, 8,5 Hz, 1 H); 6,52 (s, 1 H).

$^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 163,0; 162,3; 153,3; 152,4; 152,2; 150,8; 148,5; 139,4; 136,7; 133,3; 133,1; 130,1; 129,4; 128,8; 127,1; 124,6; 121,8; 121,0; 119,0; 117,3; 114,9; 108,9; 107,5; 92,2.

E.M. (FAB $^+$ ):  $m/z = 485,1$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

UV/Vis (EtOH): 260 nm (27800); 302 nm (27800); 320 nm (31745).

### Síntesis de 2-(6-amino-2-indazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)-4-(4-metoxifenil)piridina (104b)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **101b** (0,15 mmol) y el ácido 4-metoxifenilborónico. Se obtiene **104b** (62 mg, 80%).

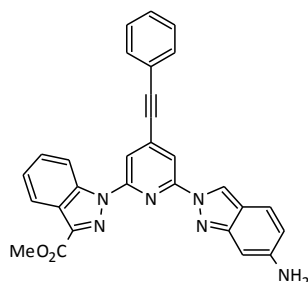
$^1\text{H-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 9,06 (s, 1 H); 8,86 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1 H); 8,26 (s, 1 H); 8,25 (m, 1 H); 8,16 (d,  $J = 1,0$  Hz, 1 H); 7,94 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2 H); 7,77 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1 H); 7,60-7,50 (m, 2 H); 7,15 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2 H); 6,67 (dd,  $J = 1,4$  Hz, 8,6 Hz, 1 H); 6,52 (s, 1 H); 3,86 (s, 3 H).

$^{13}\text{C-RMN}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz): 162,9; 160,9; 153,9; 152,8; 152,3; 152,1; 150,8; 148,5; 139,4; 129,1; 128,6; 128,1; 124,5; 123,4; 121,9; 121,8; 120,9; 119,0; 117,2; 114,8; 108,2; 106,9; 103,9; 92,2; 55,4.

E.M. (FAB $^+$ ):  $m/z = 515,2$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

UV/Vis (EtOH): 269 nm (31950); 301 nm (34140); 318 nm (33585); 333 nm (28570).

### Síntesis de 2-(6-amino-2-indazolil)-4-feniletinil-6-(3-metoxicarbonil-1-indazolil)piridina (105b)



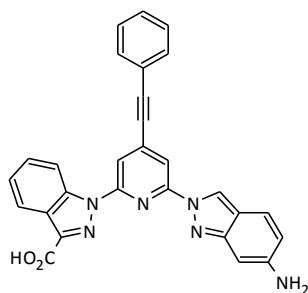
Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 219 a partir de **101b** (0,15 mmol) y el fenilacetileno. Se obtiene **105b** (57 mg, 78%).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,81 (s, 1 H); 8,70 (d, J= 8,5 Hz, 1 H); 8,27 (d, J= 8,1 Hz, 1 H); 8,13 (d, J= 3,0 Hz, 1 H); 7,65-7,60 (m, 2 H); 7,57-7,52 (m, 3 H); 7,45-7,37 (m, 4 H); 6,75 (s, 1 H); 6,61 (dd, J= 1,1 Hz, 8,5 Hz, 1 H); 4,08 (s, 3 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 165,7; 163,7; 153,0; 152,3; 151,2; 137,2; 132,0; 131,7; 130,6; 128,8; 128,6; 126,6; 124,0; 124,0; 122,9; 122,6; 121,5; 121,2; 121,1; 119,4; 118,4; 117,1; 109,6; 97,7; 91,9; 91,2; 53,0.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 485,2 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

### Síntesis de 2-(6-amino-2-indazolil)-6-(3-carboxi-1-indazolil)-4-feniletinilpiridina (106b)



Se sintetiza según el procedimiento general descrito en la pág. 221 a partir de **101b** (0,06 mmol). Se obtiene **106b** (26 mg, 95%).

**<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 9,05 (s, 1 H); 8,86 (d, J= 8,2 Hz, 1 H); 8,31-8,05 (m, 2 H); 7,87-7,73 (m, 4 H); 7,52 (m, 3 H); 6,70-6,66 (m, 1 H); 6,50 (s, 1 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 165,7; 153,2; 153,2; 152,2; 151,2; 139,1; 131,7; 131,5; 131,0; 128,8; 128,6; 126,8; 124,0; 123,3; 122,6; 122,1; 121,5; 121,2; 121,1; 118,7; 118,5; 117,1; 108,8; 97,7; 91,9; 91,2.

**E.M. (FAB<sup>+</sup>):** m/z= 471,1 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

**UV/Vis (EtOH):** 270 nm (22150); 294 nm (21585); 321 nm (29150).

### 7.3. Formación de los complejos

#### Formación de los complejos con Ln(OTf)<sub>3</sub>

La formación de los complejos se realiza mediante la adición de un equivalente de la sal del lantánido y tres del ligando correspondiente (1:3), usando acetonitrilo como disolvente y calentando a reflujo toda la noche. Se toma la cantidad correspondiente para preparar una disolución de concentración  $10^{-5}$ M para realizar las medidas.

#### Formación de los complejos con DO<sub>n</sub>A

Los macrociclos DO<sub>n</sub>A (0,15 mmol) se disuelven en diclorometano (2 mL), se añade ácido trifluoroacético TFA (0,9 mL) y la disolución se agita toda la noche a temperatura ambiente. El disolvente se elimina y el sólido resultante se tritura con éter (4 mL) para finalmente mediante centrifugación aislar el producto.

Cantidades equimolares de LnCl<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O y DO<sub>n</sub>A se disuelven en 2 mL de agua usando calor y ultrasonidos. El pH de la disolución se ajusta gota a gota hasta un valor aproximado de 6 con hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH al 10% en 2-propanol).

Una cantidad equimolar del ligando en 1 mL de agua se añade a la disolución anterior, realizándose un ajuste del pH a un valor de 8 con más cantidad de TBAOH. El disolvente es eliminado y con el sólido obtenido se prepara la correspondiente disolución en concentración  $10^{-5}$ M.

#### Formación de los complejos con EDTA

El tampón Tris se prepara en concentración 50mM ajustado a pH 8 con HCl (1M) y al que se añade 0,1% de Tween-20.

Disolver Ln(III)Cl<sub>3</sub> en agua y añadir EDTA en proporción 1:1 para conseguir una disolución 50 mM Ln(III)-EDTA. Las diluciones se llevan a cabo mediante la adición de tampón Tris.

El ligando objeto de estudio se disuelve en la cantidad apropiada de N,N'-dimetilformamida (DMF) y se diluye con tampón Tris hasta obtener la concentración deseada.

Para preparar las disoluciones de los complejos en los distintos ratios se realizan las mezclas in situ de Ln(III)-EDTA y ligando.

### Formación de complejos mediante el uso de TOPO

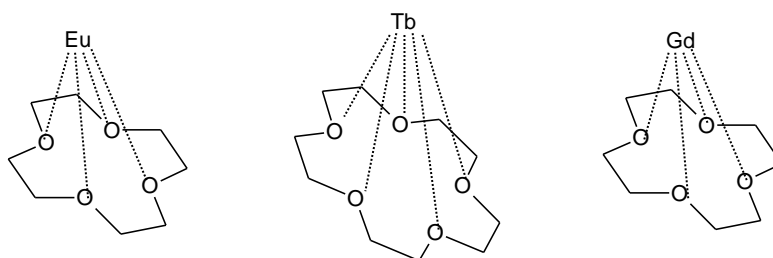
El tampón Acetato sódico se prepara en concentración 0,1 M, realizando el ajuste con ácido acético y clorhídrico para obtener los diferentes pH. Se añaden 2 mL/L de Tritón X-100 como agente surfactante.

Preparación de la disolución del ligando: disolver el ligando en la mínima cantidad de etanol.

Preparación de la disolución de TOPO: disolver el TOPO en etanol para preparar una disolución 0,01 M.

Preparación de la disolución reveladora: mezclar la disolución del ligando y del TOPO en las proporciones necesarias para obtener las distintas concentraciones para llevar a cabo el estudio, completando el volumen necesario con tampón acetato.

### Formación de los complejos con éteres corona



Los compuestos éter corona fueron sintetizados a partir de una mezcla estequiométrica (1:1) del  $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (L= Eu, Tb, Gd) y el éter corona (12-Crown-4, 15-Crown-5). Se disuelven en una mezcla etanol/acetona (1:1) y se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. El sólido resultante se aísla por centrifugación, se lava varias veces con acetona fría y se seca a vacío.

**Análisis Elemental  $[\text{Eu}(12\text{C4})(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_3$  %:** C 20,91, H 3,95, N 0,00 (teórico); C 20,57, H 3,99, N 0,03 (medido).

**Análisis Elemental  $[\text{Tb}(15\text{C5})(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_3$  %:** C 18,54, H 5,91, N 0,00 (teórico); C 18,85, H 4,35, N 0,03 (medido).

**Análisis Elemental  $[\text{Gd}(12\text{C4})(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_3$  %:** C 19,46, H 4,49, N 0,00 (teórico); C 19,42, H 4,08, N 0,03 (medido).

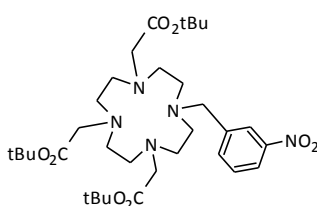
Para preparar todos los complejos se disuelven las coronas sintetizadas en etanol y los ligandos son añadidos a la disolución en una relación estequiométrica (1:1).



La mezcla se agita durante 24 horas a temperatura ambiente. El disolvente es eliminado y el sólido resultante se lava con etanol frío y se seca a vacío.

#### 7.4. Síntesis del quelato portador de iones (ICC)

##### Síntesis del Triacetato 2,2',2''-(10-(3-nitrobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) de tri-tert-butilo (1)



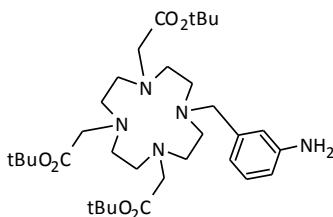
DO3AtBu (0,4 g, 0,78 mmol) y el bromuro de 3-nitrobencilo (0,17 g, 0,78 mmol) se disuelven en acetonitrilo seco (40 mL) y bajo atmósfera de argón. Se añade carbonato potásico anhidro (0,5 g, 3,8 mmol) a la disolución. La reacción se agita a 55<sup>o</sup>C durante 3,5 horas, La mezcla se filtra y el filtrado es evaporado. El residuo se purifica mediante cromatografía en sílice (diclorometano y metanol 5%). Se obtiene **1** (0,37 g, 73 %).

**<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 8,68 (t, J= 2,1 Hz, 1 H); 8,13 (ddd, J= 1,0 Hz, 2,1 Hz, 8,1 Hz, 1 H); 7,76 (dt, J= 1 Hz, 8,1 Hz, 1 H); 7,53 (t, J= 8,1 Hz, 1 H); 3,64-2,18 (m, 24 H); 1,46 (s, 9 H); 1,42 (s, 9 H).

**<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (300 MHz):** 173,6; 172,7; 148,7; 140,0; 137,2; 129,4; 124,8; 122,5; 83,1; 82,5; 59,0; 56,1; 55,8; 51,6; 50,2; 28,1; 27,9.

**E.M. (MALDI<sup>+</sup>):** m/z= 651 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

##### Síntesis del Triacetato 2,2',2''-(10-(3-aminobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) de tri-tert-butilo (2)



Borohidruro sódico (30 mg, 0,80 mmol) se añade en pequeñas porciones a una mezcla del compuesto **1** (0,35 g, 0,53 mmol), Pd/C 10% (35 mg) y metanol seco (10 mL).

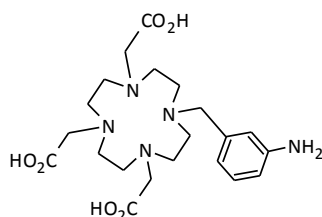
Después de agitar toda la noche a temperatura ambiente, la mezcla se filtra sobre celita, se neutraliza con HCl al 5%, se diluye con diclorometano, se lava con una disolución saturada de bicarbonato sódico y se seca con sulfato sódico. El producto se purifica mediante cromatografía en sílice (diclorometano, metanol 5% y trietilamina 1%). Se obtiene **2** (0,2 g, 62 %).

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 7,05 (t,  $J = 7,8$  Hz, 1 H); 6,83 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1 H); 6,77 (t,  $J = 1,7$  Hz, 1 H); 6,60 (dd,  $J = 1,7$  Hz, 7,8 Hz, 1 H); 3,95-2,21 (m, 24 H); 1,48 (s, 18 H); 1,47 (s, 9 H).

**$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 173,3; 172,4; 147,1; 138,5; 129,6; 118,9; 117,2; 114,1; 82,8; 82,4; 59,8; 56,0; 55,7; 28,0; 27,9.

**E.M.** (MALDI<sup>+</sup>):  $m/z = 621$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

### Síntesis del Ácido 2,2',2''-(10-(3-aminobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) triacético (**3**)



El compuesto **2** (90 mg, 0,15 mmol) se disuelve en ácido trifluoroacético (0,6 mL) y se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de su evaporación, la mezcla se tritura con éter etílico (4 mL) y se centrifuga. El producto **3** (66 mg, 55 %) se usa directamente en la siguiente etapa.

**$^1\text{H-RMN}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 7,66 (s, 1 H); 7,50 (m, 2 H); 7,36 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1 H); 3,87-2,91 (m, 24 H).

**$^{13}\text{C-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (300 MHz):** 166,1; 165,8; 134,1; 133,5; 133,4; 128,0; 120,5; 118,2; 59,5; 58,2; 56,8; 54,4; 53,4.

**E.M.** (MALDI<sup>+</sup>):  $m/z = 453$  ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

### Síntesis del 2,2',2''-(10-(3-Aminobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) triacetato de europio (III) (**4**)

El compuesto **3** (30 mg, 38  $\mu\text{mol}$ ) se disuelve en agua (525  $\mu\text{L}$ ) y el pH se ajusta a 6,5 con carbonato sódico sólido. El  $\text{EuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (20 mg, 55  $\mu\text{mol}$ ) se disuelve en agua (375  $\mu\text{L}$ ) y se añade sobre la disolución anterior, manteniendo el pH 5-7. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 3,5 horas, y el pH se ajusta a 8,5 con NaOH 1M;

entonces, el precipitado se centrifuga, se tritura y se lava varias veces con acetona. Se obtiene **4** (21 mg, 89 %).

**E.M.** (MALDI<sup>+</sup>): m/z= 603 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

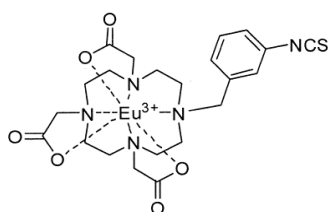
### Síntesis del 2,2',2''-(10-(3-Isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) triacetato de europio (III) (**5**)

Una disolución acuosa (250  $\mu$ L) del compuesto **4** (19 mg, 29  $\mu$ mol), se añade lentamente sobre una mezcla de tiofosgeno (15  $\mu$ L, 197  $\mu$ mol), bicarbonato sódico (24 mg, 286  $\mu$ mol) y cloroformo (250  $\mu$ L). Después de 1,5 horas de agitación, la fase acuosa se lava con cloroformo, el pH se ajusta a 7 con HCl 1M y el producto precipita con acetona. El precipitado **5** se aísla por centrifugación y se lava dos veces con acetona.

**E.M.** (MALDI<sup>+</sup>): m/z= 643 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

## 7.5. Reacciones de conjugación e hibridación

### Anclaje del Quelato Portador de Iones (ICC) al oligonucleótido



5'-GCTAACTHCGTGCCA-3'

Como paso previo a la reacción de anclaje del ICC al oligonucleótido es necesario valorar el contenido en europio de la sonda ICC, para ello se disuelven 2mg del ICC en 50 $\mu$ L de agua esterilizada. Se coge 1 $\mu$ L de la disolución anterior y se añaden 49 $\mu$ L de ácido clorhídrico 5M, Esta nueva disolución se incuba durante 30 minutos a 37<sup>0</sup>C.

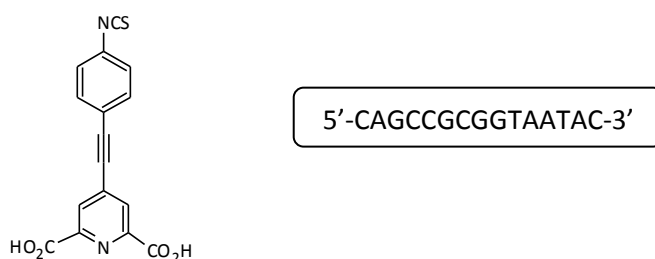
Después de su incubación se hacen diversas diluciones con DES (Delfia Enhancement Solution) para determinar la concentración de Eu en el ICC mediante el estudio de la emisión de fosforescencia usando como estándar Eu (1nM) disuelto en DES.

Una vez determinada su concentración se hace la reacción de anclaje. Para llevar a cabo dicha reacción se incuban a 37<sup>0</sup>C toda la noche el oligonucleótido (5 nmoles) y el ICC (10 nmoles) en tampón carbonato (2,5  $\mu$ L) y agua esterilizada hasta tener un volumen final de 25  $\mu$ L.

La reacción de anclaje se purifica mediante HPLC previa filtración mediante una columna NAP-5 y usando como eluyente tampón de almacenamiento.

Una vez obtenidas las diferentes fracciones se determina el grado de marcaje (relación entre la concentración de oligonucleótido y de Europio). Para ello se calcula la concentración de Europio en el oligonucleótido marcado mediante su espectro de emisión mediante el uso de la disolución certificada de Europio 1 nM, y la concentración de oligonucleótido mediante el espectro de ultravioleta.

### Anclaje del Ligando Antena (AL) al oligonucleótido

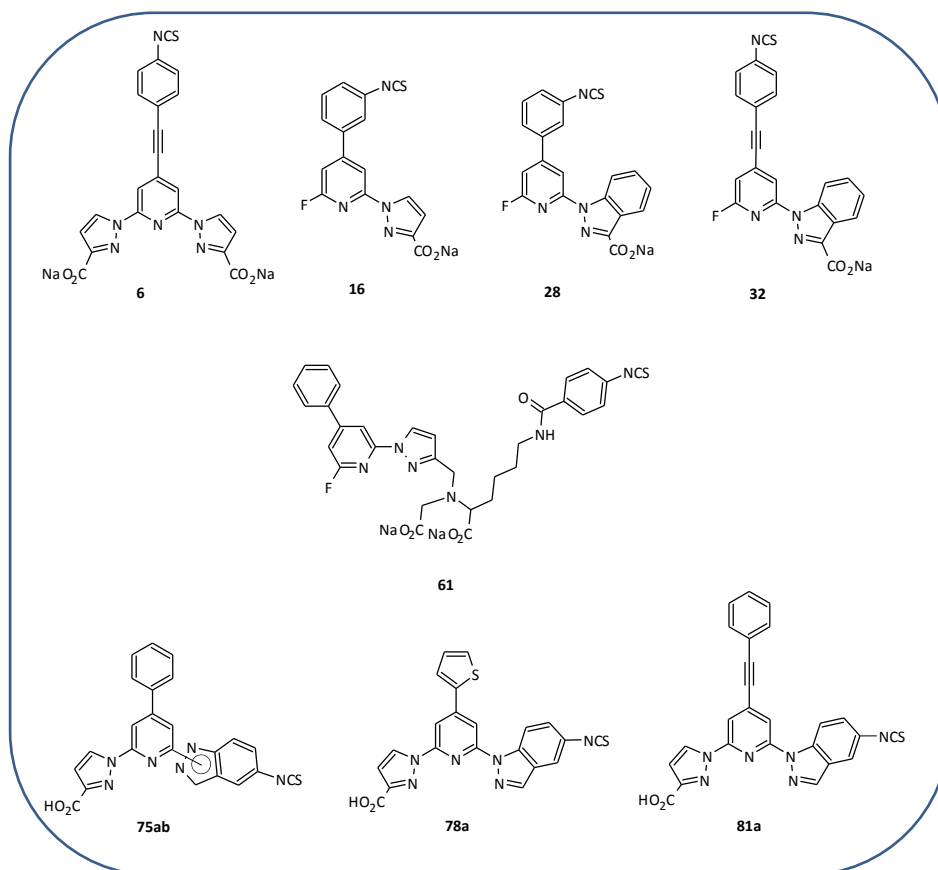


Se disuelven 2,5mg de AL (muestra de referencia usada por nuestros compañeros finlandeses de Turku del proyecto ACUSEP) en 150 $\mu$ L de N,N'-dimetilformamida. Se incuban a 50<sup>0</sup>C toda la noche el ligando antena (500nmol) y el oligonucleótido (5nmoles) en tampón carbonato (2,5 $\mu$ L) y agua esterilizada hasta un volumen final de 25 $\mu$ L.

La reacción de anclaje se purifica mediante HPLC previa filtración mediante una columna NAP-5 usando como eluyente tampón de almacenamiento.

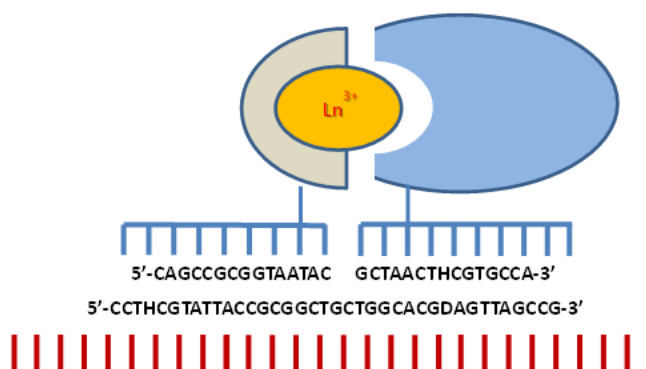
La concentración de producto anclado se determina mediante su espectro de ultravioleta.

Se sigue el mismo procedimiento de anclaje para los siguientes ligandos sintetizados en nuestro grupo:



\*Los ligandos **75ab**, **78a** y **81a** fueron conjugados e hibridados durante la estancia en Turku de Arturo Gamonal (Tesis Doctoral UAM, 2015).

## Ensayo de hibridación



Se prepara la disolución que contiene al AL y al ICC anclados al oligonucleótido. Para ello se pipetea el volumen correspondiente para tener  $0,05\mu\text{M}$  de ICC,  $0,05\mu\text{M}$  de AL (concentración final en la disolución  $0,1\mu\text{L}$  entre el ICC y el AL) y se completa con tampón de hibridación hasta un volumen final de  $400\mu\text{L}$ , que es lo que aparece en la tabla como *disolución de sondas AL e ICC*.

El oligo-target se prepara en diferentes concentraciones 0, 0,2, 2 y 20nM a partir de una disolución 520nM y diluyendo con tampón de hibridación.

Se pipetea en las cubetas las siguientes cantidades (se hacen 2 réplicas de cada reacción):

Cubetas 1-2	Cubetas 3-4	Cubetas 5-6	Cubetas 7-8	Cubetas 9-10
40 $\mu$ L disolución sondas AL e ICC (100 nM)	40 $\mu$ L disolución sondas AL e ICC (100 nM)	40 $\mu$ L disolución sondas AL e ICC (100 nM)	40 $\mu$ L disolución sondas AL e ICC (100 nM)	+ 80 $\mu$ L Tampón
+ 40 $\mu$ L Tampón	+ 40 $\mu$ L de disolución <i>target</i> 0,2 nM	+ 40 $\mu$ L de disolución <i>target</i> 2 nM	+ 40 $\mu$ L de disolución <i>target</i> 20 nM	

Se realizan sus espectros de fosforescencia y se mide la emisión correspondiente al lantánido analizado.

