

Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vilchez
Martín



Diseño y caracterización de compuestos organoboro fluorescentes y sus aplicaciones funcionales

Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:

Zoe Domínguez Hidalgo

Fecha de lectura: 15 de julio de 2020

Bajo la dirección de los doctores:

Uwe Pischel

Jesús F. Arteaga

Huelva, 2020



Universidad de Huelva

Centro de Investigación en Química Sostenible
y Departamento de Química



DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOBORO FLUORESCENTES Y SUS APLICACIONES FUNCIONALES

Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:

Zoe Domínguez Hidalgo

Fecha de lectura: Abril 2020

Directores: Uwe Pischel y Jesús F. Arteaga

Huelva, 2020

Declaración de veracidad

Por la presente, yo, Zoe Domínguez Hidalgo, con documento nacional de identidad 48953931-H, certifico y declaro que los resultados descritos y discutidos en esta Tesis Doctoral son derivados de mi propio trabajo, bajo la supervisión del Dres. Uwe Pischel y Jesús Fernández Arteaga, a excepción de las colaboraciones derivadas en cada proyecto, posteriormente descritas e identificadas.

Fdo:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Zoe Domínguez Hidalgo', written over a rectangular box.

índice

Resumen	i
Agradecimientos	ii
Colaboraciones, Financiación y Agradecimientos	iii
Lista de artículos relacionados con la Tesis Doctoral	iv
Lista de otros artículos publicados durante la Tesis Doctoral	v
Lista de contribuciones a congresos	vi
Índice de Compuestos	vii
Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	ix
Índice de Esquemas	x
Índice de Ecuaciones	xi
Acrónimos, símbolos y anglicismos	xii

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN **55**

1.1. SINOPSIS	55
1.2. ABSORCIÓN Y FLUORESCENCIA. TEORÍA Y EVOLUCIÓN	55
1.3. COLORANTES ORGÁNICOS	61
1.3.1. <i>COLORANTES ORGANOBORO</i>	67
1.4. APLICACIONES PRINCIPALES DE LOS COLORANTES FLUORESCENTES: MICROSCOPIA CONFOCAL Y MICROSCOPIA DE EXCITACIÓN BIFOTÓNICA. UNA VISIÓN GENERAL DE LA BIOIMAGEN	77
1.5. BIBLIOGRAFÍA	84

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS **95**

2.1. OBJETIVOS GENERALES	95
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	96

CAPÍTULO 3. AZABORA[5]HELICENO. COLORANTES ORGANOBORO CON TRANSFERENCIA DE CARGA QUE OFRENCEN UNA EFICIENTE LUZ CIRCULAR POLARIZADA **101**

3.1. SINOPSIS	101
3.2. INTRODUCCIÓN	102
3.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	108
3.4. SÍNTESIS	109
3.5. PROPIEDADES FOTOFÍSICAS	114
3.6. PROPIEDADES QUIRÓPTICAS	118
3.7. CÁLCULOS DE DENSIDAD TEÓRICA FUNCIONAL	123

3.8. CONCLUSIONES	128
3.9. ANEXO EXPERIMENTAL	129
3.10. BIBLIOGRAFÍA	131

CAPÍTULO 4. BAI.

COLORANTES ORGANOBORO CON TRANSFERENCIA DE CARGA QUE MUESTRAN ABSORCIÓN BIFOTÓNICA **141**

4.1. SINOPSIS	141
4.2. INTRODUCCIÓN	143
4.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	144
4.4. SÍNTESIS	146
4.5. PROPIEDADES FOTOFÍSICAS	150
4.6. PROPIEDADES SOLVATOFLUOROCRÓMICAS	156
4.7. PROPIEDADES DE ABSORCIÓN BIFOTÓNICA	160
4.8. CÁLCULOS DE DENSIDAD TEÓRICA FUNCIONAL	164
4.9. CONCLUSIONES	166
4.10. EXPERIMENTOS ADICIONALES	167
4.11. ANEXOS	169
4.12. ANEXO EXPERIMENTAL	176
4.13. BIBLIOGRAFÍA	178

CAPÍTULO 5. BASHY-BODIPY.

COLORANTES ORGANOBORO CON TRANSFERENCIA DE ENERGÍA ALTAMENTE EFICIENTE **185**

5.1. SINOPSIS	185
5.2. INTRODUCCIÓN	186
5.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	189
5.4. SÍNTESIS Y PROPIEDADES FOTOFÍSICAS	191
5.4.1. SÍNTESIS Y PROPIEDADES FOTOFÍSICAS DE BB-3	191
5.4.2. SÍNTESIS Y PROPIEDADES FOTOFÍSICAS DE BC-1	198
5.5. CÁLCULOS DE DENSIDAD TEÓRICA FUNCIONAL PARA BB-3 Y BC-1	201
5.6. USO DEL COLORANTE BB-3 EN BIOIMAGEN	203
5.7. CONCLUSIONES	206
5.8. ANEXO EXPERIMENTAL	207
5.9. BIBLIOGRAFÍA	210

CAPÍTULO 6. Cy-BASHY.

COLORANTES ORGANOBORO CON APLICACIÓN EN BIOIMAGEN **217**

6.1. SINOPSIS	217
6.2. INTRODUCCIÓN	218
6.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	219

6.4. SÍNTESIS Y PROPIEDADES FOTOFÍSICAS	222
6.5. USO DE LOS COLORANTES CY-BASHY EN BIOIMAGEN	230
6.6. CONCLUSIONES	233
6.7. ANEXOS	233
6.8. ANEXO EXPERIMENTAL	238
6.9. BIBLIOGRAFÍA	239
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.	245
<hr/>	
CAPÍTULO 8. ANEXOS.	249
<hr/>	
CURRICULUM VITAE	249
ANEXO A – AZABORA[5]HELICENO	257
ANEXO B – BAI	267
ANEXO C – BASHY-BODIPY	277



Resumen

La presente Memoria de Tesis Doctoral titulada “**Diseño y Caracterización de Colorantes Organoboro Fluorescentes y sus Aplicaciones Funcionales**” está dirigida hacia el diseño, caracterización fotofísica y aplicación de moléculas fluorescentes que contienen boro como elemento principal. Concretamente, esta Memoria abarcará compuestos organoboro como son los ácidos borónicos como bloques de construcción, arilboranos con ligando quelantes quelantes (*N,C*; *N,N*; *N,O*), etc.

Un colorante organoboro incluye esencialmente al menos un átomo de B en su estructura y, además, posee al menos un grupo alquilo y otros dos o tres sustituyentes que pueden contener haluros, grupos hidroxilo o grupos alcoxi.

A lo largo de la historia, los compuestos organoboro han sido muy utilizados debido a sus interesantes propiedades fotofísicas. El creciente interés en los últimos años sobre este tipo de compuestos se debe entre ellas, a la eficacia en el transporte de electrones y sus múltiples aplicaciones como materiales poliméricos luminiscentes, como cromóforos modelo para el estudio de transferencia de electrones y como sensores químicos.

La Memoria consta de una introducción general que englobará una revisión concisa sobre los colorantes orgánicos, incluyendo las principales características, propiedades fotofísicas y aplicaciones más relevantes de estos compuestos. Asimismo, se describen procesos y fenómenos fotofísicos que serán mencionados durante los distintos capítulos posteriores. Seguidamente a esta introducción se exponen los objetivos que se han conseguido durante la realización de esta Tesis Doctoral.

Posteriormente, esta Memoria se divide en cuatro capítulos, tres de los cuales han derivado en artículos ya publicados sobre los resultados obtenidos de cada proyecto, y un cuarto capítulo que se encuentra en proceso de finalizar y derivar en otro manuscrito. Finalmente, el último capítulo resume y concluye todo el trabajo desarrollado durante la Tesis Doctoral.

Todos los proyectos desarrollados aquí tienen un carácter destacadamente multidisciplinar y no hubiera sido posible sin la colaboración de otros grupos de investigación, tanto nacionales (Universidad de Sevilla - Instituto de Investigaciones Químicas y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y, Universidad de Málaga - BIONAND) como internacionales (Universidad de Brescia, Lisboa).

Abstract

The present Doctoral Thesis entitled as “**Design and Characterization of Fluorescent Organoboron Dyes and their Functional Applications**” is focused on the design, photophysical characterization and application of fluorescent molecules containing boron as the main element. Exactly, this Memory will include organoboron compounds such as boronic acids like building blocks, arylboranes with chelates ligands (*N,C*; *N,N*; *N,O*), etc.

An organoboron dye essentially contains at least one atom of B in its structure and, as well, possess at least an alkyl group and another two or three substituents that may contain halides, hydroxyl or alkoxy groups.

Along the history, organoboron compounds have been widely used due to its interesting photophysical properties. In recent years, the growing interest in these compounds is because among them, in how efficient they are at transporting electrons and their many applications as luminescent polymeric materials, chromophores model for the study of the transfer of electrons and chemical sensors.

The Thesis consists of a general introduction that will incorporate a review about the organic dyes, including its main features, photophysical properties and more relevant application of these components. Likewise, it describes proceedings and photophysics phenomena that will be mentioned along the different following chapters. After this introduction it is exposed the objectives that have been acquired during the realization of this Doctoral Thesis.

Afterwards, this Memory is divided in four chapters, three of them have been derived in articles already published about every outcome in each project, and a fourth chapter that is being finished in another articles. Finally, the last chapter summarizes and concludes all the work that has been developed during the Doctoral Thesis.

All the projects developed here have a character notably multidisciplinary and it would have not been possible without the collaboration of other investigation groups, nationals (Universidad de Sevilla - Instituto de Investigaciones Químicas y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y, Universidad de Málaga - BIONAND) and internationals (Universidad de Brescia, Lisboa).



Agradecimientos

....

....



Colaboraciones, Financiación y Agradecimientos

Financiación | Al Ministerio de Economía y Competitividad, por la concesión de la ayuda “BES-2015-074458” llamada “Ayudas para Contratos Predoctorales para la formación de Doctores 2015”, en referencia al proyecto “CTQ2014-54729-C2-1-P”. Con título del proyecto I+D: “Diseño y Caracterización de nuevos fluoróforos conteniendo boro y sus aplicaciones” y como investigador principal al Dr. Uwe Pischel.

Capítulo 3 | A Dr. Rocío López-Rodríguez, Dr. Eleuterio Álvarez y Dr. Abel Ros (Instituto de Investigaciones Químicas y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas), por la síntesis de los compuestos de este capítulo.

A Dr. Sergio Abbate y Dr. Giovanna Longhi (Universidad de Brescia, Italia), por los resultados obtenidos en las propiedades quirópticas de estos compuestos.

Chemistry – A European Journal, **2018**, *24*, 12660-12668.

Capítulo 4

A Dr. Vânia F. Pais, por iniciar este proyecto en nuestro grupo y posteriormente cedérmelo a mi.

A Pablo Vázquez-Domínguez y Dr. Abel Ros, por la síntesis de los compuestos que aparecen en este capítulo (Instituto de Investigaciones Químicas y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

A Dr. Daniel Collado, Dr. Francisco Nájera y Dr. Ezequiel Pérez-Inestrosa, por los resultados obtenidos en las propiedades bifotónicas de estos compuestos (Universidad de Málaga y Centro Andaluz de Nanotecnología y Biotecnología - BIONAND).

The Journal of Organic Chemistry, **2019**, *84*, 13384-13393.

Capítulo 5

A la doctoranda de nuestro grupo María M. Alcaide, por colaborar en las medidas fotofísicas del colorante BASHY-BODIPY.

A Fábio M. F. Santos, Ana I. Matos, Helena F. Florindo y Dr. Pedro M. P. Gois, por la síntesis de los compuestos que aparecen en este capítulo (Universidad de Lisboa).

A Dr. Nuno R. Candeias, por los cálculos teóricos de densidad funcional (DFT) y los teóricos de densidad dependientes del tiempo (TD-DFT).

ChemPhotoChem, **2018**, *2*, 1038-1045.

Capítulo 6

A Fábio M. F. Santos, Sílvia Baldo, Dr. Cátia P. Carvalho, Adelaide Fernandes y Dr. Pedro M. P. Gois, por la síntesis de los compuestos que aparecen en este capítulo (Universidad de Lisboa).

Lista de artículos relacionados con la Tesis Doctoral

- Capítulo 3 | ***Azabona[5]helicene Charge-Transfer Dyes Show Efficient and Spectrally Variable Circularly Polarized Luminescence.***
Z. Domínguez, R. López-Rodríguez, E. Álvarez, S. Abbate, G. Longhi, U. Pischel y A. Ros.
Chemistry – A European Journal, **2018**, *24*, 12660-12668.
- Capítulo 4 | ***π -Extended Four-Coordinated Organoboron N,C-Chelates as Two-Photon Absorbing Chromophores.***
Z. Domínguez, V. F. Pais, D. Collado, P. Vázquez-Domínguez, F. Nájera, E. Pérez-Inestrosa, A. Ros, U. Pischel.
The Journal of Organic Chemistry, **2019**, *84*, 13384-13393.
- Capítulo 5 | ***Highly Efficient Energy Transfer Cassettes by Assembly of Boronic Acid Derived Salicylidenehydrazone Complexes.***
F. M. Santos, Z. Domínguez, M. M. Alcaide, A. I. Matos, H. F. Florindo, N. R. Candeias, P. M. P. Gois, U. Pischel.
ChemPhotoChem, **2018**, *2*, 1038-1045.

Capítulo 6

*Cyanine-like Boronic Acid Derived
Salicylidenehydrazone Complexes (Cy-BASHY) for
Bioimaging Applications.*

Pendiente de publicación.



Lista de otros artículos publicados durante la Tesis Doctoral

- 2015** | ***A supramolecular keypad lock.***
C. P. Carvalho, Z. Domínguez, J. P. Da Silva, U. Pischel.
Chemical Communications, **2015**, *51*, 2698-2701
- 2017** | **Five-Component self-assembly of cucurbituril-based hetero-pseudorotaxanes.**
C. P. Carvalho^a, Z. Domínguez^a, C. Domínguez, H. S. El-Sheshtawy, J. P. Da Silva, J. F. Arteaga, U. Pischel.
Chemistry Open, **2017**, *6*, 288-294
- 2018** | **Precise Supramolecular Control of Surface Coverage Densities on Polymer micro- and nanoparticles.**
S. Zhang, Z. Domínguez, K. I. Assaf, M. Nilam, T. Thiele, U. Pischel, W. M. Nau, A. Henning.
Chemical Science, **2018**, *9*, 8575-8581.

^a Ambas autoras contribuyeron de forma equitativa en este artículo.

Lista de contribuciones a congresos

- 2015**
- VII Mediterranean Organic Chemistry Meeting (REQOMED).**
Málaga, 10-12 junio, 2015.
Comunicación poster: *“A reversibly photoswitchable supramolecular complex”*.
- I Jornadas de doctorandos CyTIA.**
Huelva, 29-30 octubre, 2015.
Comunicación oral: *“Complejos supramoleculares con cucurbiturilos para operaciones lógicas y el auto-ensamblaje de rotaxanos”*.
- 2016**
- XXVI Reunión Bienal de Química Orgánica.**
Punta Umbría (Huelva), 14-17 junio, 2016.
Comunicación póster: *“Molecular Lego: self-assembly of cucurbituril pseudorotaxane”*.
- V Spanish-Portuguese Conference Photochemistry.**
Toledo, 7-10 septiembre, 2016.
Comunicación poster: *“Supramolecular cucurbituril complexes: Logic operations and assemble of pseudorotaxanes”*.

II Jornadas de doctorandos CyTIA.

Huelva, 27-28 octubre, 2016.

Comunicación oral: *“Diseños de nuevos conjugados colorante-poliamina para aplicaciones en bioimagen”*.

2017

I Workshop del Instituto Universitario de Química Básica y Aplicada (INQUBA).

Huelva, 28 noviembre, 2017.

Comunicación póster: *“Molecular Lego: self-assembly of cucurbituril pseudorotaxane”*.

2018

XXVII Reunión Bienal de Química Orgánica.

Santiago de Compostela, 20-22 junio, 2018.

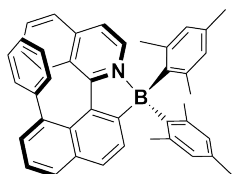
Comunicación póster: *“Circularly Polarized Luminescence of Azabora[5]helicenes”*.

24th IUPAC International Conference on Physical Organic Chemistry (ICPOC24).

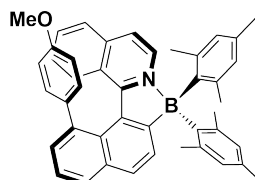
Faro (Portugal), 1-6 julio, 2018.

Comunicación poster: *“Chiroptical Properties of Azabora[5]helicene Architectures”*.

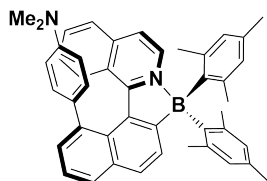
Lista de compuestos



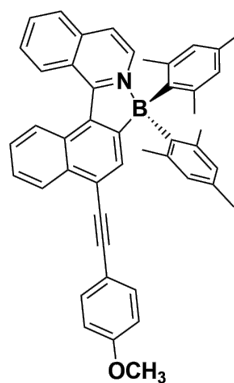
HEL-1 (Capítulo 3)



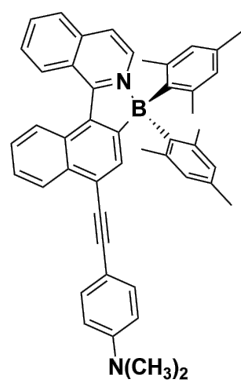
HEL-2 (Capítulo 3)



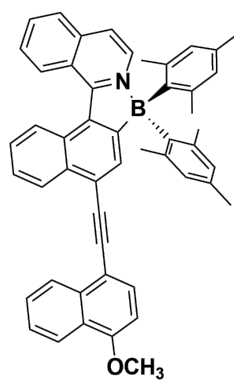
HEL-3 (Capítulo 3)



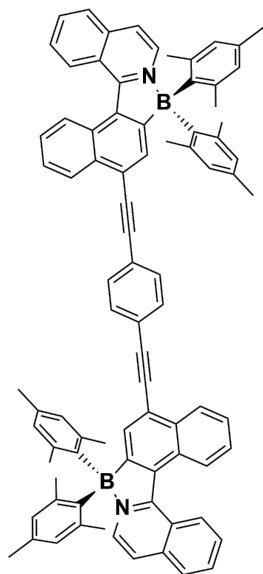
BAI-1 (Capítulo 4)



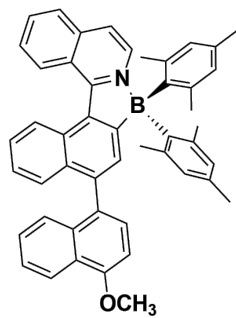
BAI-2 (Capítulo 4)



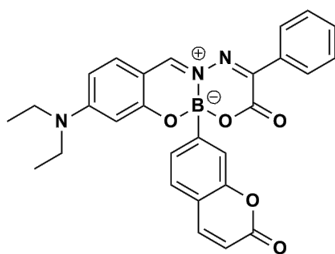
BAI-3 (Capítulo 4)



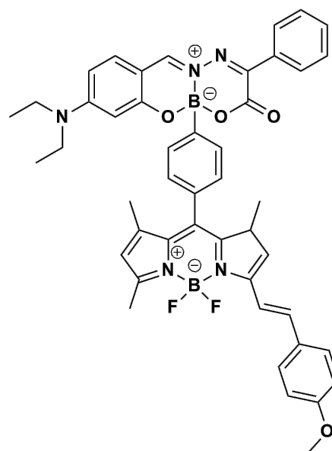
BAI-4 (Capítulo 4)



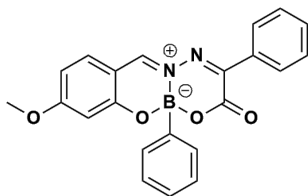
BAI-5 (Capítulo 4)



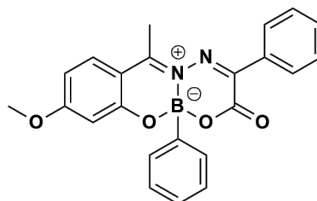
BC-1 (Capítulo 5)



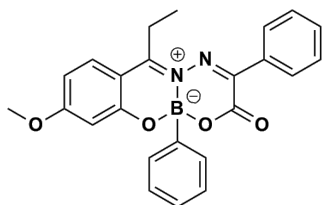
BB-3 (Capítulo 5)



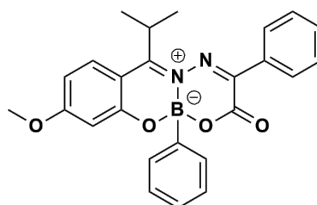
CyB-1 (Capítulo 6)



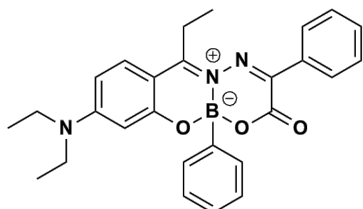
CyB-2 (Capítulo 6)



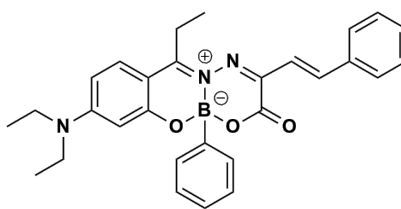
CyB-3 (Capítulo 6)



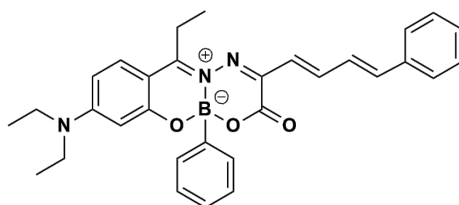
CyB-4 (Capítulo 6)



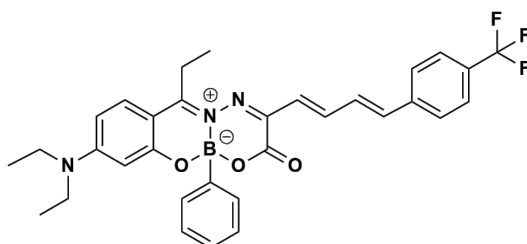
CyB-10 (Capítulo 6)



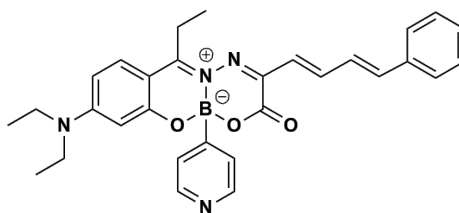
CyB-11 (Capítulo 6)



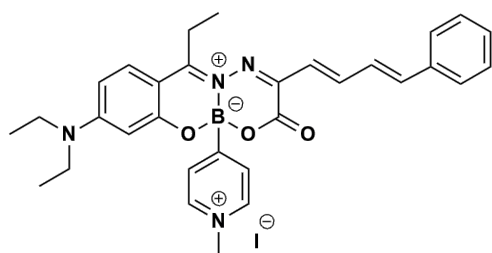
CyB-12 (Capítulo 6)



CyB-13 (Capítulo 6)



CyB-14 (Capítulo 6)



CyB-15 (Capítulo 6)

Índice de Figuras

Figura 1.1	Diagrama de Jablonski donde se muestra la absorción con excitación en los niveles S1 (azul) y S2 (rosa), la emisión de fluorescencia desde el nivel S1 (verde), y la emisión de fosforescencia del nivel T1 (naranja). Las flechas negras discontinuas muestran transiciones no radiativas.	57
Figura 1.2	a) Esquema general en el proceso de FRET. b) Espectro de emisión de la especie donadora (línea azul) y espectro de absorción de la especie aceptora (línea verde). El área coloreada de gris corresponde a la región superpuesta de ambos espectros.	59
Figura 1.3	Esquema general de una FRET (a) y una TBET (b).	60
Figura 1.4	Ejemplo de un colorante organoboro mostrando su color en disolución (tolueno), estructura y espectros de absorción y emisión.	62
Figura 1.5	Espectros de emisión de varios colorantes. Imagen extraída de Leica Microsystems.	63
Figura 1.6	Estructuras de las principales familias de colorantes y algunos ejemplos.	65
Figura 1.7	Ilustración de las interacciones de los orbitales moleculares del átomo de B con sustituyentes π y nucleófilos.	69
Figura 1.8	Grupos voluminosos utilizados para proteger estéricamente a compuestos que contengan átomos de B.	69
Figura 1.9	Reactividad en función de la posición en el esqueleto de la estructura principal del BODIPY.	72

Figura 1.10	Algunos ejemplos de colorantes BODIPY y algunas de sus características espectrales.	73
Figura 1.11	Evolución de las estructuras de a) BODIPY. b) Fluoróforos con boro. c) Complejación de ácidos borónicos (BAs) con ligandos bi- y tridentados. d) Diseño de colorantes fluorescentes con ligandos de base de Schiff y BAs. Imagen adaptada de ref.72.	75
Figura 1.12	Algunos ejemplos de BASHY publicados en nuestro grupo de investigación.	76
Figura 1.13	Algunos ejemplos de BAI publicados en nuestro grupo de investigación.	77
Figura 1.14	Diagrama de Jablonski para la excitación por un solo fotón (izquierda) y por dos fotones (derecha).	81
Figura 1.15	Estructuras moleculares para el diseño de fluoróforos con <i>cross sections</i> de TPA importantes. (a) Estructuras dipolares asimétricas, (b) estructuras cuadrupolares simétricas y (c) estructuras octopolares.	83
Figura 2.1	Estructuras organoboro diseñadas en esta memoria.	97
Figura 3.1	Representación de las estructuras helicénicas.	102
Figura 3.2	Dos formas enantiómeras del [6]heliceno.	105
Figura 3.3	Algunos helicenos sintetizados antes de 1950.	106
Figura 3.4	Estructuras tipo azabora[n]helicenos publicadas anteriormente a las presentadas en este capítulo.	107
Figura 3.5	Estructuras de los derivados azabora[5]heliceno en su forma enantiomérica <i>M</i> .	109
Figura 3.6	Estructura cristalina del heliceno a ₅ -HEL-1.c.	111
Figura 3.7	Estructura cristalina del heliceno (±)-HEL-2.	113
Figura 3.8	Espectros de absorción UV/vis (color negro) y de fluorescencia (color rojo) de los helicenos HEL-1, HEL-2 y HEL-3 en tolueno (a) y en acetonitrilo (b).	117

Figura 3.9	Espectros de dicroísmo circular (ECD) de los helicenos estudiados en tolueno: HEL-1 (izquierda), HEL-2 (medio) y HEL-3 (derecha). El enantiómero <i>M</i> corresponde al espectro de color negro y el <i>P</i> al de color rojo.	120
Figura 3.10	Espectros de luminiscencia circularmente polarizada (CPL) de los helicenos estudiados en tolueno: HEL-1 (izquierda), HEL-2 (centro) y HEL-3 (derecha). El enantiómero <i>M</i> corresponde al espectro de color negro y el <i>P</i> al de color rojo. Los espectros están normalizados para que el valor ΔI del máximo de emisión refleje directamente el valor $ g_{abs} $.	121
Figura 3.11	Gráfico de g_{abs} frente g_{lum} de [4] y [5]helicenos (puntos en blanco) y, además, de los helicenos HEL-1 , HEL-2 y HEL-3 (puntos rojos). La recta de regresión corresponde a sólo los datos de la bibliografía.	122
Figura 3.12	Confórmeros obtenidos para el <i>M</i> - HEL-1 .	123
Figura 3.13	Confórmeros obtenidos para el HEL-2 y HEL-3 .	124
Figura 3.14	Contorno de los orbitales frontera, HOMO (abajo) y LUMO (arriba) de los helicenos en su forma enantiomérica <i>M</i> .	126
Figura 4.1	Representación de la estructura principal de los colorantes, donde X será los distintos sustituyentes.	142
Figura 4.2	Estructuras de los derivados utilizados en este estudio.	146
Figura 4.3	Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del BAI-1 al BAI-5 , en los disolventes <i>n</i> -hexano (arriba) y acetonitrilo (abajo).	152
Figura 4.4	Espectros de emisión de fluorescencia del colorante BAI-2 en diferentes disolventes (desde abajo hacia arriba): <i>n</i> -hexano, tolueno, EtOAc, THF, acetona, acetonitrilo, DMSO. Los espectros están normalizados	154

	a una intensidad de 1 al máximo de su longitud de onda de emisión.	
Figura 4.5	Diagrama de Lippert-Mataga para los colorantes estudiados, BAI-1 (negro), BAI-2 (rojo), BAI-3 (rosa), BAI-4 (verde) y BAI-5 (azul).	158
Figura 4.6	Diagrama en 3D del máximo de emisión de BAI-2 en diferentes disolventes (ver Tabla 4.2) frente a los parámetros de Kamlet-Taft, β y π^* (puntos rojos). Los puntos grises corresponden al diagrama 2D para cada parámetro individual del disolvente. Los parámetros de Kamlet-Taft están sacados de la ref. 23.	159
Figura 4.7	Colorantes BAI anteriormente estudiados y publicados.	160
Figura 4.8	Espectro de absorción bifotónica de los colorantes BAI-1 (negro), BAI-2 (rojo), BAI-3 (gris), BAI-4 (verde) y BAI-5 (azul) en tolueno.	161
Figura 4.9	Orbitales NTO (abajo: hueco, arriba: electrón) de BAI-1 (izquierda), BAI-2 (centro) y BAI-4 (derecha). El peso NTO para la transición correspondiente $S_1 \leftarrow S_0$ son 91 %, 93 % y 72 % para BAI-1 , BAI-2 y BAI-4 , respectivamente.	164
Figura 4.10	Espectros de emisión de fluorescencia en estado sólido de los colorantes BAI-1 – BAI-5 , excitando a 425 nm.	168
Figura 4.11	Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del BAI-1 al BAI-5 , en el disolvente DMSO.	173
Figura 4.12	Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del BAI-1 al BAI-5 , en el disolvente acetonitrilo.	173
Figura 4.13	Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del BAI-1 al BAI-5 , en el disolvente acetona.	174

Figura 4.14	Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del BAI-1 al BAI-5 , en el disolvente THF.	174
Figura 4.15	Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del BAI-1 al BAI-5 , en el disolvente acetato de etilo.	175
Figura 4.16	Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del BAI-1 al BAI-5 , en el disolvente tolueno.	175
Figura 4.17	Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del BAI-1 al BAI-5 , en el disolvente <i>n</i> -hexano.	176
Figura 5.1	Representación de la estructura general del colorante BASHY.	186
Figura 5.2	Comparación a) síntesis clásica y b) síntesis multicomponentes.	187
Figura 5.3	Representación de la diversidad estructural de los colorantes BASHY. Imagen adaptada ref. 19.	189
Figura 5.4	Estructuras de estudio: tipo BASHY-Cumarina (BC-1) y tipo BASHY-BODIPY (BB-3). Los colores muestran las partes cromofóricas: BASHY (verde), Cumarina (azul) y BODIPY (rojo).	190
Figura 5.5	Espectros de absorción UV/vis (líneas continuas) y emisión de fluorescencia (línea discontinua) de colorante BODIPY (rojo) y BASHY (negro) en tolueno.	194
Figura 5.6	Espectros de absorción UV/vis (línea continua negra), emisión de fluorescencia (línea discontinua roja, excitando a 473 nm) de BB-3 y excitación (línea azul), monitorizando la emisión de BODIPY (a 615 nm).	194
Figura 5.7	Ilustración de la idea del montaje estructural de un ETC con BB-3 .	195

Figura 5.8	Diagrama de contorno de los principales orbitales frontera involucrados en las dos primeras transiciones electrónicas en el colorante BB-3 .	197
Figura 5.9	Ilustración de la idea del montaje estructural de un ETC con BC-1 .	199
Figura 5.10	Espectros de absorción UV/vis (línea continua negra) y emisión de fluorescencia excitando a 320 nm (línea discontinua roja) y a 470 nm (línea discontinua negra) del colorante BC-1 en cloroformo.	200
Figura 5.11	Internalización del colorante libre BB-3 y las nanopartículas cargadas por BMDC (JAW SII, ATCC®CRL-11904™) después de 1, 3 y 18 horas de incubación, expresado en a) porcentajes y b) intensidad media de fluorescencia (MFI) de células positivas en la población clasificadas por citometría de flujo.	204
Figura 5.12	Imágenes de la microscopía confocal obtenida después de la incubación de BMDC (JAW SII, ATCC®CRL-11904™) con las nanopartículas cargadas durante 2, 4 y 10 horas.	206
Figura 6.1	Representación de la estructura general del colorante Cy-BASHY.	218
Figura 6.2	Estructuras de los colorantes Cy-BASHY de este estudio.	221
Figura 6.3	Estructura modelo de Cy-BASHY (CyB) usada para el estudio hidrolítico.	222
Figura 6.4	Espectros de absorción UV/vis (línea discontinua) y de fluorescencia (línea continua) de los colorantes CyB-10 (azul), CyB-11 (verde), CyB-12 (amarillo) y CyB-13 (rojo).	228
Figura 6.5	Espectros de emisión de fluorescencia de CyB-13 en <i>n</i> -hexano (línea de color negra), tolueno (rojo), THF (verde), acetona (azul), acetonitrilo (rosa) y DMSO (naranja).	229

Figura 6.6

a) Imágenes representativas de cortes teñidos con colorantes Cy-BASHY (rojo) y DAPI (azul) muestran una localización celular más intensa del colorante **CyB-15**.
b) Imágenes representativas de cortes teñidos con colorantes Cy-BASHY (rojo) e inmunotinción para GFAP (verde) muestra una mayor ubicación conjunta del colorante **CyB-12** con astrocitos. c) Las barras gráficas representan el área de co-localización de los tintes Cy-BASHY con tinción GFAP.

Índice de Tablas

Tabla 3.1	Propiedades fotofísicas de los derivados HEL-1 , HEL-2 y HEL-3 en diferentes medios, como tolueno y acetonitrilo.	115
Tabla 3.2	Calculos TD-DFT de las energías de absorción y emisión (ΔE), fuerza dipolar (D), fuerza rotacional (R) y ángulo formado por electricidad (E) y momentos de transición magnética (M) de los principales conformeros en el estado fundamental y en el primer estado singlete excitado.	127
Tabla 4.1	Propiedades fotofísicas de los derivados BAI-1 al BAI-5 en diferentes medios, como <i>n</i> -hexano y acetonitrilo.	150
Tabla 4.2	Propiedades fotofísicas del colorante BAI-2 en diferentes disolventes.	156
Tabla 4.3	Propiedades de absorción bifotónicas de los colorantes BAI-1 – 5 .	163
Tabla 4.4	Propiedades fotofísicas del colorante BAI-1 en diferentes disolventes.	169
Tabla 4.5	Propiedades fotofísicas del colorante BAI-3 en diferentes disolventes.	170
Tabla 4.6	Propiedades fotofísicas del colorante BAI-4 en diferentes disolventes.	171
Tabla 4.7	Propiedades fotofísicas del colorante BAI-5 en diferentes disolventes.	172
Tabla 5.1	Propiedades fotofísicas de los colorantes bicromóforicos BC-1 y BB-3 , además de sus partes cromofóricas individuales.	193

Tabla 6.1	Estabilidad hidrolítica y fotoestabilidad de los colorantes estudiados CyB-10 – 13 .	226
Tabla 6.2	Propiedades fotofísicas de los colorantes CyB-10 – 15 en el disolvente polar DMSO.	227
Tabla 6.3	Propiedades fotofísicas de los colorantes CyB-10 – 15 en el disolvente polar acetonitrilo.	234
Tabla 6.4	Propiedades fotofísicas de los colorantes CyB-10 – 15 en el disolvente polar acetona.	235
Tabla 6.5	Propiedades fotofísicas de los colorantes CyB-10 – 15 en el disolvente polar THF.	236
Tabla 6.6	Propiedades fotofísicas de los colorantes CyB-10 – 15 en el disolvente polar tolueno.	237



Índice de Esquemas

Esquema 1.1	Ruta sintética propuesta por A. Treibs y F. H. Kreuzer con el resultado inesperado del primer BODIPY.	71
Esquema 3.1	Síntesis de arilisoquinolinas HEL-1.b , 2.b y 3.b .	110
Esquema 3.2	Preparación de las formas enantiopuras <i>M</i> y <i>P</i> del azabora[5]heliceno HEL-1 .	111
Esquema 3.3	Preparación de las formas enantiopuras <i>M</i> y <i>P</i> del azabora[5]heliceno HEL-2 y HEL-3 .	113
Esquema 4.1	Reacciones generales de acoplamiento de Sonogashira (a) y Suzuki-Miyaura (b).	147
Esquema 4.2	Síntesis de los compuestos BAI-1 – BAI-5 .	149
Esquema 5.1	Síntesis del compuesto BB-3 .	191
Esquema 5.2	Síntesis del compuesto BC-1 .	198
Esquema 6.1	Síntesis de los compuestos CyB-1 y CyB-2 .	223
Esquema 6.2	Síntesis de los compuestos CyB-3 y CyB-4 .	224
Esquema 6.3	Síntesis de los compuestos CyB-10 – 15 .	225

Índice de Ecuaciones

Ecuación 3.1	Fórmula para el cálculo del factor g de disimetría	119
Ecuación 4.1	Fórmulas para la aplicación gráfica de Lippert-Mataga	157

Acrónimos, símbolos y anglicismos

\AA	amstrong	λ_{exc}	longitud de onda de excitación
$\Delta\nu$	desplazamiento de Stokes	λ_{TPE}	longitud de onda de excitación bifotónica
Δf	parámetro de polaridad Lippert-Mataga	λ_{OPE}	longitud de onda de excitación por un solo fotón
ε	coeficiente de absorción molar	μ_e	momento dipolar en el estado emisor
ε	Índice de refracción	μ_g	momento dipolar en el estado fundamental
ε_0	permitividad en el vacío	μM	micromolar
Φ_{ET}	rendimiento de transferencia de energía	μm	micrómetro
Φ_{fluo}	rendimiento cuántico de fluorescencia	ν_{abs}	frecuencia de absorción
\hbar	constante de Planck	ν_{em}	frecuencia de emisión
$\lambda_{\text{abs,max}}$	longitud de onda de absorción máxima	σ_{2p}	sección transversal de dos fotones
$\lambda_{\text{fluo,max}}$	longitud de onda de fluorescencia máxima	τ	tiempo de vida de fluorescencia
		α	radio Onsager

A-π-A	aceptor-espaciador- aceptor	Bpin	bis(pinacolato)diboro
ADN	ácido desoxirribonucleico	c	velocidad de la luz en el vacío
ANS	ácido 1-amino-2- naftol-4-sulfónico	CD	dicroísmo circular
b	constante usada en la ecuación de Lippert- Mataga	cm	centímetro
BA	ácido borónico	CPL	luminiscencia circular polarizada
BAI	arilisoquinolina boriladas	cross- section	sección transversal de dos fotones
BAI-D	derivados de arilisoquinolinas boriladas	CSIC - IIQ	Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Instituto de Investigaciones Químicas
BASHY	ácido borónico con ligandos de salicilidenhidrazona	Cy	familia de cianinas
BB-D	derivado de BASHY- BODIPY	CyB-D	derivados de Cy- BASHY
BC-D	derivados de BASHY- Cumarina	D-π-A	donador-espaciador- aceptor
BODIPY	borodipirrometeno o 4,4-difluoro-4-boro- 3a,4a-diaza-s- indaceno	D-π-D	donador-espaciador- donador
		DAPI	4',6-diamidino-2- fenilindol
		DiFMU	6,8-difluoro-7- hidroxi-4- metilcumarina

DMAP	dimetilaminopiridina		energía de resonancia de fluorescencia
DMSO	dimetilsulfóxido		
ECD	dicroísmo electrónico circular	g_{abs}	factor de disimetría de absorbancia
EDG	grupo donador de electrones	g_{lum}	factor de disimetría de luminiscencia
energy-gap law	ley de salto energético	GFAP	proteína fibrilar ácida de la glía
EET	<i>Excitation Energy Transfer</i> o Transferencia de energía de excitación	GM	unidad de Göeppert-Mayer
er	relación enantiomérica	HEL-D	derivados de helicenos
Et	etil	HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> Orbital molecular ocupado de más energía
et al.	en latín: "y otros"	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> o Cromatografía líquida de alta resolución
Et₃N	trietilamina	HPTS	piranina o Sodio 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfonato
ETC	casete de transferencia de energía	I_f	intensidad de fluorescencia
EtOAc	acetato de etilo		
FITC	isotiocianato de fluoresceína		
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i> o Transferencia de		

ICT	transferencia interna de carga	MCR	reacción multicomponente
in vivo	en latín: "dentro de lo vivo"	Me	metil
iPr	isopropil	MeO	grupo metoxi
J	parámetro de superposición espectral	Mes	2,4,6-trimetilfenil
K	kelvin	Mes*	2,4,6-tritertbutilfenil
k_{nr}	constante de velocidad desactivación no radiante	MFI	intensidad media de fluorescencia
k_r	constante de velocidad desactivación radiante	n	índice de refracción
LDE	electroforesis láser Doppler	n	constante dieléctrica usada en la ecuación Lippert-Mataga
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> o Orbital molecular desocupado de más baja energía	-N=C=S	grupo isotiocianato
M	molar	NEt₂	grupo dietilamino
M	nomenclatura <i>minus</i> en helicenos	NIR	infrarrojo cercano
		nm	nanómetro
		NMe₂	grupo dimetilamino
		ns	nanosegundo
		NTO	orbital de transición natural
		OCSC	cultivos organotípicos de rodajas de cerebelo
		OCT	transportador de catión orgánico

OLED	diodos orgánicos emisores de luz	PCM	modelo de polarización continua
one-pot	mecanismo de un solo paso	PDI	perilendicarboxidiimi- das
OPE	excitación por un fotón	Pdl	índice de polidispersidad
OR	rotación óptica	PI	yoduro propidio
ORC	<i>Optical Refurbishment Center</i> o Centro de reacondicionamiento óptico	PLGA/PVA	nanopartículas de un copolímetro de ácido poliláctico y ácido poliglicólico con polivinilalcohol
ORTEP	<i>Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot</i>	push-pull	efecto inductivo entre D- π -A
P	nomenclatura <i>plus</i> en helicenos	quenching	desactivación de la fluorescencia
PAHs	hidrocarburos policíclicos aromáticos	R₀	radio crítico
PALS	dispersión de luz para análisis de fase	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
para / p-	posición 1 y 4 en un fenilo	S₀	estado basal
PBS	solución salina tamponada con fosfato	S₁, S₂	niveles de vibración de un estado singlete excitado
		S_EAr	Sustitución Electrofílica Aromática

S_NAr	Sustitución Nucleofílica Aromática	umpolung	inversión de la polaridad
SOM	moléculas orgánicas simples	UV/vis	ultravioleta visible
SP-HEL-D	derivados de espiropiranos con resto helicénico		
TBET	<i>Through-Bond Energy Transfer</i> o transferencia de energía a través de enlaces		
TD-DFT	cálculos de densidad teórica funcional de fuerza de rotación		
Tf₂O	anhídrido de trifluorometanosulfó- nico		
THF	tetrahidrofurano		
Tip	2,4,6-triisopropilfenil		
TPA	absorción bifotónica		
TPE	excitación por dos fotones		
TPM	microscopía de fluorescencia de dos fotones		



1

INTRODUCCIÓN

1

Introducción

1.1. SINOPSIS

Desde los inicios del universo en los procesos químicos siempre han intervenido moléculas y átomos. Sin embargo, muchos de estos procesos son imperceptibles y como consecuencia no se consigue llegar a entenderlos en su totalidad. Por ello, en lo que concierne a esta Tesis Doctoral, se busca diseñar moléculas o sistemas moleculares y supramoleculares con la característica principal de ser capaces de generar cambios observables y medibles. Se puede señalar a la fluorescencia como uno de estos cambios observables capaz de proporcionar información suficiente sobre procesos químicos.

En este capítulo se muestran los principales grupos de moléculas con actividad fluorescente, llamados colorantes. En concreto nos centraremos en compuestos con estructuras de tipo organoboro. Además se mencionan las posibles aplicaciones de estos nuevos fluoróforos como su uso en el campo de la bioimagen, en la optoelectrónica, o incluso apelando a sus propiedades bifotónicas.

1.2. ABSORCIÓN Y FLUORESCENCIA. TEORÍA Y EVOLUCIÓN

En el siglo XIX se describió el vocablo «luminiscencia» como cualquier fenómeno de luz. No obstante, en términos actuales, la luminiscencia se puede describir como la liberación de fotones a partir de un estado electrónico excitado¹. Los diferentes tipos de luminiscencia están clasificados de acuerdo al modo de excitación. Consecuentemente, y en este mismo contexto, el término

INTRODUCCIÓN

«fluorescencia» podría especificarse más como concepto de fotoluminiscencia, añadiendo que este fenómeno de liberación de fotones en los que se obtiene el estado electrónico excitado es consecuencia de una excitación por luz^{1,2}.

La primera descripción sobre este fenómeno de fluorescencia se le atribuye a N. Monardes, un médico y botánico andaluz que observó la aparición de un particular color azul en una infusión medicinal conocida como *Lignum Nephriticum*³. Proveniente de dos especies de árboles, el compuesto químico responsable de esta fluorescencia es la matlalina, que es el producto de oxidación de uno de los flavonoides que se encuentran en estas cortezas⁴. Más tarde, a mediados del siglo XIX, E. D. Clarke⁵ y R. J. Haüy⁶ describieron la fluorescencia en las fluoritas, D. Brewster comentó el fenómeno en la clorofila⁷ y, posteriormente, J. Herschel hizo lo mismo con la quinina⁸. Poco después, G. G. Stokes profundizó en el estudio de soluciones de sulfato de quinina y publica una serie de observaciones sobre este fenómeno, proponiendo por primera vez el uso del término «**fluorescencia**»^{1,2,9}.

A principio de la década de 1930, A. Jablonski publicó un artículo científico en *Nature*¹⁰ proponiendo un diagrama de niveles de energía que posteriormente evolucionó a los «Diagramas de Jablonski», como se conoce hoy en día. Según el modelo que se muestra en la Figura 1.1 con la absorción de un fotón la especie fluorescente cambia de un estado singlete no excitado (llamado estado fundamental S_0) a uno de los niveles de vibración de un estado singlete excitado (S_1 , S_2). La molécula excitada puede ceder parte de su energía en forma de vibraciones (desactivación no radiante) o incluso chocando con otras moléculas cediendo así la energía de excitación en forma de calor. Asimismo puede ceder su energía de golpe, cayendo a un nivel inferior y emitiendo gran parte de la energía en forma de un único cuanto de luz (emisión fluorescente). En cuanto a la fosforescencia, puede suceder que antes de que se produzca la transición radiante tenga lugar un cruce entre sistemas que lleva a las especies químicas a

un estado triplete. Mientras que el proceso de la fluorescencia ocurre en el orden de 10^{-15} segundos, la fosforescencia está en el orden de 10^{-3} segundos^{1,2}. La relajación de un estado tipo S_1 puede presentarse a través de una interacción con una segunda molécula, ocurriendo una desactivación de la fluorescencia o *quenching* fluorescente. En este caso, la molécula excitada cede su energía a otra.

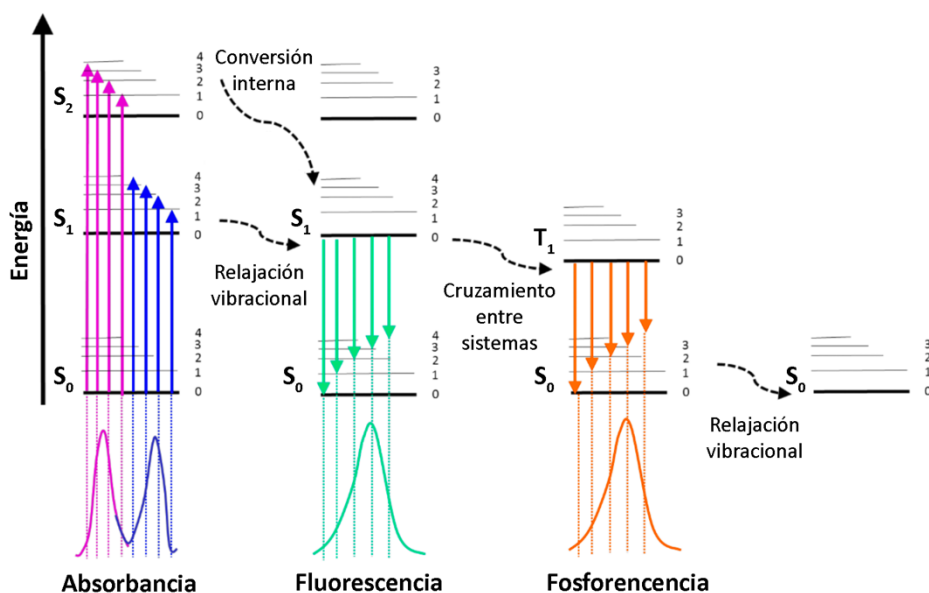


Figura 1.1. Diagrama de Jablonski donde se muestra la absorción con excitación en los niveles S_1 (azul) y S_2 (rosa), la emisión de fluorescencia desde el nivel S_1 (verde), y la emisión de fosforescencia del nivel T_1 (naranja). Las flechas negras discontinuas muestran transiciones no radiantes¹⁰.

Gracias a sus estudios pioneros y en honor a Stokes, la diferencia entre la longitud de onda de absorción máxima ($\lambda_{abs,max}$) y la longitud de onda de fluorescencia máxima ($\lambda_{fluo,max}$) es conocida como «desplazamiento de Stokes» ($\Delta\nu$)^{1,2}. No todos los fotones absorbidos producen una emisión de fluorescencia puesto que las transiciones no radiantes compiten con las transiciones radiantes. Por lo que la relación de fotones emitidos y fotones absorbidos se conoce como rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_{fluo}), que al igual que el

INTRODUCCIÓN

coeficiente de absorción molar (ϵ) determina el «brillo» de un fluoróforo ($\epsilon \times \Phi_{\text{fluo}}$). Otra de las propiedades importantes a conocer es la vida útil o el tiempo de vida de fluorescencia (τ) que se trata del tiempo promedio que la especie fluorescente permanece en el estado excitado antes de la transición radiante. El tiempo de vida es independiente de la concentración y de la intensidad de emisión de las especies fluorescentes², siendo una forma efectiva de evitar la necesidad de mediciones cuantitativas de la intensidad de fluorescencia.

Aunque Stokes propusiera que la fluorescencia era una herramienta analítica importante, no fue hasta 1867 cuando F. Goppelsröder publicó el primer análisis fluorimétrico de la historia¹¹, lo que marcaría un comienzo para esta rama de la Ciencia.

Como se verá a lo largo de la presente memoria, la naturaleza del disolvente puede tener diversos efectos sobre la emisión de un fluoróforo, conociéndose este fenómeno como solvatofluorocromismo. Esto puede suceder por la relajación inducida que produce el disolvente: una reorganización de las moléculas del disolvente conduciría a la estabilización del estado excitado y, por tanto, una disminución de la energía del sistema^{1,2}.

Otro de los fenómenos que se encontrará en esta memoria, y que conduce a aplicaciones analíticas interesantes, es la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (sus siglas en inglés FRET, *Förster Resonance Energy Transfer*)². Este fenómeno ocurre entre una especie donadora con estado excitado que, por interacción dipolar, excita a otra especie aceptora, que da como resultado una emisión de fluorescencia de esta última especie¹². Para que este proceso tenga lugar es necesario una superposición entre el espectro de emisión de la especie donadora y el espectro de absorción de la especie aceptora. Asimismo es importante medir la separación física entre las dos especies puesto que el fenómeno ocurre a muy corta distancia, en torno a 10–100 Å, lo cual hace que sea una herramienta común y necesaria. En la Figura 1.2 se muestra una

representación gráfica para ilustrar el fenómeno de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Se puede ver el espectro de absorbancia y fluorescencia de una especie donadora y otra aceptora, respectivamente. Como se podrá comprobar tanto el espectro de absorción de la especie aceptora (línea verde) como el espectro de emisión de la especie donadora (línea azul) se superponen (área coloreada de gris), por tanto, en este par se espera que se produzca una FRET.

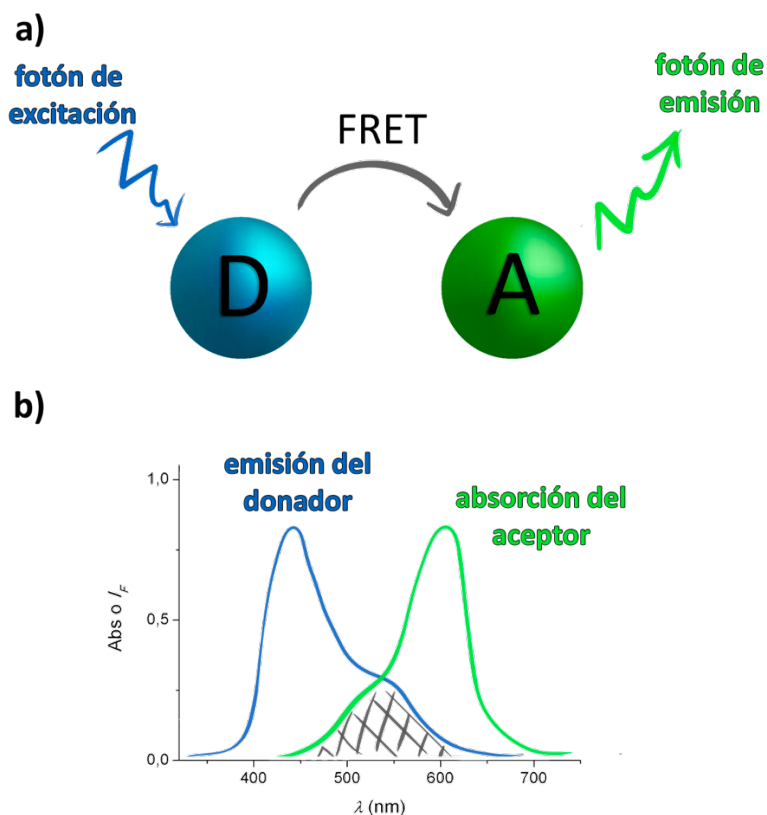


Figura 1.2. a) Esquema general en el proceso de FRET. b) Espectro de emisión de la especie donadora (línea azul) y espectro de absorción de la especie aceptora (línea verde). El área coloreada de gris corresponde a la región superpuesta de ambos espectros.

Además de este fenómeno FRET que puede ocurrir sin que exista ningún enlace entre el par, o a través de un enlace simple, la transferencia de energía también puede transcurrir a través de enlaces conjugados en los que un grupo donador

INTRODUCCIÓN

transfiere energía al grupo aceptor mediante una conexión de sistema π conjugado. Aunque pueda representar un proceso de transferencia de energía similar a la FRET, la transferencia de energía a través de enlaces (sus siglas TBET, *Through-Bond Energy Transfer*) no está limitado por el requisito de que el espectro de emisión del donador se solape con el espectro de absorción del aceptor. De hecho, la TBET es mucho más rápida que la FRET, por lo que, en sistemas diseñados adecuadamente, la TBET puede ser más eficiente y convertirse en predominante⁸⁸.

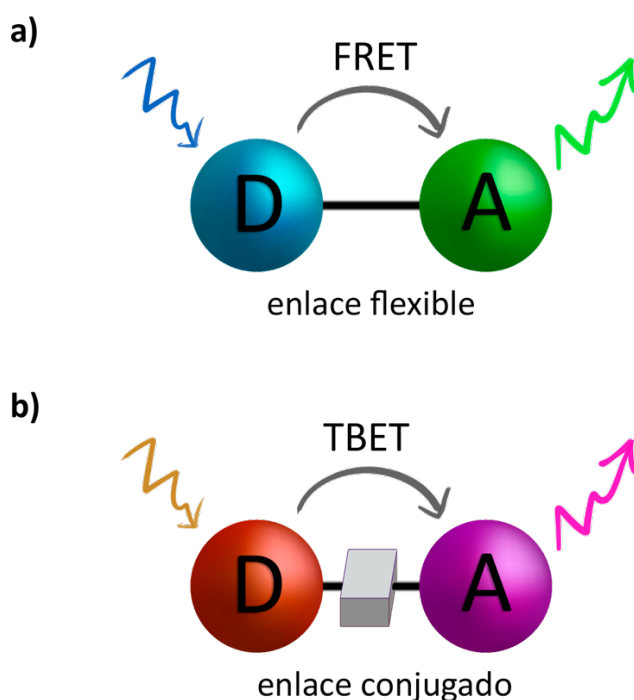


Figura 1.3. Esquema general de una FRET (a) y una TBET (b).

Tanto la FRET como la TBET son los dos principales mecanismos de transferencia de energía y por ello es necesario su distinción de manera experimental. Una forma rápida de hacerlo es midiendo la cinética de transferencia de energía mediante estudios de espectroscopía ultrarrápida. Otra forma de caracterizarlas es cambiando la orientación de los grupos donadores y aceptores, observando

si existe un cambio en la eficiencia de la transferencia de energía^{89,90}. La FRET se suprimirá totalmente cuando el dipolo de emisión del donador sea perpendicular al dipolo de absorción del aceptor, mientras que la TBET es menos sensible a esta alineación dipolar entre el donador y el aceptor. Y, sin lugar a dudas, la forma más fácil de llevar a cabo esta distinción es probar las propiedades fotofísicas del compuesto en disolventes orgánicos de diferentes polaridades, porque la TBET es independiente de la polaridad del disolvente y por tanto no habrá diferencias en la transferencia de energía.

Ha habido un crecimiento progresivo tanto en la cantidad como en la complejidad de los métodos analíticos basados en la fluorescencia durante el siglo pasado, convirtiéndola así en una importante herramienta analítica. En los campos de la biología y de la salud, la fluorescencia tiene aplicación directa en microscopía, inmunoensayos, biología molecular, ingeniería genética, análisis clínico, análisis toxicológico, etc.

1.3. COLORANTES ORGÁNICOS

Antes de mencionar la gran familia estructural de los colorantes tipo organoboro, es conveniente definir qué son los llamados «colorantes». Fundamentalmente los colorantes son compuestos orgánicos que presentan dobles enlaces conjugados en su estructura. O, dicho de otra manera, hidrocarburos que presentan cierto grado de deslocalización de electrones en el esqueleto molecular, ofreciendo esta estructura electrónica única con interesantes propiedades ópticas y optoelectrónicas. Estas características dan lugar a la observación de su coloración y a la aparición de una banda de absorción en la región visible del espectro (ver la Figura 1.4).

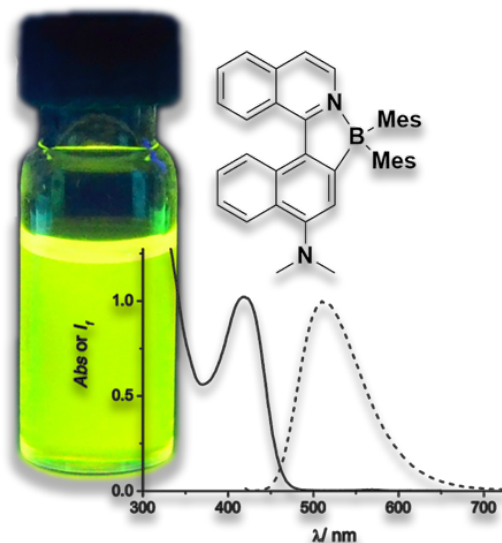


Figura 1.4. Ejemplo de un colorante organoboro mostrando su color en disolución (tolueno), estructura y espectros de absorción y emisión.

Además, no hay que dejar de lado la definición de «cromóforo», puesto que es aquella parte de una entidad molecular permanente en un átomo o grupo de átomos, en la cual se localiza aproximadamente la transición electrónica responsable de una determinada banda espectral. Por otro lado, y por analogía con los cromóforos, un «fluoróforo» es aquella entidad molecular que hace que ésta presente su fluorescencia. Se trata de un grupo funcional que tendrá la misión de absorber energía a una cierta longitud de onda y devolverla a emitir en otra longitud de onda determinada (en este caso, mayor o expresado de otra forma, con menor energía). Esta energía será dependiente del fluoróforo en sí y, en muchos de los casos, del ambiente químico en el que se encuentre.

Como es predecible, estos colorantes pueden agruparse y clasificarse en grandes familias según posean estructuras químicas similares o según su coloración o banda de absorción en el amplio rango espectral del visible (desde los 350 nm hasta los 800 nm, ver Figura 1.5).

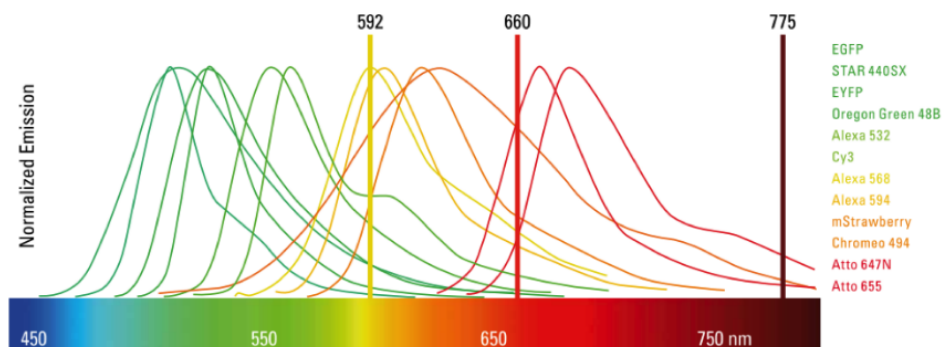


Figura 1.5. Espectros de emisión de varios colorantes.
Imagen extraída de Leica Microsystems.

Algunas de esas grandes familias de colorantes son: cumarinas, xantenos, oxacinas, cianinas, hidrocarburos policonjugados o policíclicos aromáticos (PAHs) y organoboros, entre otros. A continuación, se expondrán las diferencias estructurales y las principales características de cada familia. En la Figura 1.6 se pueden ver las principales familias de colorantes fluorescentes de gran interés en campos mencionados inicialmente.

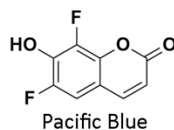
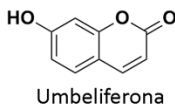
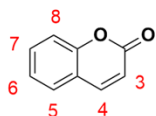
Las **cumarinas** son compuestos pertenecientes a la familia de las benzopironas, de estructura cristalina e incolora. Se encuentran principalmente en gran variedad de plantas y se ha demostrado que ejercen muchas actividades biológicas interesantes como actividad antitumoral, antiarrítmica, antiinflamatoria, antiséptica, analgésica, contra la hipertensión y el asma, etc. En cuanto a su espectro de absorción, se encuentra en la zona azul-verde del visible, es decir, entre los 400 y 540 nm^{13,14}. Una peculiaridad de estas moléculas resulta cuando éstas se encuentran sin sustituyentes en su esqueleto carbonado principal, puesto que en este caso no muestran fluorescencia. A pesar de ello, se puede inducir la fluorescencia con la presencia de grupos electrón-donadores en la posición 7 (ver la Figura 1.6a), debido al proceso interno de transferencia de carga (ICT) inducido por la absorción de luz (efecto *push-pull*). Sus rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_{fluor}) son relativamente altos (> 0.5). Sin embargo, manifiestan tanto baja estabilidad química como baja

INTRODUCCIÓN

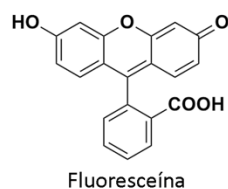
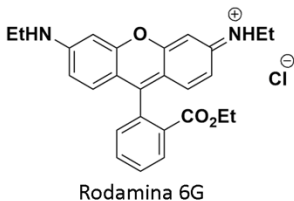
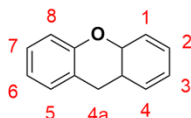
fotoestabilidad. La utilización de estos colorantes de tipo cumarina continua actualmente en auge ya que se sigue frecuentemente publicando sobre ellos en estos últimos años. Entre los fluoróforos más populares derivados de cumarina están AlexaFluor350, DiFMU, Pacific Blue, etc. De hecho, en esta memoria se puede encontrar en el Capítulo 5 la combinación de estas estructuras junto a otros colorantes de tipo organoboro llamados BASHY, los cuales se mencionarán más adelante en este capítulo.

Cuando se habla de los **xantenos**, se hace referencia a los colorantes derivados de las dibenzo-4*H*-pironas, normalmente presentándose como sólidos de color amarillo. Estos compuestos son muy empleados para sintetizar numerosos fármacos y, sobre todo, para su uso en insecticidas. Al igual que las cumarinas, en función de los sustituyentes que posean en sus anillos las bandas de absorción y emisión cambian, localizándose en la región del amarillo-rojo, desde los 550 hasta 650 nm. Existen diversos subgrupos dentro de los xantenos, como son los del tipo rodamina, que contienen grupos amino en las posiciones 2 y 7 de los anillos (ver Figura 1.6b), y de tipo fluoresceína, que poseen grupos hidroxilos en esas mismas posiciones. Esta familia presenta altos rendimientos cuánticos de fluorescencia. No obstante, su solubilidad no es alta, en torno a unos 10^{-3} M, tanto en disolución acuosa como en disolventes orgánicos. La relevancia de estos compuestos queda bien reflejada en la gran variedad de derivados de xanteno disponibles comercialmente. Por ejemplo, el isotiocianato de fluoresceína, más conocido como FITC, es probablemente el colorante más utilizado como marcador de biomoléculas, y se basa en la reactividad del grupo isotiocianato ($-N=C=S$) con las aminas biológicas presentes en el organismo.

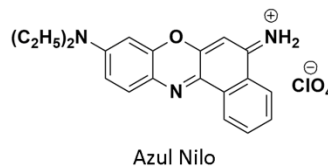
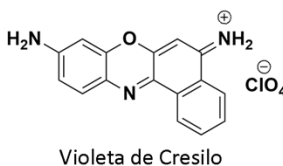
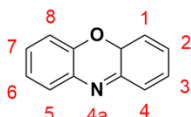
a) Cumarinas:



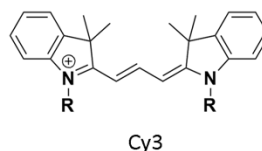
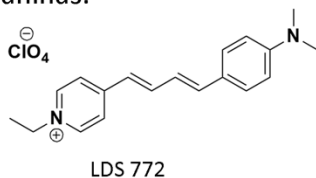
b) Xantenos:



c) Oxacinas:



d) Cianinas:



e) Hidrocarburos policonjugados:

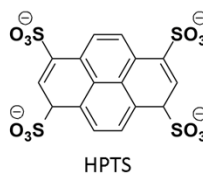
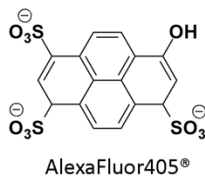
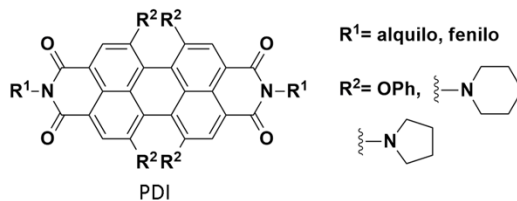
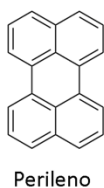
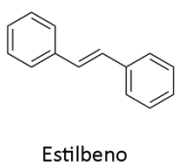


Figura 1.6. Estructuras de las principales familias de colorantes y algunos ejemplos.

Otra familia con estructura similar a los xantenos son las llamadas **oxacinas**, en este caso con la particularidad de encontrarse un nitrógeno sustituyendo al

INTRODUCCIÓN

carbono xanténico de la posición 4a (ver la Figura 1.6c). Antiguamente estos colorantes se utilizaban para teñir tejidos sedosos, pero debido a su poca estabilidad a la luz se dejaron de usar. Sus bandas de emisión se localizan en la zona del rojo, entre los 650 y 750 nm. Sus rendimientos cuánticos de fluorescencia son relativamente bajos (< 0.3), al igual que su fotoestabilidad y su solubilidad.

Las **cianinas** contienen en su estructura cadenas de dobles enlaces conjugados y en sus extremos grupos heterocíclicos. Sus bandas de emisión se pueden situar desde la región del rojo hasta el infrarrojo cercano. Al igual que las oxacinas tienen rendimientos cuánticos bajos (< 0.3), baja fotoestabilidad y solubilidad. Las merocianinas son compuestos similares en los que uno de los nitrógenos es reemplazado por un oxígeno, apareciendo en resonancia la forma neutra y la zwitteriónica¹⁵. Las cianinas han sido utilizadas para distintas aplicaciones en la biomedicina, como colorantes de unión tanto al ADN como a las proteínas¹⁶⁻¹⁸. Los más populares fueron presentados por A. Waggoner *et al.* en la década de los 90, y, aunque sus cianinas exhibían una débil unión no específica a las biomoléculas, sí presentaban unos coeficientes de extinción molar (ϵ) y rendimientos cuánticos bastante buenos^{17,18}. Entre las cianinas indólicas más utilizadas como fluoróforos se encuentra la familia de los «Cy», las cuales se encontraran en el Capítulo 6 de esta memoria. Mientras que en las merocianinas valdría mencionar la Merocianina540, tratándose de un tinte fluorescente aplicado a la tinción de una parte de las neuronas, llamado axones.

La siguiente familia son los **hidrocarburos policonjugados**, grupo de derivados polifenílicos y estilbenoides. Muchos de estos compuestos se encuentran en familias de plantas superiores como por ejemplo el *trans*-resveratrol, presente en uvas, arándanos, frambuesas y moras. Sus bandas de emisión se localizan en la región azul del espectro. Presentan baja solubilidad en muchos disolventes orgánicos, lo cual se debe a la presencia de los anillos policonjugados en su

estructura. Existe un subgrupo de derivados de las perilendicarboxidiimidias (PDI) cuyas bandas de emisión están en la región del naranja-rojo, y presentan las mismas dificultades de solubilidad. Algunos de estos compuestos han encontrado gran diversidad de aplicaciones como fluoróforos, siendo los derivados de naftaleno o los de pireno los más utilizados. También está el ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, más conocido como ANS¹⁹, el cual todavía se explota para caracterizar sitios de proteínas hidrofóbicas²⁰. Entre los fluoróforos pirénicos ampliamente utilizados están el ácido pirenosulfónico, AlexaFluor405® y HPTS.

Finalmente, la familia de los **organoboro** son los principales compuestos en los que se centra esta memoria y buena parte de los proyectos de nuestro grupo de investigación, en concreto en compuestos orgánicos fluorescentes que contienen boro en su estructura principal.

1.3.1. COLORANTES ORGANOBORO

Como se ha mencionado anteriormente en esta introducción, un colorante organoboro contiene esencialmente al menos un átomo de boro en su estructura y, además, puede poseer un grupo alquilo y otros dos o tres sustituyentes que pueden incluir haluros, grupos hidroxilos o grupos alcoxi. Si la estructura presenta tres fluoruros coordinados con boro, es decir, el átomo de B se encuentra tetracoordinado y se clasifica como trifluoroborato (una de las especies más estables de esta familia). En el caso que posea dos grupos hidroxilos junto al boro, se habla de ácidos borónicos, los cuales son muy utilizados como intermedios sintéticos con importantes usos en biomedicina. Si contienen grupos alcoxi se denominan boronatos o ésteres de boronato, que son también compuestos muy estables. Finalmente, si el boro está rodeado completamente de carbonos, entonces la molécula se llama borano y, por lo

INTRODUCCIÓN

general, es la especie más reactiva en comparación con los otros miembros de la familia.

Dentro de esta amplia familia de los colorantes con estructura organoboro, podemos encontrar específicamente los denominados bóricos, los boranilos, los destacados colorantes borodipirrometenos más conocidos como BODIPYs, los ácidos borónicos salicilidenedihidrazona (BASHY), las arilisoquinolinas boriladas (BAI), etc.

Recientemente se ha incrementado significativamente el interés en la preparación de nuevos compuestos de boro debido a sus interesantes propiedades fotofísicas, su eficacia en el transporte de electrones^{21,22} y sus múltiples aplicaciones como materiales poliméricos luminiscentes^{23,24} en óptica no lineal²⁵, como cromóforos modelo para el estudio de transferencia de electrones y como sensores químicos²⁶⁻²⁸. En muchas de estas estructuras, el átomo de B asume un papel imprescindible puesto que puede mejorar la estabilidad del ligando complejado, la conjugación y, especialmente, la transferencia de carga en todo el sistema π . De los sistemas conjugados π que contienen heteroátomos, los compuestos que contienen boro tricoordinado presentan características únicas. Esto se debe a la deficiencia de electrones del átomo de boro en un orbital p vacante funcionando por tanto como un fuerte aceptor de electrones capaz de una deslocalización significativa (ver Figura 1.7). Consecuentemente, la superposición del orbital p vacío en el boro con el orbital molecular desocupado de más baja energía (sus siglas en inglés, LUMO, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) de las estructuras orgánicas provenientes conduce a una disminución de la diferencia entre el orbital molecular ocupado de más energía (en inglés, HOMO, *Highest Occupied Molecular Orbital*) y el orbital molecular no ocupado de más baja energía (LUMO) permitiendo este fenómeno, dando lugar a las interesantes propiedades ópticas y electrónicas ya mencionadas anteriormente.

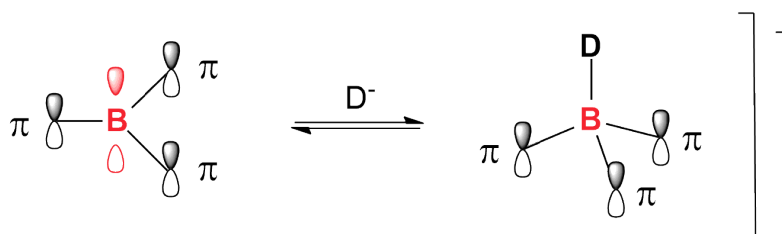


Figura 1.7. Ilustración de las interacciones de los orbitales moleculares del átomo de B con sustituyentes π y nucleófilos.

Cabe destacar que la estabilización del átomo de B tricoordinado es de gran importancia y para ello, generalmente se requiere de una protección estérica para evitar la descomposición en el aire y/o humedad existente. Los grupos más utilizados son el 2,4,6-trimetilfenil, más conocido como la abreviatura «Mes», el 2,4,6-triisopropilfenil («Tip») y el grupo más voluminoso 2,4,6-triter-butilfenil («Mes*»). En la Figura 1.6 se pueden observar sus estructuras. En la presente memoria se va a mostrar en muchos de los compuestos sintetizados y utilizados estructuras con grupos mesitilos protegiendo estéricamente al átomo de B. Los grupos $B(\text{Mes})_2$ se comportan como aceptores π comparables a las funcionalidades de grupos nitro y ciano, los cuales son capaces de retirar electrones^{29,30}.

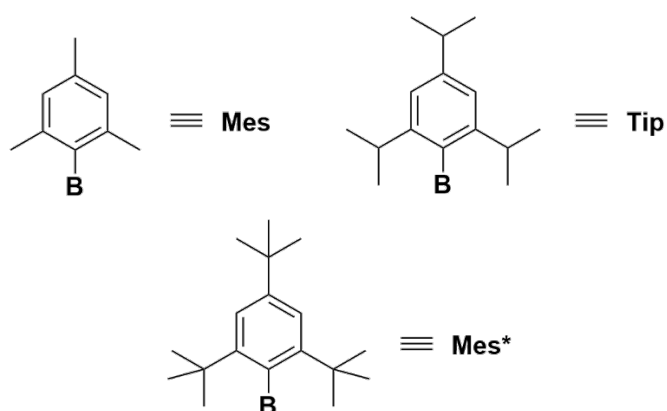
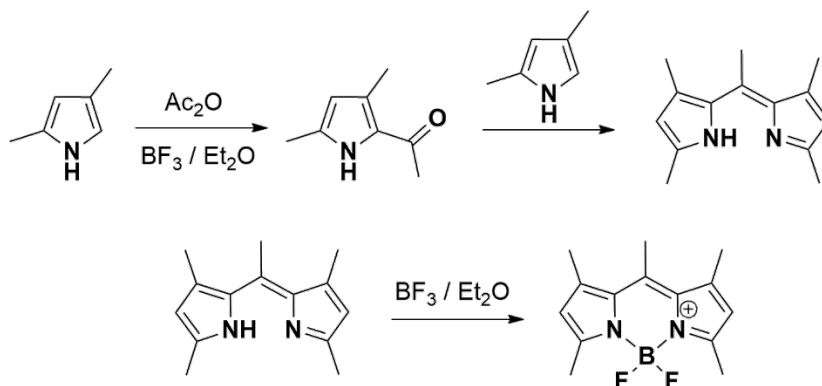


Figura 1.8. Grupos voluminosos utilizados para proteger estéricamente a compuestos que contengan átomos de B.

INTRODUCCIÓN

Tanto los **bóricos** (quelatos de benzimidazol-iminocumarina)³¹ como los derivados de **boranilos**³² son compuestos que contienen B(III). Los primeros de ellos forman complejos con ligandos *N,O* o *N,N* y, los segundos son derivados de anilina-iminas.

Los **borodipirrometenos** son compuestos que contienen en su estructura principal el 4,4-difluoro-4-boro-3a,4a-diaza-s-indaceno, pero debido al uso repetitivo en este capítulo se abreviará como BODIPY. Estos compuestos fueron descubiertos por primera vez por A. Treibs y F. H. Kreuzer³³, los cuales intentaban acetilar el anillo pirrólico del 2,4-dimetilpirrol con anhídrido acético y trifluoruro de boroeterato. Sin embargo, como se puede ver en el Esquema 1.1, obtuvieron un producto desconocido, el primer BODIPY. Aunque se descubrió en la década de los 60, pocos artículos científicos se publicaron empleando esta molécula. Su desarrollo no comenzó hasta 1987 con la publicación de una patente³⁴ de una compañía especializada en productos fluorescentes (*Molecular Probes, Inc.*), la cual da a conocer sus altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, su alta estabilidad química y fotoquímica y, sobre todo, su versatilidad química. Por consiguiente, al conocerse la versátil aplicabilidad de estos compuestos hubo un aumento exponencial en el número de artículos científicos y patentes sobre estos fluoróforos³⁵.

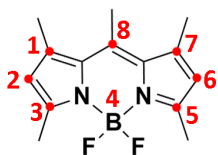


Esquema 1.1. Ruta sintética propuesta por A. Treibs y F. H. Kreuzer con el resultado inesperado del primer BODIPY.

Estos colorantes tienen en su estructura principal dos unidades pirrólicas, unidas por un puente metilénico, que se coordinan a través del par de electrones no enlazante del nitrógeno pirrólico a un átomo de B o a un difluoroboril, por ello, son derivados pirrólicos similares a las porfirinas, porfirazinas y ftalocianinas.

En general, estos compuestos suelen ser sencillos de sintetizar a partir de pirroles comerciales. Además, son considerablemente reactivos debido a que son compuestos ricos en electrones y pueden llegar a experimentar diversos tipos de reacciones en todas las posiciones de su estructura principal, como se observa en la Figura 1.9. Sufren fácilmente reacciones de sustitución electrofílica aromática (S_{EAr}) como la halogenación³⁶⁻³⁹, la sulfonación⁴⁰, la nitración^{41,42} y la formilación^{43,44}, fundamentalmente en las posiciones 2 y 6 de su esqueleto. También experimentan reacciones de sustitución con diferentes tipos de reactivos nucleofílicos (S_{NAr}) en las posiciones 1, 3, 5 y 7^{45,46}. Pueden sufrir igualmente reacciones de acoplamiento carbono-carbono catalizadas por paladio (reacciones de Sonogashira, Suzuki, etc.)⁴⁶⁻⁵¹. Por ello, la relativa facilidad de funcionalización de su estructura principal permite obtener nuevos fluoróforos de esta familia con las propiedades fotofísicas muy variables lo que les hace útiles para una amplia gama de aplicaciones.

INTRODUCCIÓN



- 1** - Reacciones de Knoevenagel.
- 2** - S_EAr , Reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por Pd.
- 3** - Reacciones de Knoevenagel, S_E con NBS.
- 4** - S_N con nucleófilos carbonados y oxigenados.
- 5** - S_EAr , S_NAr , Reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por Pd, Sustitución y Alquenilación C-H directa.
- 7** - S_EAr , S_NAr , Reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por Pd.
- 8** - S_NAr , Liebeskind Srögl, Reacciones de acoplamiento C-C catalizadas por Pd.

Figura 1.9. Reactividad en función de la posición en el esqueleto de la estructura principal del BODIPY.

Retomando sus propiedades fotofísicas, en general se observa en su espectro una banda de absorción intensa en la región del visible que puede ir desde los 500 nm hasta los 650 nm, con un coeficiente de extinción absorción molar (ϵ) entre los 40 000 y 100 000 $M^{-1} cm^{-1}$. En cuanto a su espectro de emisión, normalmente se observa una banda estrecha e intensa, con pequeños desplazamientos de Stokes⁵²⁻⁵⁴ y altos rendimientos cuánticos de fluorescencia (muy cercanos a la unidad) con tiempos de vida de fluorescencia entre 1 y 10 ns. Asimismo, muestran buena estabilidad química y fotoquímica tanto en disolución como en estado sólido y no sufren cambios drásticos con el cambio de polaridad y/o del pH del disolvente⁵⁵⁻⁵⁹.

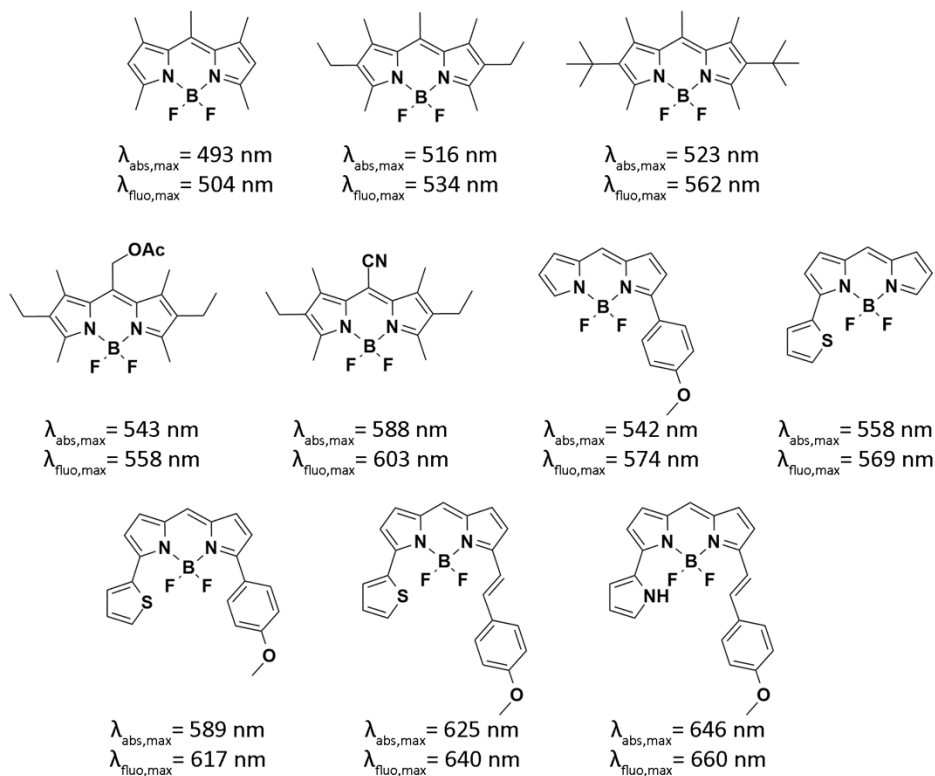


Figura 1.10. Algunos ejemplos de colorantes BODIPY y alguna de sus características espectrales.

Por otro lado, es bastante sorprendente que los **ácidos borónicos (BA)**, a pesar de su alta disponibilidad y diversidad estructural, hayan sido casi no utilizados como bloques útiles para la construcción de colorantes fluorescentes. Esta falta de uso puede sugerir la existencia de algunas dificultades en la generación autoensamblada de moléculas fluorescentes basadas en este grupo funcional. Es conocido que los BA muestran una rica y variada Química Supramolecular⁶⁰⁻⁶⁶ y forman complejos fluorescentes al unirse con ligandos bidentados⁶⁷⁻⁷⁰. No obstante, la coordinación es reversible y los conjugados a menudo carecen de la estabilidad requerida a largo plazo para su aplicación como colorantes funcionales. Además, los BA generan complejos más estables con ligandos tridentados, aunque desafortunadamente estos boronatos son poco

INTRODUCCIÓN

fluorescentes debido a que el átomo de boro central adopta una geometría tetraédrica fuera del plano⁷¹.

Claramente los BA aportan nuevas e interesantes ventajas, como la de dar rigidez a estructuras hasta la fecha no publicadas con ligandos tridentados π conjugados. Teniendo esto en cuenta, era una opción muy interesante el considerar que los ligandos de tipo «base de Schiff» pudieran usarse como una plataforma adecuada para construir boronatos fluorescentes. De esta manera, la estructura modular de este tipo de ligandos puede diseñarse fácilmente, acomodando los BA en un complejo estable conformacionalmente. Así, la evolución en el empleo de nuevos ligandos permitió obtener la condensación de los **ácidos borónicos** (BA) con un sistema de ligandos de **salicilidenedhidrazona** (SHY), lo que conduce a colorantes «BASHY» que destacan por sus propiedades fotofísicas intrigantes e interesantes aplicaciones en bioimagen⁷²⁻⁷³.

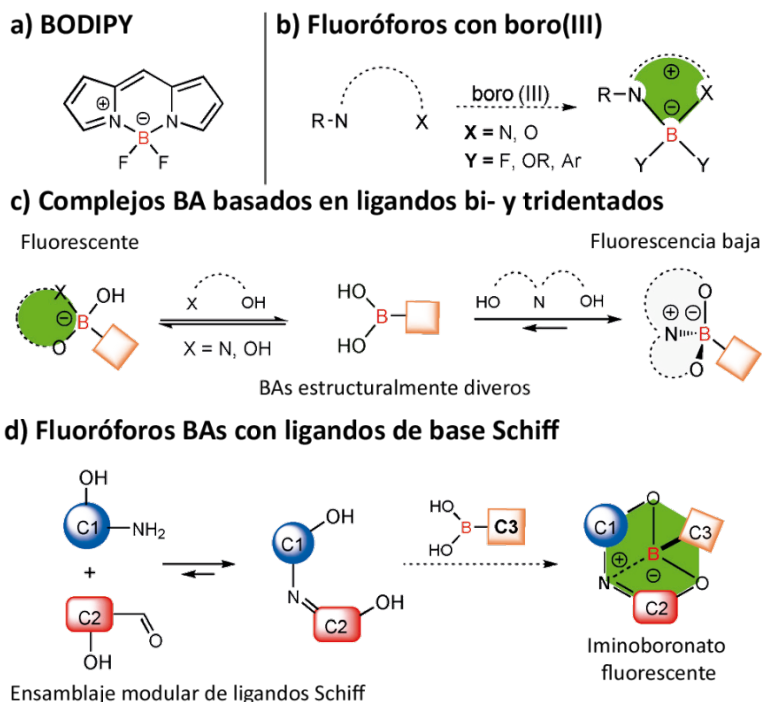


Figura 1.11. Evolución de las estructuras de a) BODIPY. b) Fluoróforos con boro. c) Complejación de ácidos borónicos (BAs) con ligandos bi- y tridentados. d) Diseño de colorantes fluorescentes con ligandos de base de Schiff y BAs. Imagen adaptada de ref. ⁷².

Esta familia única de colorantes BASHY muestra una emisión dependiente de la polaridad del medio en el rango espectral de verde a amarillo, unos rendimientos cuánticos de hasta 0.6 en disolventes no polares y un brillo notable similar a otros fluoróforos con arquitecturas semejantes ampliamente utilizados como son la familia de las rodaminas o los colorantes cianinas⁷⁴. Además, los colorantes BASHY exhiben una estructura muy modular que se puede ajustar fácilmente para diversas aplicaciones.

INTRODUCCIÓN

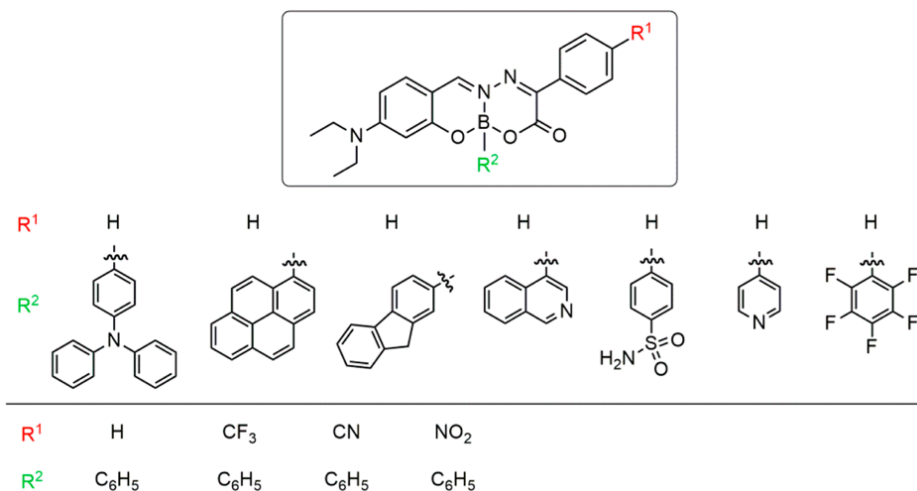


Figura 1.12. Algunos ejemplos de BASHY publicados en nuestro grupo de investigación⁷⁵.

Asimismo, en los últimos años se ha explotado una nueva clase de fluoróforos con grupos que contienen ésteres borónicos junto a arilisoquinolinas, los llamados abreviadamente BAI (**arilisoquinolinas boriladas**). Estos compuestos fluoróforos han exhibido una emisión de fluorescencia con transferencia de carga interna modulable electrónicamente en una amplia ventana espectroscópica. La modulación puede hacerse a través de una protonación de la isoquinolina o mediante la formación de complejos de fluoroboronato con el éster del ácido borónico.

Estos compuestos tienen su fluorescencia desplazada hacia el rojo, siendo además posible y conveniente el control de sus propiedades de fluorescencia convenientemente mediante la variación de las propiedades electrónicas de los sustituyentes, la protonación o la temperatura⁷⁶⁻⁷⁸. La integración estructural de un resto de éster borónico a estos colorantes confiere propiedades fotofísicas que no se observan para los análogos no borilados.

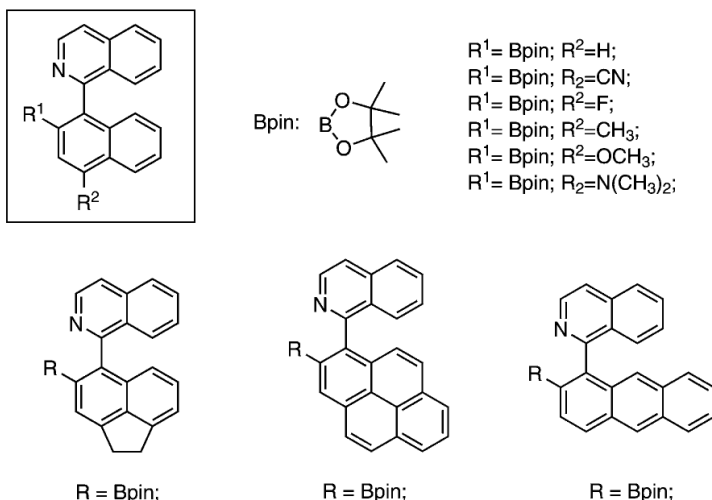


Figura 1.13. Algunos ejemplos de BAI publicados en nuestro grupo de investigación⁷⁶.

1.4. APLICACIONES PRINCIPALES DE LOS COLORANTES FLUORESCENTES: MICROSCOPIA CONFOCAL Y MICROSCOPIA DE EXCITACION BIFOTONICA. UNA VISION GENERAL DE LA BIOIMAGEN.

Durante muchos años la herramienta fundamental para la obtención de las imágenes biológicas ha sido la microscopía óptica. Esto conllevaba adentrarse en intentar comprender los sistemas biológicos más complejos, pero era necesaria una mayor capacidad de visualización y cuantificación de esos procesos biológicos ocurridos con una resolución espacial y temporal óptima. Sin embargo, la microscopía óptica tenía un gran hándicap, sólo se podían visualizar detalles a menos de 10 μm de profundidad. Esto se debía a la dispersión de la luz producida por los tejidos biológicos, impidiendo así una buena adquisición de información^{79,80}. Gracias a la evolución tecnológica en microscopía de fluorescencia, así como al desarrollo de configuraciones de microscopios confocales y multifotónicos, se ha conseguido obtener imágenes

INTRODUCCIÓN

muy por debajo de ese límite, llegando a la escala de milímetros en los tejidos vivos⁸¹⁻⁸³.

A diferencia de otras técnicas de bioimagen más costosas que incluyen imágenes de resonancia magnética, topografía de emisión de positrones y ultrasonido, la bioimagen fluorescente es muy sensible y específica⁸⁴. Además, se trata de una técnica menos invasiva que las técnicas de imagen convencionales, haciéndola mucho más atractiva. A diferencia de las otras técnicas de imagen, ésta permite la visualización de biomoléculas pequeñas de muy baja concentración como son aniones, cationes, aminoácidos, y otras pequeñas moléculas neutras en células vivas, a través de colorantes fluorescentes que se unen como marcador al objetivo celular en sí, y no a través de la acumulación en las células. Así, los fluoróforos adquieren un papel importante en la visualización de cambios fisiológicos en las células gracias a la bioimagen. Debido a la gran variedad de fluoróforos nombrados anteriormente, se podrá alcanzar sintéticamente y llegar a receptores más específicos hacia el objetivo celular. Y, para ello es necesario cumplir los requisitos indispensables para convertirse en colorantes fluorescentes ideales para la bioimagen^{80,85}. Algunos de estos requisitos son:

- Baja citotoxicidad, en el caso de la captación de imagen en células vivas o para las aplicaciones *in vivo*.
- Propiedades fisicoquímicas adecuadas como, por ejemplo, solubilidad adecuada en pH fisiológicos o capacidad de dispersión en tampones comunes, medios de cultivo celular o fluidos corporales, según la aplicación. Asimismo, es muy importante para obtener bioimágenes, la estabilidad química en el medio de trabajo y la baja tendencia a la agregación.
- Intenso brillo, es decir, la combinación de un gran coeficiente de absorción molar (ϵ) en la longitud de onda de excitación y un elevado

rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_{fluo}). Con esta propiedad en los fluoróforos se permite reducir la potencia del láser y el tiempo de exposición bajo el microscopio, con el propósito de obtener de imágenes de calidad.

- Longitudes de onda de excitación y emisión altas, es decir, menos energéticas, donde no se produzcan efectos de atenuación, debido tanto a la dispersión como a la absorción de la materia biológica. Las llamadas ventanas de transparencia biológicas se encuentran ubicadas en la región del infrarrojo cercano (NIR)⁸⁶, la primera ventana llamada NIR-I abarca desde los 700 nm hasta los 950 nm, mientras que la segunda ventana (NIR-II), de los 1 000 nm a los 1 350 nm, cada una se caracteriza por una alta transparencia hacia la materia biológica.
- Desplazamiento de Stokes elevado, puesto que los fluoróforos con este parámetro de Stokes bajo generalmente experimentan fenómenos de reabsorción, limitando el análisis cuantitativo y complican la configuración experimental.
- Colorantes con grupos funcionales adecuados para la unión específica del objetivo celular, para la obtención de imágenes concretas del orgánulo celular a visualizar.
- Tamaño molecular específico, es decir, se suelen utilizar moléculas pequeñas para aplicaciones específicas en la obtención de imágenes de orgánulos celulares. Las nanopartículas fluorescentes se utilizan para la unión específica en tumores.
- El *cross-section* o la sección transversal de dos fotones (σ_{2p}) se trata de una medida de la probabilidad de que un fluoróforo sea excitado por la absorción simultánea de dos fotones a una determinada longitud de onda. Este parámetro será muy importante a la hora de extraer imágenes con un microscopio multifotónico.

INTRODUCCIÓN

Hacer coincidir todos estos parámetros conlleva a un gran reto y por ello, trabajar en este campo de la Ciencia implica la realización de un significativo esfuerzo. Hay un gran número de colorantes fluorescentes en la literatura, entre ellos se puede incluir desde las «pequeñas» moléculas de colorantes orgánicos que se ha visto durante la introducción de esta memoria hasta las proteínas fluorescentes junto con las nanopartículas inorgánicas y orgánicas. Cada familia de colorantes tiene sus propias ventajas e inconvenientes para las aplicaciones específicas a las que están destinadas, ya sea un microscopio convencional o multifotónico.

En un microscopio de fluorescencia convencional, tanto el objetivo celular como la célula completa en sí está recibiendo luz íntegramente a partir de la fuente de iluminación, y por tanto todas las partes celulares estarán siendo excitadas. No obstante, un microscopio confocal aplica una pequeña iluminación puntual, en un plano óptico conjugado. De esta manera, la luz que sólo está dentro de ese plano puede ser detectada, haciendo que la calidad de imagen sea mejor. En la microscopía de fluorescencia confocal se utiliza un único fotón para excitar una molécula desde su estado fundamental a un estado de mayor energía. Por otro lado, la microscopía de fluorescencia multifotónica o concretamente la de excitación de dos fotones (TPM) se basa en la absorción simultánea de dos o varios fotones de baja energía por una molécula. Si se intentara excitar con un fotón de esta energía, la energía sería tan baja que sería insuficiente, pero si se suma ésta energía en dos o varios fotones será suficiente para hacer saltar un electrón a un nivel vibratorio de mayor energía, y se podrá estimular la fluorescencia. Además, hay que tener en cuenta que los fotones deben llegar con una diferencia de tiempo ínfima entre ellos, aproximadamente deben estar en el orden de 10^{-16} segundos. Por eso, es necesario un enorme flujo de fotones para generar una cantidad detectable de fluorescencia.

A continuación se hará una breve comparativa entre la excitación con un solo fotón y con dos fotones como se muestra en la Figura 1.14 para una mayor comprensión. Los procesos de excitación ocurren entre el estado fundamental y los niveles vibratorios del primer estado excitado electrónico. A la izquierda de la figura la excitación de un sólo fotón ocurre a través de la absorción exclusivamente de un fotón (como es de esperar), mientras que a la derecha de la figura la excitación de dos fotones ocurre a través de la absorción de dos fotones de baja energía a través de estados intermedios de corta duración. Después de cualquier proceso de excitación, el fotón del fluoróforo se relaja al nivel de energía más bajo de los primeros estados electrónicos excitados a través de procesos vibratorios (flechas de color negro). Los procesos posteriores de emisión de fluorescencia para ambos modos de relajación son los mismos.

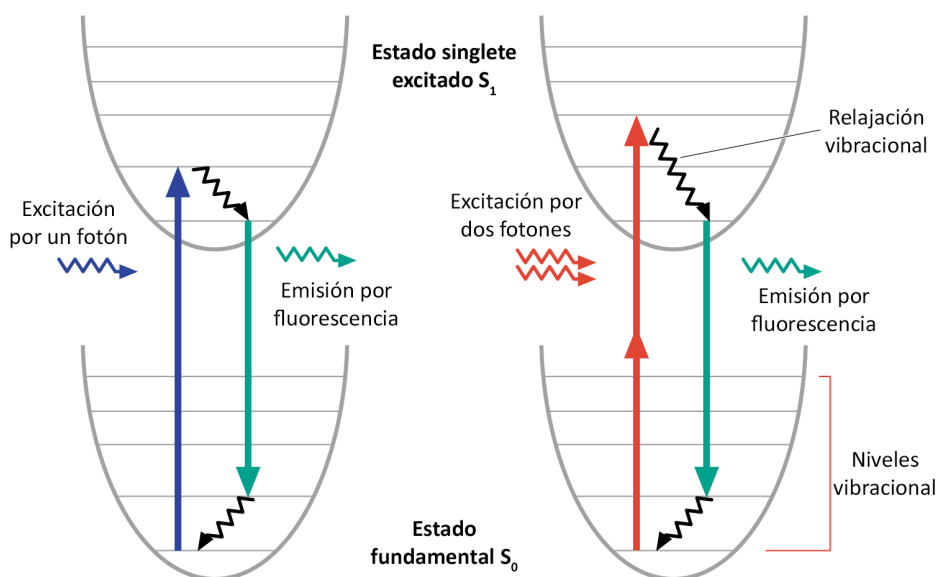


Figura 1.14. Diagrama de Jablonski para la excitación por un solo fotón (izquierda) y por dos fotones (derecha)⁸⁷.

La absorción bifotónica (TPA) abre un mayor abanico de posibles aplicaciones respecto a la absorción convencional de un fotón. Entre ellas están las aplicaciones para microscopía, microfabricación, liberación localizada de

INTRODUCCIÓN

bioespecies activas, etc. El hecho de aumentar sus ventajas, conlleva aparejada una creciente demanda para diseñar nuevos colorantes con altos valores de *cross sections*.

La primera vez que se analizó teóricamente una TPA sobre una molécula concreta fue en la década de 1930, por parte de una estudiante que finalizaba su doctorado, M. Göppert-Mayer⁹¹ (no fue hasta 1961 cuando se demostró experimentalmente)⁹². De hecho, la unidad GM de *cross sections* lleva las siglas de su nombre (Göppert-Mayer) y remarcablemente le otorgaron el Premio Nobel de Física en 1963 por su trabajo. Como se ha mencionado anteriormente, la principal diferencia entre la absorción de un fotón y la de dos fotones es que la TPA implica la interacción simultánea de dos fotones por lo que aumenta con el cuadrado de la intensidad de la luz, mientras que la absorción de un fotón depende linealmente de la intensidad.

Desde el punto de vista fotofísico, el *cross section* de la TPA es directamente proporcional a los momentos dipolares. Por tanto, dos de los parámetros clave que conducen a mejorar el *cross section* son la modificación de los momentos dipolares de una molécula entre su estado fundamental y excitado, así como el momento dipolar de transición que conecta estos dos estados. Los parámetros se pueden mejorar combinando tres elementos estructurales distintos que están compuestos por grupos donadores de electrones (D), grupos que aceptan electrones (A) y puentes o sistemas π conjugados que conectan los dos primeros componentes.

Como se observa en la Figura 1.15, dependiendo de su disposición espacial se pueden construir tres tipos de estructuras dipolares: las dipolares asimétricas^{93,94} (a), las cuadrupolares simétricas⁹⁵⁻⁹⁸ (b) y las octopolares⁹⁹⁻¹⁰³ (c). En las del primer modelo (a, asimétricas) encontramos estructuras del tipo donador-aceptor conectado a través de un puente o sistema π conjugado, es

decir, del tipo D- π -A. En las simétricas (b), aparece un patrón simétrico tipo D- π -D o A- π -A, así como estructuras D- π -A- π -D o también, A- π -D- π -A.

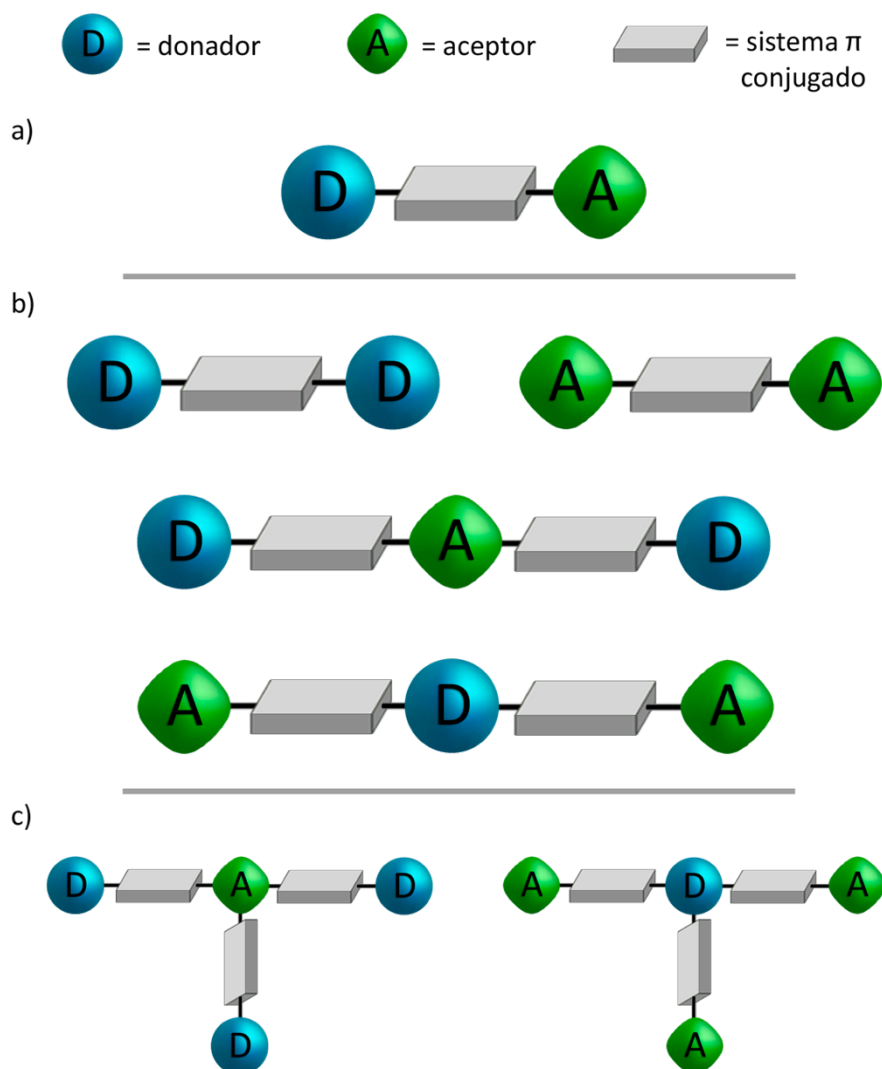


Figura 1.15. Estructuras moleculares para el diseño de fluoróforos con *cross sections* de TPA importantes. (a) Estructuras dipolares asimétricas, (b) estructuras cuadrupolares simétricas y (c) estructuras octopolares.

Por último, las octopolares (c) presentan un formato DA₃ o AD₃. A pesar de la versatilidad estructural, todas estas estructuras están destinadas a garantizar la

INTRODUCCIÓN

mejor reubicación de la carga en la fotoexcitación mientras se mantiene un fuerte momento dipolar de transición.

Normalmente, el *cross section* de la TPA aumenta con el aumento del carácter de transferencia de carga en la fotoexcitación. Ésto podría lograrse principalmente a través de diseños moleculares que contengan conjugaciones π de mayor longitud, así como sustituyentes donadores y aceptores de electrones más fuertes. Igualmente, hay que tener en cuenta para las aplicaciones en bioimagen que en disolventes próticos polares (por ejemplo, el agua), al encontrarse cada vez más polarizado el estado excitado de tales estructuras, se pondrán en marcha rutas de desactivación no radiativas que reducirán sustancialmente el rendimiento cuántico de fluorescencia. Además, al aumentar la conjugación π y el carácter de transferencia de carga, la superposición orbital entre el estado fundamental y el excitado disminuye gradualmente, lo que conducirá a momentos dipolares de transición más pequeños y, finalmente, a *cross sections* de la TPA menores.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

[1] Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, **2012**.

[2] Lakowicz, J. R. (Ed.). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science & Business Media, **2013**.

[3] Acuña, A. U.; Amat-Guerri, F. *Early history of solutions fluorescence: the *Lignum nephriticum* of Nicolás Monardes, in Fluorescence of Supramolecules, Polymers, and Nanosystems*. Springer Berlin Heidelberg, **2008**, 3-20.

[4] Acuña, A. U.; Amat-Guerri, F.; Morcillo, P.; Liras, M.; Rodríguez, B. *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 3020-3023.

- [5] Clarke, E. D. *Ann. Phil.*, **1819**, *14*, 34-36.
- [6] Haüy, R. J. *Traité de Minéralogie*, **1822**, *1*, 512.
- [7] Brewster, D. *Trans. R. Soc. Edinburgh*, **1834**, *12*, 538-545.
- [8] Herschel, J. *Phil. Trans. R. Soc. London*, **1845**, *135*, 143-153.
- [9] Stokes, G. G. *Phil. Trans. R. Soc. London*, **1852**, 463-562.
- [10] Jablonski, A. *Nature*, **1933**, *131*, 839-840.
- [11] Goppelsröder, F. J. *Prakt. Chem.*, **1868**, *104*, 10-27.
- [12] Wu, P. G.; Brand, L. *Anal. Biochem.*, **1994**, *218*, 1-13.
- [13] Sethna, S. M.; Shah, N. M. *Chem. Rev.*, **1945**, *36*, 1-62.
- [14] Wagner, B. D. *Molecules*, **2009**, *14*, 210-237.
- [15] Ernst, L. A.; Gupta, R. K.; Mujumdar, R. B.; Waggoner, A. S. *Cytometry*, **1989**, *10*, 3-10.
- [16] Karlsson, H. J.; Eriksson, M.; Perzon, E.; Åkerman, B.; Lincoln, P.; Westman, G. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 6227-6234.
- [17] Shank, N. I.; Pham, H. H.; Waggoner, A. S.; Armitage, B. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 242-251.
- [18] Waggoner, A. *United States Patent*, **1997**, 5627027.
- [19] Stryer, L. *J. Mol. Biol.*, **1965**, *13*, 482-495.
- [20] Hawe, A.; Sutter, M.; Jiskoot, W. *Pharm. Res.*, **2008**, *25*, 1487-1499.
- [21] Szaciłowski, K. *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 3481-3548.
- [22] Wang, X.; Cao, L.; Yang, S. T.; Lu, F.; Meziani, M. J.; Tian, L.; Sun, K. W.; Bloodgood, M. A.; Sun, Y. P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2010**, *49*, 5310-5324.

INTRODUCCIÓN

- [23] Cheng, F.; Jäkle, F. *Chem. Comm.*, **2010**, *46*, 3717-3719.
- [24] Qin, Y.; Pagba, C.; Piotrowiak, P.; Jäkle, F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 7015-7018.
- [25] Yuan, Z.; Collings, J. C.; Taylor, N. J.; Marder, T. B.; Jardin, C.; Halet, J. F. *J. Solid State Chem.*, **2000**, *154*, 5-12.
- [26] Kim, Y.; Zhao, Y.; Gabbaï, F. P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2009**, *48*, 4957-4960.
- [27] Agou, T.; Sekine, M.; Kobayashi, J.; Kawashima, T. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 5056-5062.
- [28] Andréasson, J.; Pischel, U. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 174-188.
- [29] Nagai, A.; Murakami, T.; Nagata, Y.; Kokado, K.; Chujo, Y. *Macromolecules*, **2009**, *42*, 7217-7220.
- [30] Tour, J. M. *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 537-553.
- [31] Frath, D.; Poirel, A.; Ulrich, G.; De Nicola, A.; Ziessel, R. *Chem. Comm.*, **2013**, *49*, 4908-4910.
- [32] Dobkowski, J.; Wnuk, P.; Buczynska, J.; Pszona, M.; Orzanowska, G.; Frath, D.; Ulrich, G.; Massue, J.; Mosquera-Vázquez, S.; Vauthey, E.; Radzewicz, C.; Ziessel, R.; Waluk, J. *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 1312-1327.
- [33] Jiang, X. D.; Zhang, J.; Furuyama, T.; Zhao, W. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 248-251.
- [34] Kang, H. C.; Haugland, R. P. *United States Patent*, **1988**, 4774339.
- [35] Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2008**, *47*, 1184-1201.
- [36] Bonardi, L.; Ulrich, G.; Ziessel, R. *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 2183-2186.

- [37] Bozdemir, Ö. A.; Büyükcakir, O.; Akkaya, E. U. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 3830-3838.
- [38] Rihn, S.; Erdem, M.; De Nicola, A.; Retailleau, P.; Ziesel, R. *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 1916-1919.
- [39] Wang, L.; Wang, J. W.; Cui, A. J.; Cai, X. X.; Wan, Y.; Chen, Q.; He, M. Y.; Zhang, W. *RSC Adv.*, **2013**, *3*, 9219-9222.
- [40] Li, L.; Han, J.; Nguyen, B.; Burgess, K. *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 1963-1970.
- [41] Boyer, J. H.; Haag, A. M.; Sathyamoorthi, G.; Soong, M. L.; Thangaraj, K.; Pavlopoulos, T. G. *Heteroat. Chem.*, **1993**, *4*, 39-49.
- [42] Esnal, I.; Bañuelos, J.; López Arbeloa, I.; Costela, A.; Garcia-Moreno, I.; Garzón, M.; Agarrabeitia, A. R.; Ortiz, M. J. *RSC Adv.*, **2013**, *3*, 1547-1556.
- [43] Jiao, L.; Yu, C.; Li, J.; Wang, Z.; Wu, M.; Hao, E. *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 7525-7528.
- [44] Yu, C.; Jiao, L.; Yin, H.; Zhou, J.; Pang, W.; Wu, Y.; Wuang, Z.; Yang, J.; Hao, E. *Eur. J. Chem.*, **2011**, 5460-5468.
- [45] Rohand, T.; Baruah, M.; Qin, W.; Boens, N.; Dehaen, W. *Chem. Comm.*, **2006**, 266-268.
- [46] Leen, V.; Miscoria, D.; Yin, S.; Filarowski, A.; Ngongo, J. M.; Van der Auweraer, M.; Boens, N.; Dehaen, W. *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 8168-8176.
- [47] Ulrich, G.; Ziesel, R. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 2070-2083.
- [48] Rihn, S.; Retailleau, P.; Bugsaliewicz, N.; De Nicola, A.; Ziesel, R. *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 7008-7013.
- [49] Han, J.; Gonzalez, G.; Aguilar-Aguilar, A.; Peña-Cabrera, E.; Burgess, K. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 34-36.

INTRODUCCIÓN

[50] Niu, S.; Ulrich, G.; Retailleau, P.; Ziesel, R. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 4848-4853.

[51] Heyer, E.; Ziesel, R. *Tetrahedron Lett.*, **2013**, *54*, 3388-3393.

[52] Qin, W.; Baruah, M.; Van der Auweraer, M.; De Schryver, F. C.; Boens, N. *J. Phys. Chem. A*, **2005**, *109*, 7371-7384.

[53] Baruah, M.; Qin, W.; Flors, C.; Hofkens, J.; Vallée, R. A. L.; Beljonne, D.; Van der Auweraer, M.; De Borggraeve, W. M.; Boens, N. *J. Phys. Chem. A*, **2006**, *110*, 5998-6009.

[54] Karolin, J.; Johansson, L. B. A.; Strandberg, L.; Ny, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 7801-7806.

[55] Parhi, A. K.; Kung, M. P.; Ploessl, K.; Kung, H. F. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 3395-3399.

[56] Ikeda, C.; Ueda, S.; Nabeshima, T. *Chem. Comm.*, **2009**, 2544-2546.

[57] Kubo, Y.; Minowa, Y.; Shoda, T.; Takeshita, K. *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 1600-1602.

[58] Rausaria, S.; Kamadulski, A.; Rath, N. P.; Bryant, L.; Chen, Z.; Salvemini, D.; Neumann, W. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 4200-4203.

[59] Tomimori, Y.; Okujima, T.; Yano, T.; Mori, S.; Ono, N.; Yamada, H.; Uno, H. *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *67*, 3187-3193.

[60] Edwards, N. Y.; Sager, T. W.; McDevitt, J. T.; Anslyn, E. V. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 13575.

[61] Iwasawa, N.; Takahagi, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 7754-7755.

[62] Schiller, A.; Wessling, R. A.; Singaram, B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 6457-6459.

- [63] Schiller, A.; Wessling, R. A.; Singaram, B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *119*, 6577-6579.
- [64] Christinat, N.; Scopelliti, R.; Severin, K. Schiller, A.; Wessling, R. A.; Singaram, B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 1848-1852.
- [65] Christinat, N.; Scopelliti, R.; Severin, K. Schiller, A.; Wessling, R. A.; Singaram, B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *120*, 1874-1878.
- [66] Kubo, Y.; Nishiyabu, R.; James, T. D. *Chem. Comm.*, **2015**, *51*, 2005-2020.
- [67] Kubo, Y.; Kobayashi, A.; Ishida, T.; Misawa, Y.; James, T. D. *Chem. Comm.*, **2005**, 2846-2848.
- [68] Barder, T. E.; Buchwald, S. L. *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 137-139.
- [69] Tomsho, J. W.; Benkovic, S. J. *J. Org. Chem.*, **2012**, *77*, 2098-2106.
- [70] Aronoff, M. R.; VanVeller, B.; Raines, R. T. *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 5382-5385.
- [71] Chan-Navarro, R.; Jiménez-Pérez, V. M.; Muñoz-Flores, B. M.; Dias, H. V. R.; Moggio, I.; Arias, E.; Ramos-Ortíz, G.; Santillan, R.; García, C.; Ochoa, M. E.; Yousufuddin, M.M Waksman, N. *Dyes Pigm.*, **2013**, *99*, 1036-1043.
- [72] Santos, F. M. F.; Rosa, J. N.; Candeias, N. R.; Carvalho, C. P.; Matos, A. I.; Ventura, A. E.; Florindo, H. F.; Silva, L. C.; Pischel, U.; Gois, P. M. P. *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 1631-1637.
- [73] Cal, P. M. S. D.; Sieglitz, F.; Santos, F. M. F.; Carvalho, C. P.; Guerreiro, A.; Bertoldo, J. B.; Pischel, U.; Gois, P. M. P.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Comm.*, **2017**, *53*, 368-371.
- [74] Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.*, **2014**, *9*, 855-866.

INTRODUCCIÓN

[75] Alcaide, M. M.; Santos, F. M. F.; Pais, V. F.; Carvalho, J. I.; Collado, D.; Pérez-Inestrosa, E.; Arteaga, J. F.; Boscá, F.; Gois, P. M. P.; Pischel, U. *J. Org. Chem.*, **2017**, *82*, 7151-7158.

[76] Pais, V. F.; El-Sheshtawy, H. S.; Fernández, R.; Lassaletta, J. M.; Ros, A.; Pischel, U. *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 6650-6661.

[77] Pais, V. F.; Lineros, M.; López-Rodríguez, R.; El-Sheshtawy, H. S.; Fernández, R.; Lassaletta, J. M.; Ros, A.; Pischel, U. *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 7949.

[78] Pais, V. F.; Lassaletta, J. M.; Fernández, R.; El-Sheshtawy, H. S.; Ros, A.; Pischel, U. *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 7638-7645.

[79] Ntziachristos, V. *Nat. Methods*, **2010**, *7*, 603-614.

[80] Martinić, I.; Eliseeva, S. V.; Petoud, S. *J. Lumin.*, **2016**, iii.

[81] Helmchen, F.; Denk, W. *Nat. Methods*, **2005**, *2*, 932-940.

[82] Kobat, D.; Horton, N. G.; Xu, C. *J. Biomed. Opt.*, **2011**, *16*, 106014-106019.

[83] Yanez, C. O.; Morales, A. R.; Yue, X.; Urakami, T.; Komatsu, M.; Järvinen, T. A.; Belfield, K. D. *PLoS One*, **2013**, *8*, 4-9.

[84] Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *Chem. Rev.*, **2009**, *110*, 2620-2640.

[85] Resch-Gener, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. *Nat. Methods*, **2008**, *5*, 763-775.

[86] Hemmer, E.; Benayas, A.; Légaré, F.; Vetrone, F. *Nanoscale Horiz.*, **2016**, *1*, 168-184.

[87] So, P. T. *Encyclopedia of Life Sciences*, **2002**, 1-5.

[88] Speiser, S. *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 1953-1976.

- [89] Kim, T. G.; Castro, J. C.; Louder, A.; Jiao, J. G.; Hochstrasser, R. M.; Burgess, K.; Topp, M. R. *J. Phys. Chem. A*, **2006**, *110*, 20-27.
- [90] Carlson, J. C. T.; Meimetis, L. G.; Hilderbrand, S. S.; Weissleder, R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 6917-6920.
- [91] Göppert-Mayer, M. *Ann. Phys.*, **1931**, *401*, 273-294.
- [92] Kaiser, W.; Garrett, C. G. B. *Phys. Rev. Lett.*, **1961**, *7*, 229-231.
- [93] Reinhardt, B. A.; Brott, L. L.; Clarson, S. J.; Dillard, A. G.; Bhatt, J. C.; Kannan, R.; Yuan, L.; He, G. S.; Prasad, P.N. *Chem. Mater.*, **1998**, *10*, 1863-1874.
- [94] Kogej, T.; Beljonne, D.; Meyers, F.; Perry, J. W.; Marder, S. R.; Brédas, J. L. *Chem. Phys. Lett.*, **1998**, *298*, 1-6.
- [95] Albota, M.; Beljonne, D.; Brédas, J. L.; Ehrlich, J. E.; Fu, J. Y.; Heikal, A. A.; Hess, S. E.; Kogej, T.; Levin, M. D.; Marder, S. R.; McCord-Maughon, D.; Perry, J. W.; Röckel, H.; Rumi, M.; Subramaniam, G.; Webb, W. W.; Wu, X. L.; Xu, C. *Science*, **1998**, *281*, 1653-1656.
- [96] Rumi, M.; Ehrlich, J. E.; Heikal, A. A.; Perry, J. W.; Barlow, S.; Hu, Z.; McCord-Maughon, D.; Parker, T. C.; Röckel, H.; Thayumanavan, S.; Marder, S. R.; Beljonne, D.; Brédas, J. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 9500-9510.
- [97] Ventelon, L.; Charier, S.; Moreaux, L.; Mertz, J.; Blanchard-Desce, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2001**, *40*, 2098-2101.
- [98] Chung, S. J.; Rumi, M.; Alain, V.; Barlow, S.; Perry, J. W.; Marder, S. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 10844-10845.
- [99] Griesbeck, S.; Michail, E.; Rauch, F.; Ogasawara, H.; Wang, C.; Sato, Y.; Edkins, R.; Zhang, Z.; Taki, M.; Lambert, C.; Yamaguchi, S.; Marder, T. B. *Chem. Eur. J.*, **2019**, 2927.

INTRODUCCIÓN

[100] Chung, S. J.; Kim, K. S.; Lin, T. C.; He, G. S.; Swiatkiewicz, J.; Prasad, P. N. *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 10741-10745.

[101] Colling, J. C.; Poon, S. Y.; Le Droumaguet, C.; Charlot, M.; Katan, C.; Pålsson, L. O.; Beeby, A.; Mosely, J. A.; Kaiser, H. M.; Kaufmann, D.; Wong, W. Y.; Blanchard-Desce, M.; Marder, T. B. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 198-208.

[102] Le Droumaguet, C.; Sourdon, A.; Genin, E.; Mongin, O.; Blanchard-Desce, M. *Chem. Asian J.*, **2013**, *8*, 2984-3001.

[103] Chen, P.; Marshall, A. S.; Chi, S. H.; Yin, X.; Perry, J. W.; Jäkle, F. *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 18237-18247.



2

OBJETIVOS

2

Objetivos**2.1. OBJETIVOS GENERALES**

El objetivo principal de esta memoria de Tesis Doctoral se centra en el diseño, la caracterización fotofísica y la aplicación de moléculas fluorescentes que contienen boro como elemento estructural central. Específicamente el trabajo desarrollado engloba compuestos organoboro como son los ácidos borónicos, utilizados como bloques de construcción, o arilboranos conteniendo ligando quelantes (*N,C*; *N,N*; *N,O*). A pesar de la existencia en la literatura de compuestos relacionados, nuestro principal enfoque se basa en conseguir un ajuste de las propiedades fotofísicas, a través de modificaciones estructurales del esqueleto del ligando, a menudo empleando arilisoquinolinas u otras estructuras tipo organoboro relacionadas, y su modificación electrónica mediante la conveniente sustitución estructural con grupos donadores de electrones.

Cabe destacar que todos los proyectos desarrollados que se muestran en los diferentes capítulos de esta memoria tienen un carácter destacadamente multidisciplinar. Por ello, ha sido necesaria la colaboración de otros grupos de investigación, tanto nacionales como internacionales, para llevar a cabo la consecución de los objetivos específicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo principal anteriormente descrito se puede fragmentar en los siguientes objetivos específicos que a continuación se detallan:

- Diseñar una amplia gama de estructuras moleculares de tipo organoboro, es decir, que en su estructura principal contenga al menos un átomo de boro. Entre estas estructuras organoboro se pueden encontrar en esta memoria:
 - Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), en concreto, los azaborahelicenos. Se tratan de esqueletos compuestos por una serie de anillos aromáticos *orto*-condensados y que, además, contienen entre sus anillos de benceno un átomo de N y otro de B. Éstos proporcionan un carácter flexible en cuanto a transferencia de carga.
 - Las arilisoquinolinas boriladas (BAI). Son estructuras orgánicas heterocíclicas unidas a un átomo de B que, además, presentan fluorescencia, la cual se puede amoldar o ajustar mediante la sustitución de especies donadoras de electrones.
 - Los ácidos borónicos junto a ligando salicildenhidrazona (BASHY). Son conocidos por ser cromóforos con una gran flexibilidad funcional debido a su papel modulable como donador o aceptor de energía.

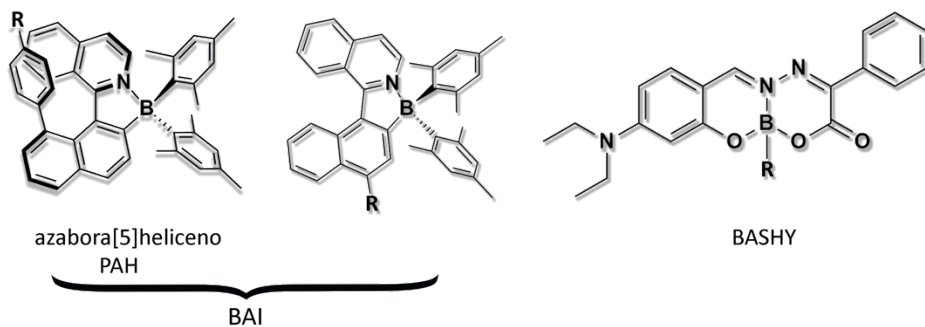


Figura 2.1. Estructuras organoboro diseñadas en esta memoria.

- Sintetizar compuestos de este tipo que presenten las características fotofísicas requeridas para las aplicaciones estudiadas a continuación. Este objetivo se llevará a cabo conjuntamente con colaboradores que ayuden a efectuar la síntesis de estos compuestos de manera eficaz.
- Identificar y analizar las moléculas que tengan las características propias de la fluorescencia, haciendo uso de técnicas espectroscópicas adecuadas para la medida de la absorción UV/vis y la emisión de la fluorescencia, luminiscencia circularmente polarizada (CPL), etc.
- Trabajar en algunas interesantes aplicaciones de estos nuevos fluoróforos como es la bioimagen, utilizando microscopía confocal de fluorescencia, en cooperación con otras universidades.



3

**AZABORA[5]HELICENO.
COLORANTES ORGANOBORO CON
TRANSFERENCIA DE CARGA QUE OFRECEN
UNA EFICIENTE LUZ CIRCULAR POLARIZADA**

3

Azabora[5]helicenos.**Colorantes organoboro con transferencia de carga que ofrecen una eficiente luz circular polarizada****3.1. SINOPSIS**

En este capítulo se presenta el estudio realizado sobre tres estructuras poli aromáticas helicénicas enantiopuras, las cuales están formadas por un esqueleto arilisoquinolinas boriladas. Estos compuestos exhiben un carácter flexible en cuanto a transferencia de carga, rigiéndose por la sustitución del grupo donador de electrones (*p*-metoxifenilo, *p*-*N,N*-dimetilfenilo) en la estructura del heliceno. Además, presentan un rendimiento cuántico de fluorescencia eficiente ($0.13 < \Phi_{\text{fluo}} < 0.30$) y una diferencia notable entre ellas en cuanto a las longitudes de onda de emisión y en los desplazamientos de Stokes. Por último, estas moléculas muestran dicroísmo circular y una significativa luminiscencia circularmente polarizada con factores de disimetría de hasta $4 \cdot 10^{-3}$.

El capítulo está basado en el artículo «***Azabora[5]helicene Charge-Transfer Dyes Show Efficient and Spectrally Variable Circularly Polarized Luminescence.*** Z. Domínguez, R. López-Rodríguez, E. Álvarez, S. Abbate, G. Longhi, U. Pischel y A. Ros. *Chemistry – A European Journal*, **2018**, *24*, 12660–12668».

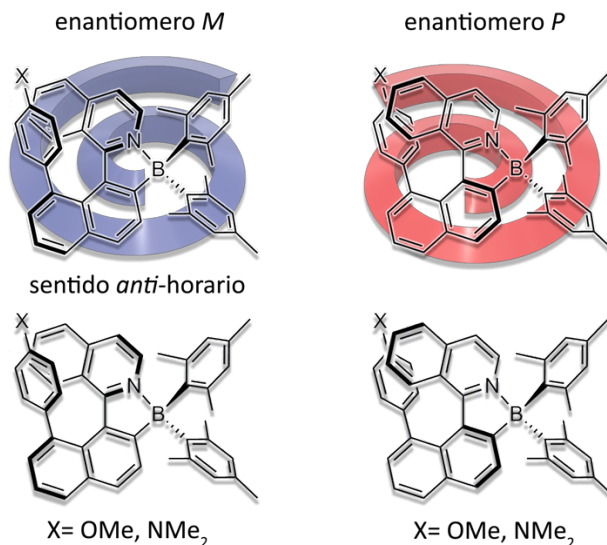


Figura 3.1. Representación de las estructuras helicénicas.

3.2. INTRODUCCIÓN

Hoy en día es de suma importancia el diseño y la síntesis de materiales orgánicos luminiscentes debido a su amplia gama de aplicaciones, como por ejemplo la bioimagen. Como se ha comentado sobre los colorantes organoboro en el Capítulo 1, estos compuestos son cada vez más atractivos para los investigadores, porque poseen una estructura electrónica única y propiedades ópticas interesantes. Todo esto deriva de su conjugación intrínseca $p_{\pi}-\pi^*$ entre el orbital p_{π} vacío del átomo de boro y el orbital π^* del sistema π conjugado¹⁻³. Hay que tener en cuenta que el boro es un ácido de Lewis fuerte lo que le permite unirse a bases de Lewis o especies nucleofílicas, formándose así diferentes organoboro con nuevas propiedades capaces de abordar distintos retos^{4,5}. En los últimos años, se ha empezado a tener mayor interés por los compuestos organoboro tri- y tetracoordinados⁶⁻¹³, algunos de los cuales son bastante atractivos tanto para el diseño de colorantes fluorescentes fotoestables y su uso en bioimagen¹⁴⁻²², como además para su utilización en

sensores²³⁻²⁷. Significativamente algunos de ellos son capaces de mostrar su fluorescencia en estado sólido de manera eficiente y, por tanto, son usados como diodos orgánicos emisores de luz^{7,28-31}.

Los compuestos tetracoordinados, que contienen boro y quelatos π conjugados, también se han puesto de moda en aplicaciones como la creación de materiales optoelectrónicos (incluidos emisores), materiales de transporte electrones de tipo OLED (diodos orgánicos emisor de luz) y de bioimagen. Para la mayoría de estos materiales, el ligando quelato es a menudo un mono-anión para lograr compuestos de boro con carga neutra. Por ello, la función clave del átomo de B es estabilizar el ligando quelato aniónico formando enlaces covalentes con él y disipando las cargas negativas sobre el ligando. Como consecuencia de la quelación del boro, el orbital molecular desocupado más bajo (LUMO) de estos compuestos tetracoordinados se suele localizar en el ligando quelato π conjugado que logrará mejor estabilización al coordinarse con el boro, permitiendo a estos compuestos llegar a ser materiales de transporte electrónico. Sin embargo, el orbital molecular ocupado más alto (HOMO) se localiza en el ligando quelato o en el grupo R unido al boro (dependiendo de la naturaleza de este grupo R). Las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ del quelato o la transición de transferencia de carga del grupo R al quelato son generalmente las responsables de las propiedades luminiscentes de esta clase de moléculas.

En nuestro grupo de investigación se ha experimentado previamente con colorantes arilisoquinolinas boriladas (BAI), que han resultado ser fluoróforos *N,C*-quelato fuertemente emisores, solvatocrómicos y capaces de transferir carga con dos fotones. Por lo tanto, estos compuestos tienen las condiciones idóneas para ser aplicados en bioimagen^{19,20,32}.

Como se mencionó en el Capítulo 1 de esta memoria al presentar las familias de colorantes orgánicos, en concreto al tratar sobre los compuestos hidrocarburos policonjugados o hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), existe dentro de

AZABORA[5]HELICENOS

esta subfamilia un grupo de compuestos denominados «**helicenos**», los cuales presentan un atractivo especial. Las estructuras helicénicas se caracterizan, como norma general, por la existencia de una serie de anillos aromáticos *orto*-condensados en su esqueleto estructural. Cabe mencionar que cuando el sistema está formado por más de cuatro ciclos, el compuesto no consigue la planicidad. Esto se debe bien a las interacciones que surgen entre los anillos aromáticos terminales o bien, si se diera el caso, a aquellas entre los sustituyentes existentes en ellos. Debido a ello el compuesto adopta una estructura helicoidal, disponiendo así los anillos terminales en distinto plano y apareciendo la quiralidad helicoidal característica en estas estructuras.

Los helicenos son quirales y, por ende muestran actividad óptica y se podrán aislar sus enantiómeros cuando éstos presenten una barrera energética de interconversión suficientemente grande. Estos enantiómeros utilizan una notación configuracional concreta, la cual se determina al observar la molécula desde el anillo aromático que se dispone más cercano al observador hasta el extremo más alejado. De esta forma Cahn, Ingold y Prelog, en 1966, establecieron la base de la nomenclatura helicoidal. Así, cuando el sentido de giro originado es el mismo que el de las agujas del reloj, la configuración será «*P* o *PLUS*»; sin embargo, si el sentido es el contrario al de las agujas del reloj será «*M* o *MINUS*» (ver la representación de ambas nomenclaturas en la Figura 3.2). Esto es congruente con los resultados que proporcionan las espectroscopías ORC (*Optical Refurbishment Center*) y CD (*Circular Dichroism*), las cuales indican que existe una relación entre la configuración absoluta y la quiralidad, es decir, los (*P*)-helicenos son dextrógiros, mientras que (*M*)-helicenos son levógiros³³⁻⁴⁰. Asimismo, es común encontrarse que esta nomenclatura de los helicenos venga acompañada de un dígito “*n*” entre corchetes [*n*], antes del nombre del heliceno. Por tanto, el hexaheliceno es [6]heliceno. Este dígito indica la cantidad

o conjunto de anillos, tanto aromáticos como no, que conforman dicha estructura.

Los carbohelicenos están formados solamente por anillos de benceno en su esqueleto principal, mientras que los heterohelicenos contienen al menos un heteroátomo en su esqueleto⁴¹. En cuanto a su nomenclatura, si existen anillos heteroaromáticos como tiofenos, pirroles o piridinas, pasan a llamarse tia[*n*]heliceno, aza[*n*]heliceno o oxa[*n*]heliceno, respectivamente, para mayor simplicidad. En este capítulo los compuestos estudiados son de tipo azabora[*n*]helicenos, es decir, helicenos que contienen entre los anillos de benceno un átomo de N y otro de B. También es posible encontrarse dobles helicenos, los cuales están compuestos por dos estructuras helicénicas fusionadas, que pueden ser iguales o diferentes⁴¹; no obstante, este tipo de estructuras no está vinculada a este trabajo de Tesis Doctoral.

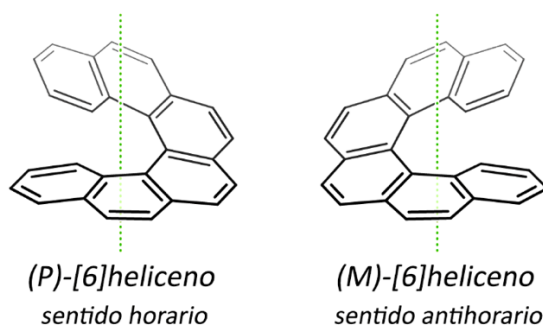


Figura 3.2. Dos formas enantiómeras del [6]heliceno.

Los primeros helicenos sintéticos vinieron de la mano de J. Meisenheimer y K. Witte quienes obtuvieron un hetero[5]heliceno⁴² en el año 1903 que consistía concretamente en el producto de reducción del 2-nitronaftaleno. Además, en la bibliografía se puede encontrar la síntesis del [5]heliceno por R. Weitzanböck y A. Klingler⁴³ en 1918, y la síntesis del carbo[6]heliceno (hexaheliceno) realizada por M. S. Newman y D. Lednicer⁴⁴⁻⁴⁶ en la década de los 50. Esta última se basaba en el cierre de dos anillos centrales mediante ciclación tipo Friedel-Crafts de

AZABORA[5]HELICENOS

compuestos de ácido carboxílico. Desde entonces, científicos de todo el mundo han desarrollado numerosos métodos que han dado lugar a la preparación de una gran variedad de helicenos, como carbo-, hetero- y metalo-helicenos⁴⁷⁻⁵⁷. Aunque las primeras síntesis fueron relativamente tempranas, no fue hasta la década de los 90, cuando se produjo un progreso significativo debido a una nueva metodología basada en reacciones de tipo Diels-Alder⁵⁸. Esto permitió la elaboración de una amplia variedad de estas estructuras a mayor escala⁵⁹⁻⁶⁶. Este impulso fue promovido por las interesantes propiedades ópticas y electrónicas que estos particulares compuestos poseen.

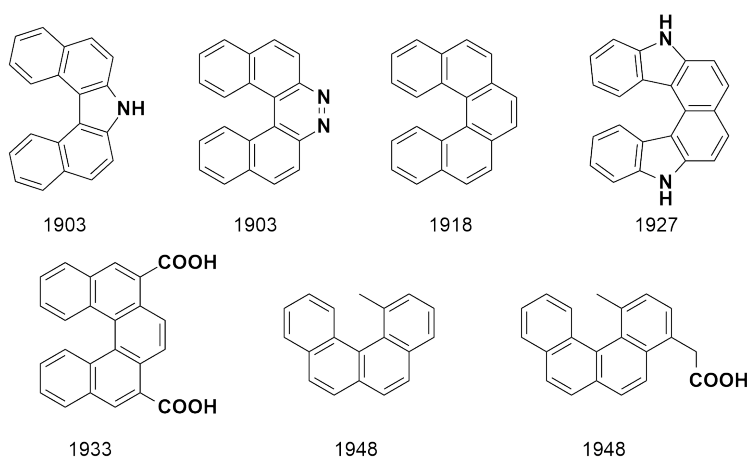


Figura 3.3. Algunos helicenos sintetizados antes de 1950.

Antes de la publicación del artículo que se presenta en este capítulo sólo se encontró en la literatura un trabajo cuyos compuestos del tipo azabora[n]helicenos mostraban efectos significativos de luminiscencia circularmente polarizada (CPL)⁹⁵ (ver Figura 3.4). Se trata de sistemas de arilpiridina N,C -quelatadas, donde su máximo de emisión de fluorescencia podía ajustarse por la longitud del heliceno. Conseguían tener un heliceno con $n=10$ cuyo máximo de absorción se encontraba a aproximadamente 480 nm. Como se verá en este capítulo, usando un fragmento de isoquinolina en lugar de una

piridina, las propiedades de transferencia de carga de los colorantes se vuelven mucho más pronunciadas.

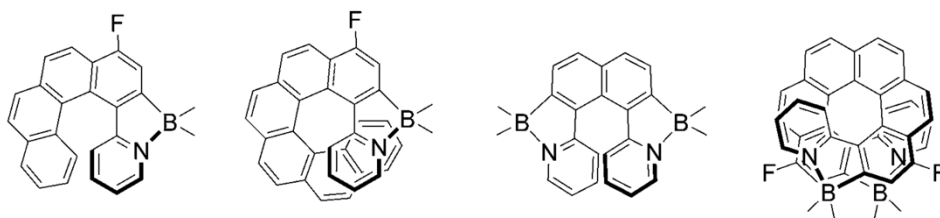


Figura 3.4. Estructuras tipo azabora[n]helicenos publicadas anteriormente a las presentadas en este capítulo.

Como se menciona anteriormente, la característica más interesante de los helicenos tal vez sea que se tratan de compuestos quirales, aun no presentando centros estereogénicos, puesto que poseen un eje quiral. Al mismo tiempo, son estructuras con buenas propiedades como π -dadores, y al acompañarlos con adecuados compuestos π -aceptores dan lugar a importantes complejos de transferencia de carga^{44,69-76}. La combinación intrínseca de las propiedades quirales y una conjugación π prolongada proporciona valores interesantes de rotación óptica (OR), espectros de disroísmo electrónico circular (ECD) intensos^{77,78}, y una luminiscencia circularmente polarizada (CPL) importante^{79,80}. Todas estas características hacen prever las muchas aplicaciones que estos helicenos puede tener: como los interruptores moleculares sensibles al estímulo ambiental, actividad en catálisis asimétrica, el reconocimiento molecular y los dispositivos electrónicos orgánicos. Otra propiedad a tener en cuenta es la mejora en la solubilidad de los helicenos comparada con las moléculas PAHs planas, solubilidad que puede ser aún más mejorada con grupos funcionales, como son los alquilo y grupo alcoxi⁶⁰.

Todos los motivos descritos anteriormente hacen que los helicenos sean un tipo de molécula de interés con una estructura helicoidal única y una quiralidad inherente. Significativamente han alcanzado una gran variedad de aplicaciones

en áreas como la catálisis asimétrica, nanomaquinaria o maquinaria molecular, reconocimiento molecular y autoensamblaje, ciencias de los materiales, etc. Sin embargo, aún queda un largo camino para las muchas mejoras tanto en encontrar síntesis más eficientes de estos compuestos, como en disminuir el coste de sus funcionalizaciones. En resumen, este campo de la Ciencia está en auge, y se cree que cada vez adquirirá mayor protagonismo en un futuro cercano.

3.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El procedimiento experimental empleado en este apartado se encuentra explicado más detalladamente en la información adicional del propio manuscrito publicado. En este apartado, se describirán brevemente los aspectos relacionados con el enfoque experimental.

Inicialmente se diseñaron y sintetizaron una serie de tres derivados helicénicos (**HEL-D**) que contienen diferentes fragmentos de arilo en la posición 8 del fragmento naftalénico (ver Figura 3.5). Estos derivados de heliceno tienen en común un átomo de N y otro de B, además de contener cinco anillos contiguos. Debido a estas características estructurales la denominación conjunta de estos compuestos es «azabora[5]heliceno». Como se ha mencionado anteriormente, la única diferencia entre ellos reside en los fragmentos de arilo, donde el primer heliceno a estudiar no está sustituido en ninguna posición del arilo (**HEL-1**), en el segundo se encuentra un grupo metoxi (MeO) en la posición *para* de dicho arilo (**HEL-2**) y, por último, el tercero presenta un grupo *N,N*-dimetilamina (NMe₂), también en la misma posición *para* (**HEL-3**). Asimismo, se puede observar que el átomo de boro también está unido a dos grupos mesitilos (Mes), que como se explica en el Capítulo 1 de esta memoria, sirven para dar estabilidad, tratándose de una protección estérica para evitar la

descomposición en el aire y/o humedad existente. Con estas diferencias estructurales en los helicenos diseñados, se podrán hacer comparaciones y observar la influencia del grupo donador de electrones que contenga la estructura.

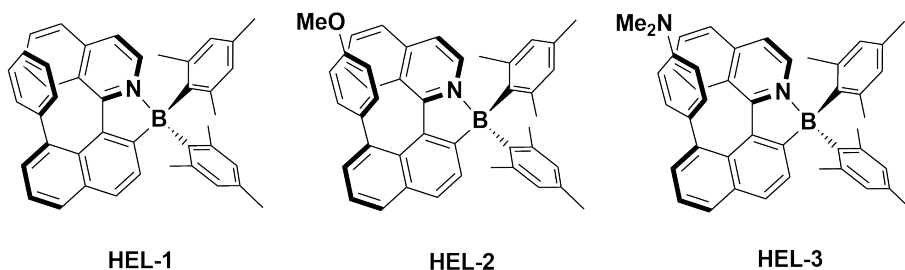


Figura 3.5. Estructuras de los derivados azabora[5]heliceno en su forma enantiomérica *M*.

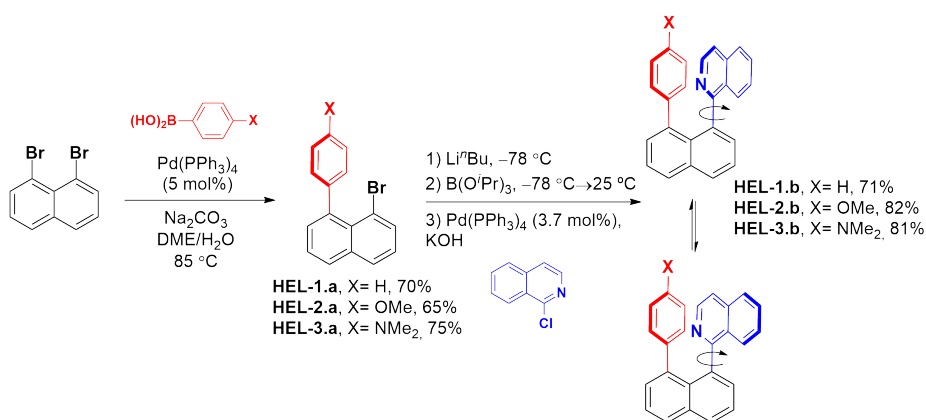
3.4. SÍNTESIS

Los compuestos helicénicos utilizados en este proyecto fueron sinterizados en colaboración con el Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Sevilla. A continuación, se describirá brevemente la síntesis de los compuestos diseñados.

La secuencia sintética comienza con una reacción de acoplamiento de Suzuki entre el 1,8-dibromonaftaleno con diferentes ácidos borónicos, dependiendo del heliceno deseado. Se obtienen así los productos de la monosustitución arílica correspondiente a los intermedios **HEL-1.a**, **2.a** y **3.a** con unos moderados rendimientos de alrededor de 65–75 %. Tras una litiación y, posteriormente una borilación en la posición sustituida por el bromo, se finaliza la síntesis con una segunda reacción de acoplamiento de Suzuki del correspondiente derivado de 1-cloroisoquinolina. Con estos pasos se llega a los intermedios quirales **HEL-1.b**, **2.b** y **3.b** con rendimientos del 71–81 %. Como se puede observar en el Esquema

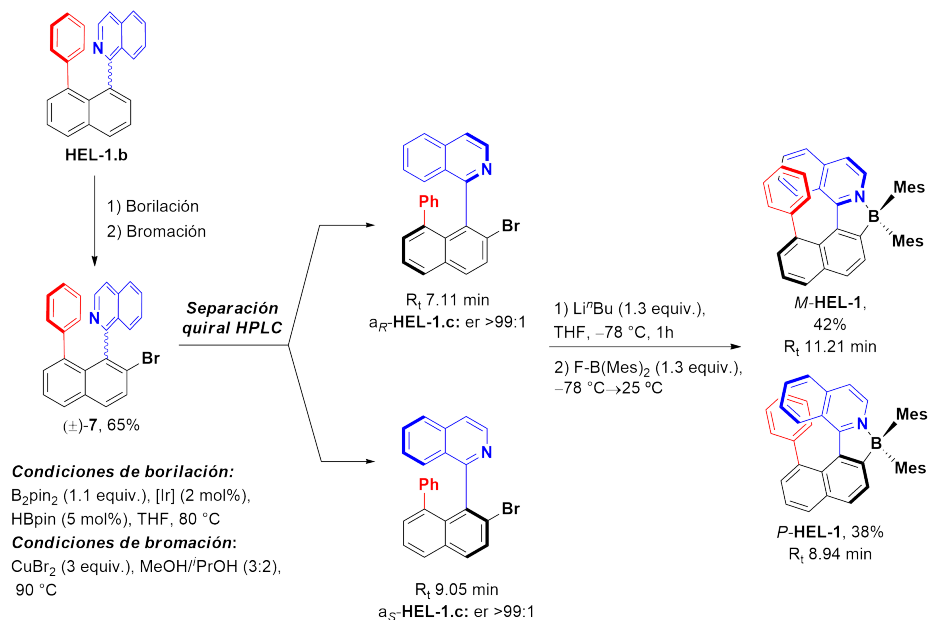
AZABORA[5]HELICENOS

3.1, los compuestos implicados en la última etapa poseen quiralidad axial, permitiéndose a temperatura ambiente la libre rotación alrededor del eje isoquinolina-naftaleno, gracias a la baja barrera energética de racemización.



Esquema 3.1. Síntesis de arylisoquinolinas **HEL-1.b**, **2.b** y **3.b**.

En el Esquema 3.2 se muestra la ruta sintética final para llegar a obtener el heliceno **HEL-1** en sus dos formas enantiopuras desde la arylisoquinolina **HEL-1.b**. Se continúa transformando la arylisoquinolina en su bromo derivado axialmente quiral **HEL-1.c**, siguiendo la metodología de borilación y bromación indicada en el esquema y en bibliografía^{19,81}, con un rendimiento del 65 %. El bromo derivado quiral se separa por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una columna quiral semipreparativa, obteniéndose los enantiómeros a_R-**HEL-1.c** y a_S-**HEL-1.c** con una relación enantiomérica (*er*) >99:1. Para finalizar esta ruta sintética se utiliza una secuencia de reacción de litiación y borilación¹⁹, llegando a las formas enantioméricas puras *M*-**HEL-1** y *P*-**HEL-1** con modestos rendimientos del 38–42 % y un (*er*) >99:1. Como se puede observar en la Figura 3.6, la configuración absoluta del heliceno se basa en la estructura cristalina obtenida en el diagrama ORTEP (*Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot*) de nuestro compuesto sintetizado a_S-**HEL-1.c**.



Esquema 3.2. Preparación de las formas enantiopuras *M* y *P* del azabora[5]heliceno HEL-1.

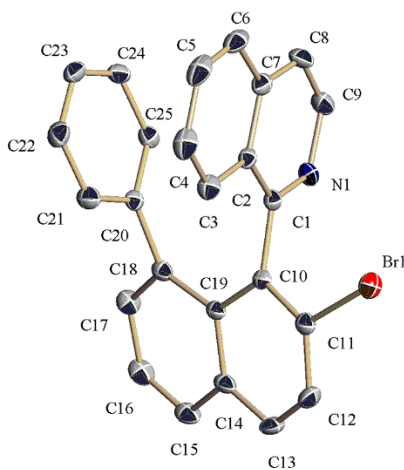
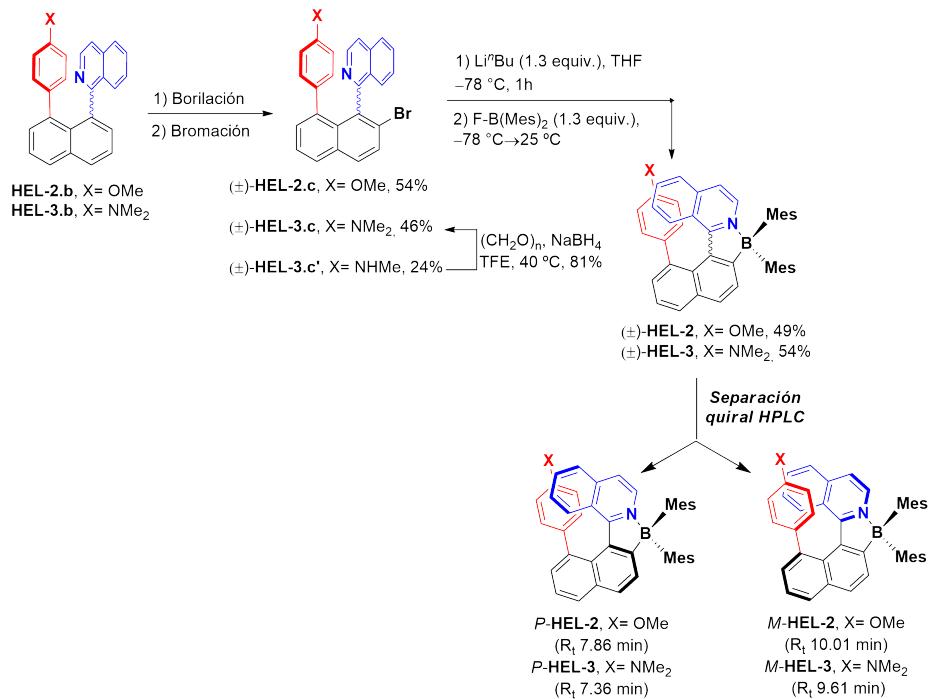


Figura 3.6. Estructura cristalina del heliceno a_S-HEL-1.c.

En cuanto a la síntesis final de los helicenos HEL-2 y HEL-3, se intentó inicialmente su preparación de la misma manera que HEL-1. Sin embargo, en

AZABORA[5]HELICENOS

uno de los pasos sintéticos, concretamente en la litiación, se obtuvieron los helicenos iniciales (**HEL-2.b** y **HEL-3.b**) parcialmente racemizados debido a una incontrolada subida de temperatura. Por ello se cambió la estrategia sintética, trabajando primero con la mezcla racémica de **HEL-2.c** y **HEL-3.c** respectivamente y, a continuación realizando la separación cromatográfica de los enantiómeros. Desde la mezcla racémica del derivado con grupo metoxi **HEL-2.b**, se sigue también la metodología de borilación y bromación anteriormente mencionada, consiguiendo el bromoderivado axialmente quiral **HEL-2.c** con un rendimiento del 54 %. Para el caso del derivado con grupo dimetilamino **HEL-3.b**, se tuvieron que optimizar las condiciones de bromación debido a la aparición de una indeseada reacción de desmetilación parcial **HEL-3.c'**, obteniéndose el bromoderivado deseado **HEL-3.c** con un rendimiento del 46 %. El compuesto no deseado **HEL-3.c'** se transformó en el producto objetivo mediante una aminación reductora. Finalmente, se utiliza la secuencia de litiación y borilación, produciendo los helicenos racémicos **HEL-2** y **HEL-3**, con rendimientos moderados 49–54 %. Estos racematos se separaron por HPLC con columna quiral semipreparativa, obteniéndose finalmente las dos formas enantiopuras de ambos helicenos (ver Esquema 3.3). En la Figura 3.7 se observa el diagrama ORTEP de (\pm)-**HEL-2**, omitiendo los átomos de H para mayor claridad. La estructura cristalina obtenida demuestra la quiralidad helicoidal del compuesto obtenido en este proyecto.



Esquema 3.3. Preparación de las formas enantiopuras *M* y *P* del azabora[5]heliceno HEL-2 y HEL-3.

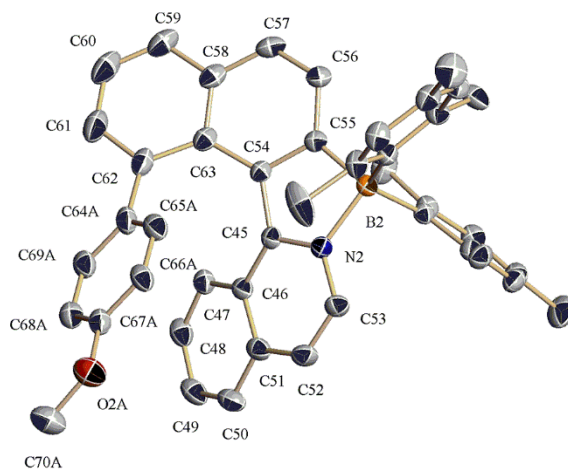


Figura 3.7. Estructura cristalina del heliceno (±)-HEL-2.

3.5. PROPIEDADES FOTOFÍSICAS

Se midieron las propiedades fotofísicas de ambos enantiómeros para los casos de los tres derivados azabora[5]helicenos en diferentes disolventes, uno apolar (tolueno) y otro polar (acetonitrilo). Gracias a esto se pudo estudiar la influencia de las diferentes estructuras electrónicas en los helicenos diseñados. Para estas medidas se utilizaron técnicas como la espectroscopía de absorción UV/vis, la espectroscopía de emisión de fluorescencia y el tiempo de vida con recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente (*time-correlated single photon counting*).

En la Tabla 3.1, se recogen todos los datos relacionados con estas medidas. Como se puede observar, tanto para el **HEL-1** (compuesto helicénico sin sustituyentes) como para el **HEL-2** (compuesto sustituido con el grupo MeO), las bandas que aparecen en los espectros de absorción UV/vis aparecen a λ_{\max} en torno a los 400 nm tanto en el disolvente polar como apolar. No obstante, si nos fijamos en el compuesto que contiene el grupo -NMe₂ (**HEL-3**), se observan dos bandas en su espectro de absorción, destacando que la banda a 400 nm aparece en este caso como una especie de «hombro» y contiene un menor coeficiente de absorción molar que en los compuestos anteriores.

Simultáneamente, se observa un desplazamiento batocrómico de esta banda al comparar la influencia del sustituyente donador de electrones en el fenilo, es decir, al comparar la eficacia de la transferencia de carga. Expresado de otro modo, para el **HEL-1** existe una diferencia de 19 nm hacia el rojo comparada con el **HEL-3**, para ambos disolventes de estudio. Este efecto que se está aludiendo se hace aún más significativo en los espectros de emisión de fluorescencia, donde se observa hasta 91 nm de desplazamiento hacia el rojo. El efecto de batocromía se hace más drástico cuando se trata del compuesto **HEL-3**, que es quien contiene el donador de electrones más potente. Mientras que cuando

comparamos el **HEL-1** con el **HEL-2** se produce un desplazamiento batocrómico bajo, de sólo 7–11 nm.

Tabla 3.1. Propiedades fotofísicas de los derivados **HEL-1**, **HEL-2** y **HEL-3** en diferentes medios, como tolueno y acetonitrilo.

	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm) ^[a] [ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)]	$\Delta\nu$ (cm^{-1}) [b]	$\lambda_{\text{fluo, max}}$ (nm) ^[c]	Φ_{fluo} [d]	τ (ns) ^[e]	$10^7 \times k_r$ (s^{-1}) ^[f]	$10^7 \times k_{nr}$ (s^{-1}) ^[g]
Tolueno							
HEL-1	414 [8 200]	4000	495	0.29	4.8 (89%)	6.0	15
HEL-2	420 [7 400]	3900	502	0.30	7.7 (81%)	3.9	9.1
HEL-3	343 [13 100] 433 [4 000]	6000	586	0.13	19.9 (86%)	0.65	4.4
Acetonitrilo							
HEL-1	411 [7 600]	4300	499	0.28	6.4 (85%)	4.4	11
HEL-2	418 [7 000]	4300	510	0.29	9.9 (92%)	2.9	7.2
HEL-3	339 [12 500] 430 [3 400]	8500	≈ 680 ^[h]	<0.005	[i]		

[a] Máximo de absorción UV/vis (>400 nm), entre corchetes se muestra el coeficiente de absorción molar (ϵ) en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. [b] Desplazamiento de Stokes. [c] Máximo de emisión de fluorescencia. [d] Rendimiento cuántico de fluorescencia, con un error del 20 %. Se midió con 4-amino-*N*-propil-1,8-naftalimida ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.48$ en acetonitrilo)⁸² como referencia y corregido para las diferencias entre los índices de refracción de los disolventes usados. [e] Tiempo de vida media de la fluorescencia en nanosegundos medida por recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente, con un error del 5 %. Se aplicó un ajuste biexponencial para todos los compuestos sintetizados en todos los medios estudiados. Sólo está mostrado el componente del decaimiento principal. [f] Ratio de constante de velocidad desactivación radiante; $k_r = \Phi_{\text{fluo}} / \tau_f$. [g] Ratio de constante de velocidad de desactivación no-radiante; $k_{nr} = (1 - \Phi_{\text{fluo}}) / \tau_f$. [h] **HEL-3** mostró una pequeña señal de fluorescencia (a 500nm) de una impureza mucho menor (no detectable en HPLC-CSP). [i] No determinado debido a su baja fluorescencia.

AZABORA[5]HELICENOS

La reseña marcada en la Tabla 3.1, hace alusión a que el compuesto **HEL-3** es prácticamente no fluorescente en el medio más polar; incluso, puede observarse en la Figura 3.8 que la señal de emisión de fluorescencia de este compuesto en acetonitrilo está ampliada x50 con respecto a las demás. Adicionalmente, se muestran unos desplazamientos de Stokes elevados, acrecentados para el **HEL-3**, lo que confirma la implicación de los fenómenos de transferencia de carga en las propiedades fotofísicas que se observan en estos compuestos helicénicos.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia se encuentran en torno a 0.3 para los helicenos **HEL-1** y **HEL-2** en ambos disolventes. En cuanto al **HEL-3**, este dato disminuye hasta 0.13 en tolueno, mientras que en acetonitrilo su fluorescencia es prácticamente nula como se mencionó anteriormente y, por tanto, su rendimiento cuántico de fluorescencia también lo es. Esta disminución se prevé en este tipo de fluoróforos con transferencia de carga. Se debe a una eficiente desactivación no radiante desde estados de emisión energéticamente más bajos, por ejemplo, dándose una conversión interna o una transferencia de carga inversa. A este hecho se le conoce como *energy-gap law*¹⁹⁻²¹. Además, como se ha comentado anteriormente, es tal la estabilización energética del compuesto **HEL-3** en acetonitrilo que no se observan emisiones.

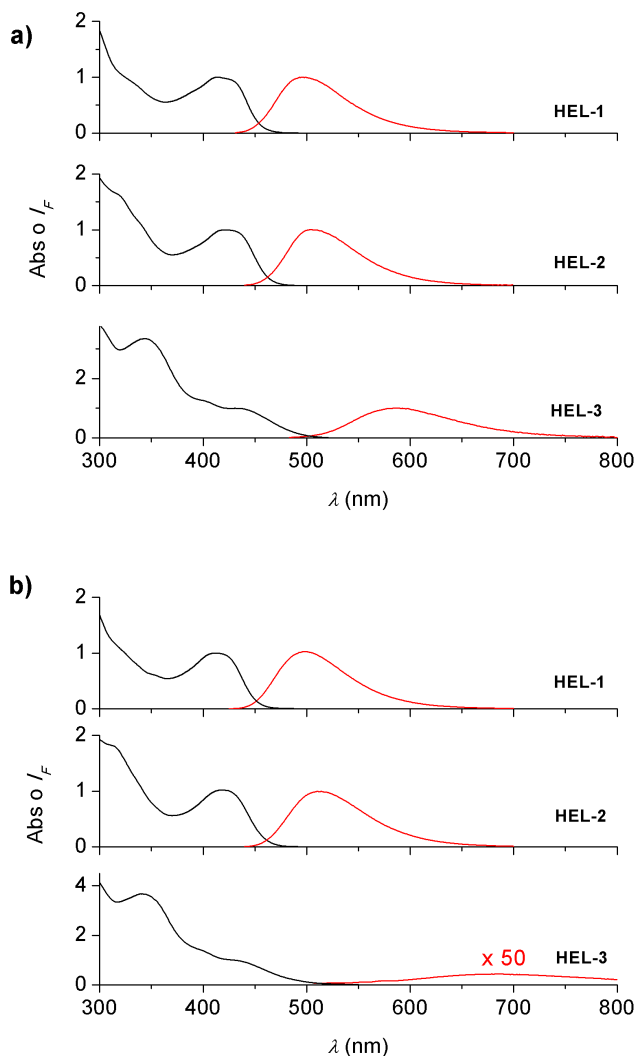


Figura 3.8. Espectros de absorción UV/vis (color negro) y de fluorescencia (color rojo) de los helicenos **HEL-1**, **HEL-2** y **HEL-3** en tolueno (a) y en acetonitrilo (b).

Los valores de los tiempos de vida de fluorescencia de los helicenos **HEL-1** y **HEL-2** obtenidos fueron de 4.8–7.7 ns en el disolvente apolar (tolueno), y de 6.4–9.9 ns en el polar (acetonitrilo) respectivamente; es decir, el tiempo de vida más largo correspondería al compuesto sustituido con el grupo MeO. No obstante, se obtuvo un valor de tiempo de vida considerablemente más largo, de 19.9 ns, para el compuesto **HEL-3** en tolueno. No se consiguió la determinación de dicha

AZABORA[5]HELICENOS

medida en acetonitrilo para este compuesto ya que no presenta apenas fluorescencia (ver la reseña [i] en la Tabla 3.1).

En la Figura 3.8, se pueden observar los espectros de absorción UV/vis (color negro) y de emisión de fluorescencia (color rojo) de los helicenos. La concentración de los helicenos a estudiar fue de 10–30 μM . Además, los espectros de emisión están normalizados para visualizar mejor el efecto referido a los rendimientos cuánticos. Hay que resaltar, como se expuso anteriormente, que el espectro de emisión del compuesto **HEL-3** en acetonitrilo se encuentra ampliado x50, debido a su baja o prácticamente nula fluorescencia.

3.6. PROPIEDADES QUIRÓPTICAS

Se midieron las propiedades quirópticas de todos los enantiómeros obtenidos correspondientes a los azabora[5]helicenos estudiados en este capítulo mediante la espectroscopía de dicroísmo circular electrónico (ECD), en tolueno como disolvente. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con la Universidad de Brescia, en Italia.

A continuación, se describe los resultados obtenidos para ambos tipos de enantiómeros, *M* y *P*. Se puede observar en las Figuras 3.9 y 3.10 que tanto en los espectros de dicroísmo circular (ECD) como en los de luminiscencia circularmente polarizada (CPL) se obtienen imágenes especulares prácticamente perfectas para ambas formas enantioméricas. Por ello, y para simplificar la exposición de estos resultados, se muestra sólo una descripción detallada para uno de los enantiómeros, en este caso, la forma *M*.

Así pues, en el espectro de ECD del *M*-**HEL-1** (ver espectros de color negro en la Figura 3.8) se observan unas bandas positivas con máximos a 298 nm ($\Delta\epsilon = 11 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y a 430 nm ($\Delta\epsilon = 5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), y una banda negativa con un máximo a

317 nm ($\Delta\epsilon = -8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Con esta información se llega a un nuevo parámetro llamado «factor de disimetría» con $|g_{\text{abs}}| = 7 \cdot 10^{-4}$, correspondiente a la banda de mayor longitud de onda, en este caso la banda con máximo a 430 nm. Este factor de normalización denominado «factor g », se define como el cociente entre la diferencia de absorbancia de los componentes derecha e izquierda de la luz circularmente polarizada, dividida por la absorción total⁸³. Además, este coeficiente se puede expresar en función de la absorptividad molar como se muestra en la ecuación 3.1. Los valores del factor g en ECD suele ser del orden de 10^{-1} a 10^{-2} .

$$g = \frac{\Delta A}{A} = \frac{\Delta\epsilon}{\epsilon}$$

Ecuación 3.1. Fórmula para el cálculo el factor g de disimetría

Para el heliceno *M*-**HEL-2**, las bandas positivas aparecen a 298 nm ($\Delta\epsilon = 18 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y a 347 nm ($\Delta\epsilon = 8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), mientras que se observa una negativa a 320 nm ($\Delta\epsilon = -8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y otra muy débil a 452 nm ($\Delta\epsilon$ aproximadamente $1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El factor de disimetría correspondiente a la banda obtenida a una longitud de onda de 347 nm es de $1.1 \cdot 10^{-3}$, mientras que el valor para 452 nm es de $5.6 \cdot 10^{-4}$. Por último, los resultados obtenidos para el *M*-**HEL-3**, muestran bandas positivas a 303 nm ($\Delta\epsilon = 28 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 392 nm ($\Delta\epsilon = 13 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), mientras que la banda negativa surge a 458 nm ($\Delta\epsilon = -6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), siendo el factor de disimetría para la primera transición $|g_{\text{abs}}| = 2.0 \cdot 10^{-3}$ a 458 nm. Se puede observar que el signo de la banda de mayor longitud de onda, es decir, la que corresponde a la primera transición, se invierte cuando se comparan los espectros de ECD de los enantiómeros correspondientes a **HEL-1**, **HEL-2** y **HEL-3**. Este cambio de signo observado se confirma mediante los cálculos de densidad teórica funcional (TD-DFT) de su fuerza de rotación, los cuales se discuten en el próximo apartado.

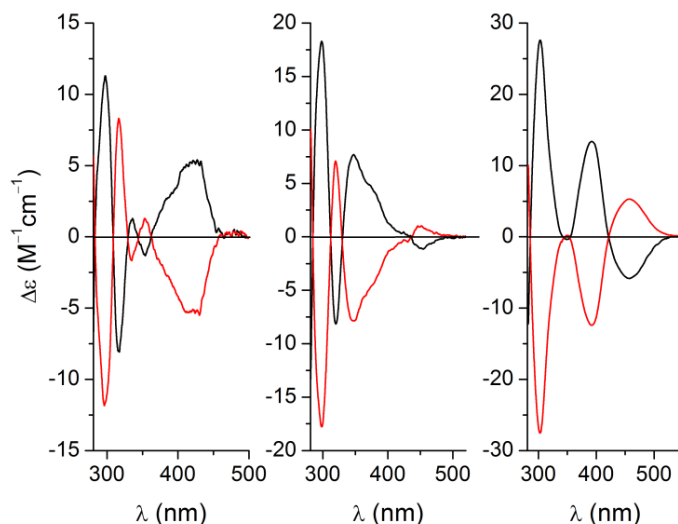


Figura 3.9. Espectros de dicroísmo circular (ECD) de los helicenos estudiados en tolueno: **HEL-1** (izquierda), **HEL-2** (medio) y **HEL-3** (derecha). El enantiómero *M* corresponde al espectro de color negro y el *P* al de color rojo.

Los espectros de luminiscencia circularmente polarizada (CPL) obtenidos (Figura 3.10) también son imágenes especulares para ambos enantiómeros de nuestros tres helicenos de estudio. La concentración utilizada de los helicenos para estos experimentos es de 250–400 μM . En el espectro de CPL del **HEL-1** se alcanza un máximo a 480 nm, proporcionando un factor de disimetría de $|g_{\text{lum}}| = 2.5 \cdot 10^{-4}$. Para el **HEL-2**, se observa un espectro mucho más intenso, encontrándose el máximo en 500 nm y un valor en el factor de disimetría de $|g_{\text{lum}}| = 9.5 \cdot 10^{-4}$. Coincidiendo con las medidas espectroscópicas de emisión anteriormente proporcionadas en la Tabla 3.1, el heliceno **HEL-3** muestra señales con un gran desplazamiento batocrómico, apareciendo el máximo aproximadamente a 590 nm y un factor de disimetría de $3.5 \cdot 10^{-3}$. Estos resultados pueden ser comparados con las cifras encontradas en otros trabajos con estructuras helicénicas⁸⁴⁻⁸⁹. En estudios recientes, se ha confirmado que estructuras helicoidales distorsionadas tipo BODIPY aumentan su carácter de transferencia de carga del estado emisor, produciendo factores de disimetría altos como consecuencia de un momento dipolo de transición eléctrica reducida⁹⁰. Por

tanto, esta comparación confirma la calidad de los valores esperados en los helicenos estudiados en este capítulo, que abarca valores de $|g_{\text{abs}}|$ de aproximadamente un orden de magnitud cuando se comparan **HEL-1** con **HEL-3**.

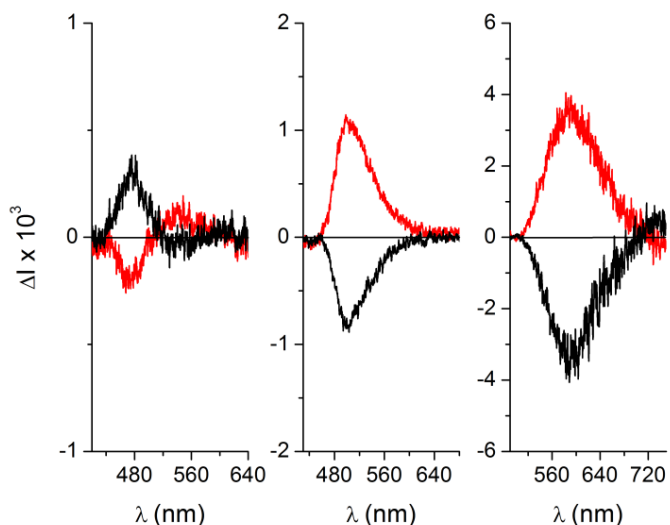


Figura 3.10. Espectros de luminiscencia circularmente polarizada (CPL) de los helicenos estudiados en tolueno: **HEL-1** (izquierda), **HEL-2** (centro) y **HEL-3** (derecha). El enantiómero *M* corresponde al espectro de color negro y el *P* al de color rojo. Los espectros están normalizados para que el valor ΔI del máximo de emisión refleje directamente el valor $|g_{\text{abs}}|$.

Al comparar los valores de los factores de disimetría $|g_{\text{abs}}|$ obtenidos con los de otros helicenos y helicenoides de la bibliografía⁹¹, se puede concluir que nuestros helicenos se encuentran en el rango de los observados para $[n]$ helicenos pequeños, es decir, con valores de n comprendidos entre 4 y 6. Igualmente se puede afirmar esto para los valores de $|g_{\text{lum}}|$ en los helicenos **HEL-1** y **HEL-2**, mientras que para el valor en **HEL-3** se trata del más alto observado en este tipo de CPL-SOM (luminiscencia circular polarizada para moléculas orgánicas simples). Si se compara la relación que existe entre ambos factores $g_{\text{lum}}/g_{\text{abs}}$ de nuestros compuestos, se observa que para el **HEL-1** es de 0.36 y es similar a los datos observados para [4] y [5]helicenos⁹¹. De la misma manera, para **HEL-2** y **HEL-3** ofrecen valores de 1.70 y 1.75, respectivamente, siendo

AZABORA[5]HELICENOS

estos valores atípicos en comparación con los observados en bibliografía (ver Figura 3.11). Para el **HEL-2**, esta elevada relación es debida a que la banda de ECD es muy débil para la transición energética más baja a la longitud de onda de 452 nm (ver Figura 3.9). Para el **HEL-3**, estos resultados tan pronunciados se deben principalmente a su estructura electrónica y, además, a su evidente carácter de transferencia de carga.

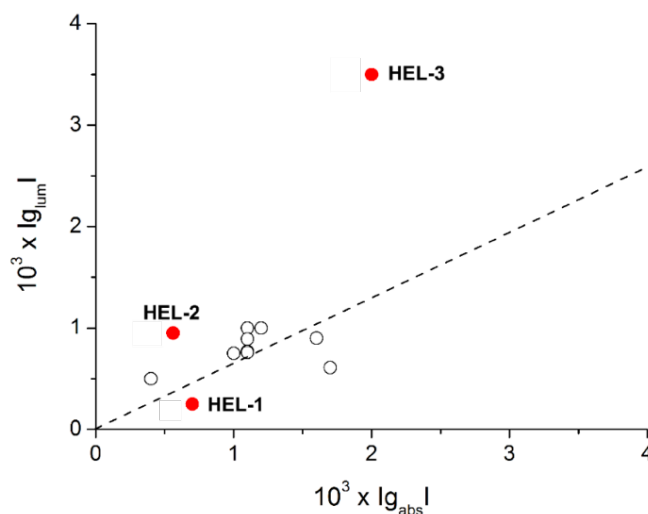


Figura 3.11. Gráfico de g_{abs} frente g_{lum} de [4] y [5]helicenos (puntos en blanco)⁹¹ y, además, de los helicenos **HEL-1**, **HEL-2** y **HEL-3** (puntos rojos). La recta de regresión corresponde a sólo los datos de la bibliografía.

Además, como ocurre en los espectros de dicroísmo circular, los signos de la banda de emisión para la primera banda de transición de ambos enantiómeros se invierten cuando se compara **HEL-1** con **HEL-2** y **HEL-3**. Se observa igualmente que este signo coincide con el signo de la señal proporcionada en el espectro de ECD para la banda con mayor longitud de onda. Esto concuerda con que la transición de más baja energía en la absorción y la emisión sean similares⁹². En el caso de los fluoróforos con transferencia de carga, dicha relación no se espera debido a que el estado excitado que fue poblado por la absorción, y el estado de emisión son significativamente diferentes (como se observa en la Tabla 3.1 con unos desplazamientos de Stokes elevados). Sin embargo, a pesar de esto,

los compuestos estudiados en este capítulo con propiedades quirópticas parece que se produce una correspondencia en los signos ECD y CPL de la primera transición.

3.7. CÁLCULOS DE DENSIDAD TEÓRICA FUNCIONAL

Se determinaron los cálculos teóricos de densidad funcional (DFT) y los teóricos de densidad dependientes del tiempo (TD-DFT), con el fin de obtener información adicional sobre la fotofísica de los colorantes de este capítulo.

Como se puede observar en la Figura 3.12, para el compuesto **HEL-1** en su forma enantiomérica *M* se obtienen dos conforméros diferentes, los cuales discrepan en la orientación de sus grupos mesitilos. Sin embargo, la conformación energéticamente más estable es **HEL-1x**, ya que es el principal contribuyente, con un 97%.

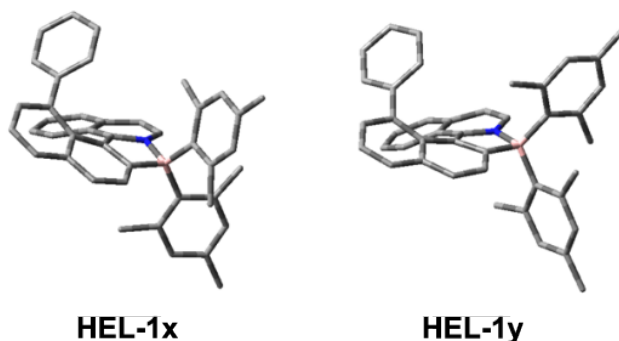


Figura 3.12. Conforméros obtenidos para el *M*-HEL-1.

Por otro lado, el **HEL-2** ofrece mayor libertad conformacional debido a la rotación del grupo MeO que contiene, aunque solo produce una diferenciación energética menor ($0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$). Observando los cuatro conforméros **HEL-2w**, **HEL-2x**, **HEL-2y** y **HEL-2z** que se muestran en la Figura 3.13, se puede ver que difieren en la orientación de los dos mesitilos además de la rotación del grupo

AZABORA[5]HELICENOS

MeO en el heliceno descrito. Igualmente, se observa una contribución similar de la conformación principal como en el anterior heliceno. En cuanto al **HEL-3**, también presenta una contribución dominante del 97 % (ver el **HEL-3x** en la Figura 3.13).

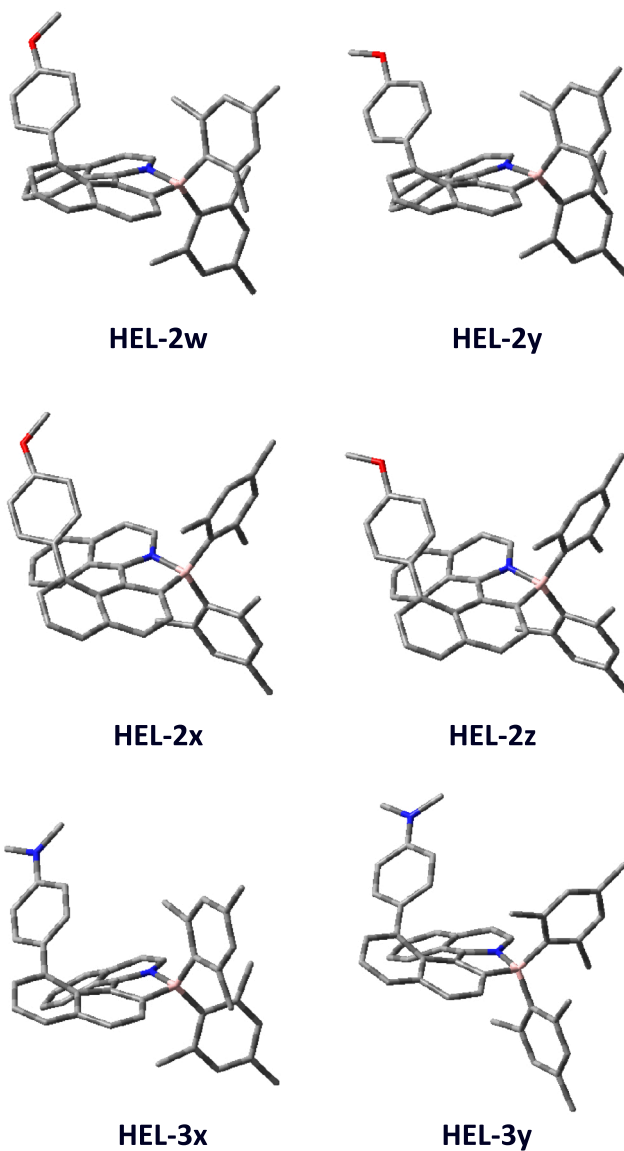


Figura 3.13. Confórmers obtenidos para el HEL-2 y HEL-3.

Como se describe en el apartado anterior, los espectros de ECD obtenidos son bastante diferentes. Aun así, en todos los casos se quisieron calcular los espectros ECD que se obtienen mediante cálculos de Boltzmann promediando las contribuciones de los conformeros individuales. Los resultados calculados reproducen muy bien los espectros observados experimentalmente para los tres helicenos.

En la Figura 3.14 que se encuentra a continuación se observan los orbitales frontera para las conformaciones más estables de los compuestos estudiados en este capítulo. Nótese que en dicha figura sólo se muestran los isómeros *M* y que fueron calculados en el estado fundamental. Como se puede predecir, el orbital HOMO de los tres helicenos son diferentes, ya que para el **HEL-1** se puede localizar principalmente en los grupos mesitilos, mientras en el **HEL-2** se deslocaliza totalmente en la parte metoxi-fenil y, en el **HEL-3** se localiza totalmente en la parte dimetilamino-fenil. Por tanto, la localización del HOMO se presupone en la zona con capacidad donadora de electrones, en nuestros compuestos se encontrará en el fragmento fenilo, el cual se verá más acentuado en su carácter de transferencia de carga en los helicenos **HEL-2** y **HEL-3**. Respecto a la localización del orbital LUMO en todos los casos siempre se encontrará en el fragmento del heliceno. Por ello, la energía de transición HOMO → LUMO calculada sigue la tendencia de los máximos de absorción de los helicenos (ver Tabla 3.2).

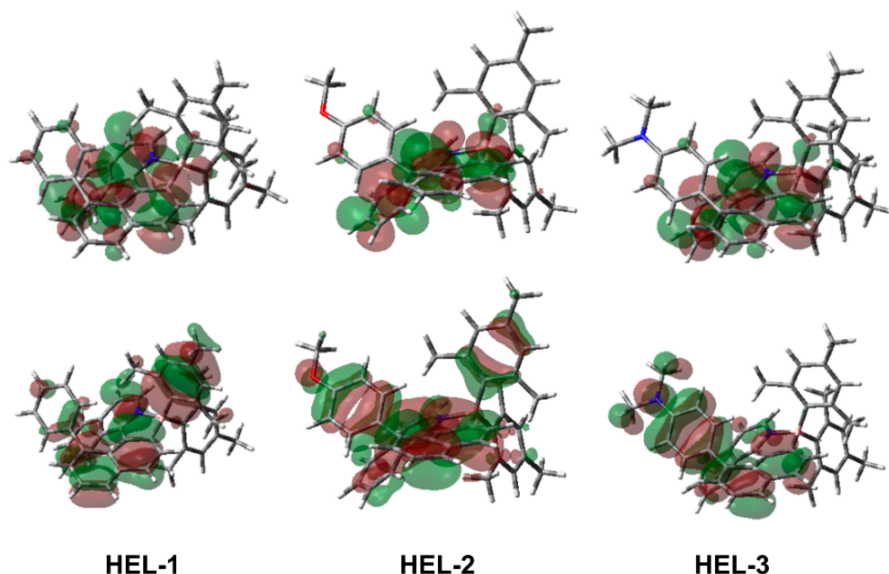


Figura 3.14. Contorno de los orbitales frontera, HOMO (abajo) y LUMO (arriba) de los helicenos en su forma enantiomérica *M*.

Se quiso obtener mayor información sobre el cambio en el signo de la primera transición del ECD del **HEL-1** frente a **HEL-2** o **HEL-3**. Se calcularon parámetros nuevos de dipolo (*D*) y de fuerzas de rotación (*R*) para los isómeros *M* de cada compuesto (estos datos se recogen en la Tabla 3.2). La primera transición para el *M*-**HEL-1** muestra una fuerza rotacional positiva, de acuerdo con las observaciones experimentales hechas por la espectroscopía ECD. Por el contrario, para el *M*-**HEL-2**, la fuerza de rotación de la primera transición adopta valores negativos, lo que nuevamente está en consonancia con lo experimental. Y, finalmente, el *M*-**HEL-3** presenta una banda de ECD fuerte que corresponde a la primera transición, que coincide además con la resistencia rotacional negativa bastante intensa calculada.

Tabla 3.2. Cálculos TD-DFT de las energías de absorción y emisión (ΔE), fuerza dipolar (D), fuerza rotacional (R) y ángulo formado eléctricamente (E) y momentos de transición magnética (M) de los principales conformeros en el estado fundamental y en el primer estado singlete excitado.

Conformación [peso %] ^[a]	ΔE_{calc} (eV)	ΔE_{exp} (eV)	D (10^{-40} esu ² cm ²)	R (10^{-44} esu ² cm ²)	Ángulo E-M (°)
Estado fundamental					
HEL-1a [97]	3.35 ($S_1 \leftarrow S_0$)	2.99	146 045	18.24	84
HEL-2a [58]	3.30 ($S_1 \leftarrow S_0$)	2.95	133 666	-16.19	96
HEL-2b [39]	3.31 ($S_1 \leftarrow S_0$)	2.95	135 995	-2.15	91
HEL-3a [97]	3.19 ($S_1 \leftarrow S_0$)	2.86	91 810	-50.32	114
Estado excitado					
HEL-1a	2.69 ($S_1 \rightarrow S_0$)	2.50	183 491	13.89	87
HEL-2a	2.63 ($S_1 \rightarrow S_0$)	2.47	161 906	-31.19	97
HEL-2b	2.65 ($S_1 \rightarrow S_0$)	2.47	168 502	-11.09	92
HEL-3a	2.60 ($S_1 \rightarrow S_0$)	2.12	66 611	-75.97	129

[a] El peso de las conformaciones principales en el estado fundamental se expone en paréntesis. Ver las estructuras de las conformaciones en la Figura 3.12 y 3.13. Se observan conformaciones similares con respecto a los grupos mesitilos para todos los compuestos. En el caso del **HEL-2**, se dan dos conformeros, puesto que difieren según la orientación del grupo metoxi. Todos los cálculos se realizaron para el isómero *M*.

Asimismo se optimizaron los cálculos para el primer estado excitado de los tres compuestos. La geometría del estado excitado difiere de la estructura del estado fundamental para los compuestos **HEL-1** y **HEL-2**, pero por el contrario es bastante similar para el compuesto **HEL-3**. De nuevo, las fuerzas rotacionales

AZABORA[5]HELICENOS

calculadas reproducen los resultados de CPL observados, en especial el cambio que se plasma experimentalmente con el signo correspondiente al enantiómero **HEL-1** frente a **HEL-2** o **HEL-3**. Con respecto a los orbitales fronterizos que están involucrados en la transición emisiva $S_1 \rightarrow S_0$ se puede observar que los orbitales LUMO son muy similares a los orbitales calculados para el estado fundamental. Sin embargo, se observan algunas diferencias con respecto a los orbitales HOMO, en particular para **HEL-1** y **HEL-2**. Sus orbitales HOMO calculados en la geometría del estado excitado está menos deslocalizado en los grupos mesitilo e involucre sólo el resto helicénico y el grupo fenilo o fenilo sustituido. Para el compuesto **HEL-2** se observan diferencias más pronunciadas para el cual la fuerza rotacional negativa se mejora significativamente en el estado excitado en comparación con el estado fundamental. Todo esto es consecuente para poder explicar la intensa señal de CPL de **HEL-2**, a pesar de la baja fuerza de rotación de la primera transición, observada en la espectroscopía ECD.

3.8. CONCLUSIONES

Se han diseñado y sintetizado tres colorantes organoboro quelatos de *N,C*-tetracoordinados que tienen como característica principal una cadena de arilisoquinolina, y un átomo de N y otro de B entre los anillos que forman la estructura principal. Esto ha dado lugar a compuestos helicénicos, en concreto a un tipo de los denominados azabora[5]helicenos. La diferencia entre los tres compuestos se basa en el grupo sustituyente en la posición *para* del fragmento arilo del resto naftalénico. Estos sustituyentes presentan diferentes propiedades en función del grupo donador de electrones que contienen.

Algunos de estos nuevos colorantes organoboro muestran una intensa emisión de luz circularmente polarizada (CPL) con interesantes valores en los factores de disimetría *g*. La CPL puede ajustarse espectralmente mediante la modificación

del carácter de transferencia de carga del estado emisor. Por tanto, la variación de los diferentes sustituyentes donadores de electrones permite la observación de una eficiente CPL por encima de los 500 nm o incluso proporciona un medio para obtener señales de CPL cercanas a 600 nm en el caso del compuesto **HEL-3**. Los diferentes efectos debido a los sustituyentes en el signo de los espectros de dicroísmo circular (ECD) y los espectros de CPL pueden corroborarse mediante los cálculos de densidad teórica funcional (TD-DFT). Finalmente, la útil combinación de efectos de transferencia de carga y propiedades quirópticas proporciona una idea para el diseño a medida de estructuras CPL-SOM.

3.9. ANEXO EXPERIMENTAL

Todas las reacciones mostradas en este capítulo se llevaron a cabo en tubos de Schlenk, secados en estufa bajo atmósfera de argón. Se obtuvo el THF anhidro utilizando columnas de secado con disolvente de tipo Grubbs. El complejo de paladio $[Pd(PPh_3)_4]$, los ácidos borónicos y el *n*BuLi (1.6 M en hexano) se compraron en Aldrich sin purificación adicional. El complejo $[Ir(\mu\text{-OMe})(cod)]_2$ y el $CuBr_2$ se adquirieron en Strem y Aldrich, respectivamente. Por último, el 1,8-dibromonaftaleno, 1-bromo-8-fenilnaftaleno y $(Mes)_2BF$ se sintetizaron según los procedimientos descritos en la literatura. Los colorantes racémicos **HEL-1** – **HEL-3** se separaron en sus formas enantiopuras mediante CSP-HPLC usando una columna quiral Chiralpak IA.

Las medidas realizadas de absorción UV/vis y fluorescencia se realizaron en dos disolventes diferentes, uno polar (acetonitrilo) y otro apolar (tolueno). Las concentraciones utilizadas de los compuestos oscilan entre 10–20 μ M, asegurando que la absorbancia a la longitud de onda de excitación no excediera de 0.2 para cubetas rectangulares de cuarzo de 1.0 cm de camino óptico. Los espectros de absorción UV/vis se registraron con un espectrómetro UVPC-1603

AZABORA[5]HELICENOS

(Shimadzu). Mientras que los espectros de fluorescencia de estado estacionario se obtuvieron con un fluorímetro estándar (Varian Cary Eclipse) con una lámpara de xenón pulsada. Las muestras se excitaron irradiando en la banda de absorción a la longitud de onda más desplazada. Los espectros de excitación se registraron para verificar la autenticidad de la emisión observada. Los espectros de excitación y emisión fueron corregidos dependiendo de la sensibilidad del fotomultiplicador. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia para **HEL-1** y **HEL-2** se determinaron con quinín sulfato ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.55$ en $0.05 \text{ M H}_2\text{SO}_4$) como estándar de referencia y fueron corregidos con las diferencias entre los índices refractivos de los disolventes de las muestras y la referencia. El rendimiento cuántico de **HEL-3** se determinó usando 4-amino-*N*-propil-1,8-naftalimina ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.48$ en acetonitrilo). El tiempo de vida media de la fluorescencia en nanosegundos es medida por el recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente, con un error del 5 %. Se aplicó un ajuste biexponencial para todos los compuestos en todos los medios estudiados, sólo mostrando el componente del decaimiento principal. Se utilizó un láser de diodo pulsado de picosegundos empleado como fuente de excitación (EPL-445, $\lambda_{\text{exc}} = 442.2 \text{ nm}$, ancho de pulso 78.3 ps) y el ajuste de las trazas de decaimiento cinético se realizó por desconvolución de la función de respuesta del instrumento. Se realizó en un Edinburgh Instruments con equipo fluorescente FS920.

En cuanto a las medidas de dicroísmo circular y luminiscencia circularmente polarizada se usaron disoluciones idénticas en tolueno dentro de cubetas de cuarzo de 2.0 mm de camino óptico, primero para ECD y luego para las mediciones de CPL, utilizando concentraciones de 0.25 mM , 0.3 mM y 0.4 mM para **HEL-1**, **HEL-2** y **HEL-3**, respectivamente. Los efectos de agregación de estas concentraciones se excluyeron debido al hecho de que los espectros de ECD coincidían con los medidos en soluciones diluidas (hasta $10\text{--}20 \mu\text{M}$). Se empleó

un espectropolarímetro Jasco 815SE para las mediciones de ECD (con una constante de tiempo de 2 s y velocidad de monocromador de 100 nm/min). Para CPL se utilizó un instrumento casero como se describe en trabajos anteriores^{93,94}, la radiación de excitación se llevó a la cavidad a través de una fibra óptica que contiene agua hasta el fluorímetro Jasco FP8200. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 440 nm para **HEL-1**, 420 nm para **HEL-2** y 475 nm para **HEL-3**. Se eligió una geometría de dispersión de 90°, la excitación con luz polarizada a lo largo de la dirección de recolección de la luz emitida fue esencial para evitar la contribución de la polarización lineal. Se tomaron 8 escaneos para el compuesto **HEL-1** y 5 escaneos para los compuestos **HEL-2** y **HEL-3**.

Los cálculos DFT dependientes del tiempo para predecir los espectros de ECD se realizaron a nivel de teoría cam-B3LYP/def2SVP con el paquete Gaussian16. Se han considerado 70 estados excitados. Se ha asumido que el ancho de banda de las bandas gaussianas es de 0.2 eV.

3.10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Chen, P.; Lalancette, R. A.; Jäkle, F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 8802-8805.
- [2] Entwistle, C. D.; Marder, T. B. *Chem. Mater.*, **2004**, *16*, 4574-4585.
- [3] Elbing, M.; Bazan, G. C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2008**, *47*, 834-838.
- [4] Chen, P.; Jäkle, F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 20142-20145.
- [5] Baik, C.; Murphy, S. K.; Wang, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2009**, *49*, 8224.
- [6] Hudson, Z. M.; Wang, S. *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 1584-1596.
- [7] Rao, Y. L.; Wang, S. *Inorg. Chem.*, **2011**, *50*, 12263-12274.

AZABORA[5]HELICENOS

- [8] Cheng, F.; Jäkle, F. *Polym. Chem.*, **2011**, *2*, 2122-2132.
- [9] Jäkle, F. *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 3985-4022.
- [10] Tanaka, K.; Chujo, Y. *Macromol. Rapid Comm.*, **2012**, *33*, 1235-1255.
- [11] Louder, A.; Burgess, K.; *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4891-4932.
- [12] Ulrich, G.; Ziesel, R.; Harriman, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2008**, *14*, 1184-1201.
- [13] Frath, D.; Massue, J.; Ulrich, G.; Ziesel, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2014**, *53*, 2290-2310.
- [14] Zheng, Q.; Xu, G.; Prasad, P. N. *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 5812-5819.
- [15] Zhang, S.; Wu, T.; Fan, J.; Li, Z.; Jiang, N.; Wang, J.; Dou, B.; Sun, S.; Song, F. Peng, X. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 555-558.
- [16] Zhang, X.; Xiao, Y.; Qi, J.; Qu, J.; Kim, B.; Yue, X.; Belfield, K. D. *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 9153-9160.
- [17] Kolemen, S.; Işık, M.; Kim, G. M.; Kim, D.; Geng, H.; Buyuktemiz, M.; Karatas, T.; Zhang, Z. F.; Dede, Y.; Yoon, J.; Akkaya, E. U. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2015**, *54*, 5340-5344.
- [18] Kowada, T.; Maeda, H.; Kikuchi, K. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 4953-4972.
- [19] Pais, V. F.; Alcaide, M. M.; López-Rodríguez, R.; Collado, D.; Nájera, F.; Pérez-Inestrosa, E.; Álvarez, E.; Lassaletta, J. M.; Fernández, R.; Ros, A.; Pischel, U. *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 15369-15376.
- [20] Pais, V. F.; Ramírez-López, P.; Romero-Arenas, A.; Collado, D.; Nájera, F.; Pérez-Inestrosa, E.; Fernández, R.; Lassaletta, J. M.; Ros, A.; Pischel, U. *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 9605-9611.

- [21] Santos, F. M. F.; Rosa, J. N.; Candeias, N. R.; Parente Carvalho, C.; Matos, A. I.; Ventura, A. E.; Florindo, H. F.; Silva, L. C.; Pischel, U.; Gois, P. M. P. *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 1631-1637.
- [22] Frath, D.; Didier, P.; Mély, Y.; Massue, J.; Ulrich, G. *ChemPhotoChem*, **2017**, *1*, 109-112.
- [23] Coskun, A.; Akkaya, E. U. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 14474-14475.
- [24] McDonnell, S. O.; O'Shea, D. F. *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 3493-3496.
- [25] Bozdemir, O. A.; Guliyev, R.; Buyukcakir, O.; Selcuk, S.; Kolemen, S.; Gulseren, G.; Nalbantoglu, T.; Boyaci, H.; Akkaya, E. U. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 8029-8036.
- [26] Niu, L. Y.; Guan, Y. S.; Chen, Y. Z.; Wu, L. Z.; Tung, C. H.; Yang, Q. Z. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 18928-18931.
- [27] Erbas-Cakmak, S.; Bozdemir, O. A.; Cakmak, Y.; Akkaya, E. U. *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 858-862.
- [28] Li, D.; Wang, K.; Huang, S.; Qu, S.; Liu, X.; Zhu, Q.; Zhand, H.; Wang, Y. *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 15298-15304.
- [29] Yuan, W. Z.; Chen, S.; Lam, J. W. Y.; Deng, C.; Lu, P.; Sung, H. H. Y.; Williams, I. D.; Kwok, H. S.; Zhang, Y.; Tang, B. Z. *Chem. Comm.*, **2011**, *47*, 11216-11218.
- [30] Jia, W. L.; Feng, X. D.; Bai, D. R.; Lu, Z. H.; Wang, S.; Vamvounis, G. *Chem. Mater.*, **2005**, *17*, 164-170.
- [31] Kinoshita, H.; Okumoto, K.; Shiota, Y. *Chem. Mater.*, **2003**, *15*, 1080-1089.
- [32] Boscá, F.; Cuquerella, M. C.; Pais, V. F.; Ros, A.; Pischel, U. *ChemPhotoChem*, **2018**, *2*, 34-41.
- [33] Groen, M. B.; Wynberg, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 2968-2974.

AZABORA[5]HELICENOS

- [34] Moscovitz, A. *Tetrahedron*, **1961**, *13*, 48-56.
- [35] Kemp, C. M.; Mason, S. F. *Tetrahedron*, **1966**, *22*, 629-635.
- [36] Lightner, D. A.; Hefelfinger, D. T.; Frank, G. W.; Powers, T. W.; Trueblood, K. N. *Nat. Phys. Sci.*, **1971**, *232*, 124-125.
- [37] Lightner, D. A.; Powers, T. W.; Trueblood, K. N.; Frank, G. W.; Hefelfinger, D. T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 3492-3497.
- [38] Frank, G. W.; Hefelfinger, D. T.; Lightner, D. A. *Acta Crystallogr. B*, **1973**, *B29*, 223-230.
- [39] Bestmann, H. J.; Both, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1972**, *11*, 296.
- [40] Eggers, L.; Buss, V.; Henkel, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, *35*, 870-872.
- [41] Martin, R. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1974**, *13*, 649-660.
- [42] Meisenheimer, J.; Witte, K. *Chem. Ber.*, **1903**, *36*, 4153-4164.
- [43] Weitzenböck, R.; Klingler, A. *Monatsh. Chem.*, **1918**, *39*, 315-323.
- [44] Newman, M. S.; Lutz, W. B.; Lednicer, D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 3420-3421.
- [45] Newman, M. S.; Wise, R. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, *78*, 450-454.
- [46] Newman, M. S.; Lednicder, D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, *78*, 4765-4770.
- [47] Martin, R. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1974**, *13*, 649-660.
- [48] Katz, T. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2000**, *39*, 1921-1923.
- [49] Urbano, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2003**, *42*, 3986-3989.
- [50] Shen, Y.; Chen, C. F. *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 1463-1535.

- [51] Gingras, M. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 968-1006.
- [52] Saleh, N.; Shen, C.; Crassous, J. *Chem. Sci.*, **2014**, *5*, 3680-3694.
- [53] Bosson, J.; Gouin, J.; Lacour, J. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 2824-2840.
- [54] Aillard, P.; Voituriez, A.; Marinetti, A. *Dalton Trans.*, **2014**, *43*, 15263-15278.
- [55] Vávra, J.; Severa, L.; Švec, P.; Císařová, I.; Koval, D.; Sázellová, P.; Kašička, V.; Teplý, F. *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 489-499.
- [56] Weimar, M.; Correa da Costa, R.; Lee, F. H.; Fuchter, M. J. *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 1706-1709.
- [57] Jierry, L.; Harthong, S.; Aronica, C.; Mulatier, J. C.; Guy, L.; Guy, S. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 288-291.
- [58] Liu, L. B.; Katz, T. J. *Tetrahedron Letters*, **1990**, *31*, 3983-3986.
- [59] Willmore, N. D.; Hoic, D. A.; Katz, T. J. *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 1889-1891.
- [60] Katz, T. J.; Liu, L. B.; Willmore, N. D.; Fox, J. M.; Rheingold, A. L.; Shi, S. H.; Nuckolls, C.; Rickman, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 10054-10063.
- [61] Fox, J. M.; Goldberg, N. R.; Katz, T. J. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 7456-7462.
- [62] Carreño, M. C.; Hernández-Sánchez, R.; Mahugo, J.; Urbano, A. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 1387-1390.
- [63] Nuckolls, C.; Katz, T. J.; Katz, G.; Colling, P. J.; Castellanos, L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 79-88.
- [64] Dreher, S. D.; Paruch, K.; Katz, T. J. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 806-814.
- [65] Paruch, K.; Katz, T. J.; Incarvito, C.; Lam, B.; Rhatigan, B.; Rheingold, A. L. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 7602-7608.

AZABORA[5]HELICENOS

[66] Paruch, K.; Vyklický, L.; Wang, D. Z.; Katz, T. J.; Incarvito, C.; Zakharov, L.; Rheingold, A. L. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 8539-8544.

[67] Ermer, O.; Neudörfel, J. *Helv. Chim. Acta*, **2001**, *84*, 1268-1313.

[68] Brown, J. M.; Field, I. P.; Sidebottom, P. J. *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 4867-4870.

[69] Mikes, F.; Boshart, G.; Gilav, E. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1976**, 99-100.

[70] Tanaka, H.; Nakagawa, H.; Yamada, K.; Kawazura, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1981**, *54*, 3665-3668.

[71] Balan, A.; Gottlieb, H. E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1981**, *0*, 350-352.

[72] Okubo, H.; Nakano, D.; Yamaguchi, M.; Kabuto, C. *Chem. Lett.*, **2000**, *29*, 1316-1317.

[73] Okubo, H.; Nakano, D.; Anzai, S.; Yamaguchi, M. *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 557-563.

[74] Nakagawa, H.; Ogashiwa, S.; Tanaka, H.; Yamada, K.; Kawazura, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1981**, *54*, 1903-1904.

[75] Yamada, K.; Kobori, Y.; Nakagawa, H. *Chem. Comm.*, **2000**, 97-98.

[76] Eskildsen, J.; Krebs, F. C.; Faldt, A.; Sommer-Larsen, P.; Bechgaard, K. *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 200-205.

[77] Furche, F.; Ahlrichs, R.; Wachsmann, C.; Weber, E.; Sobanski, A.; Vögtle, F.; Grimme, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 1717-1724.

[78] Autschbach, J. *Chirality*, **2009**, *21*, E116-E152.

[79] Riehl, J. P.; Muller, G.; en: Berova, N.; Polavarapu, P. L.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. (Eds.), *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy*, John Wiley & Sons, **2012**, 65.

- [80] Maeda, H.; Bando, Y. *Pure Appl. Chem.*, **2013**, *85*, 1967-1978.
- [81] Alnoman, R. B.; Rihn, S.; O'Connor, D. C.; Black, F. A.; Costello, B.; Waddell, P. G.; Clegg, W.; Peacock, R. D.; Herrebout, W.; Knight, J. G.; Hall, M. J. *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 93-96.
- [82] Alcaide, M. M.; Santos, F. M. F.; Pais, V. F.; Carvalho, J. I.; Collado, D.; Pérez-Inestrosa, E.; Arteaga, J. F.; Boscá, F.; Gois, P. M. P.; Pischel, W. *J. Org. Chem.*, **2017**, *82*, 7151-7158.
- [83] Harada, N.; Nakanishi, K.; Berova, N. *John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ*, **2012**, 115.
- [84] Jiménez, J.; Cerdán, L.; Moreno, F.; Maroto, B. L.; García-Moreno, I.; Lunkley, J. L.; Muller, G.; de la Moya, S. *J. Phys. Chem. C*, **2017**, *121*, 5287-5292.
- [85] Sawada, Y.; Furumi, S.; Takai, A.; Takeuchi, M.; Noguchi, K.; Tanaka, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 4080-4083.
- [86] Abbate, S.; Longhi, G.; Lebon, F.; Castiglioni, E.; Superchi, S.; Pisani, L.; Fontana, F.; Torricelli, F.; Caronna, T.; Villani, C.; Sabia, R.; Tommasini, M.; Lucotti, A.; Mendola, D.; Mele, A.; Lightner, D. A. *J. Phys. Chem. C*, **2014**, *118*, 1682-1695.
- [87] Sakai, H.; Kubota, T.; Yuasa, J.; Araki, Y.; Sakanoue, T.; Takenobu, T.; Wada, T.; Kawai, T.; Hasobe, T. *J. Phys. Chem. C*, **2016**, *120*, 7860-7869.
- [88] Nakamura, K.; Furumi, S.; Takeuchi, M.; Shibuya, T.; Tanaka, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 5555-5558.
- [89] Sánchez-Carnerero, E. M.; Moreno, F.; Maroto, B. L.; Agarrabeitia, A. R.; Ortiz, M. J.; Vo, B. G.; Muller, G.; de la Moya, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 3346-3349.

AZABORA[5]HELICENOS

[90] Brandt, J. R.; Wang, X.; Yang, Y.; Campbell, A. J.; Fuchter, M. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*, 9743-9746.

[91] Tanaka, H.; Inoue, Y.; Mori, T. *ChemPhotoChem*, **2018**, *2*, 386-402.

[92] Dekkers, H. P. J. M. en el Vol. *Circular Dichroism: Principles and Applications* (Eds: Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W.), *John Wiley & Sons*, New York, **2000**, pp. 185-215.

[93] Castiglioni, E.; Abbate, S.; Longhi, G. *Appl. Spectrosc.*, **2010**, *64*, 1416-1419.

[94] Castiglioni, E.; Abbate, S.; Lebon, F.; Longhi, G. *Methods Appl. Fluoresc.*, **2014**, *2*, 024006.

[95] Shen, C.; Srebro-Hooper, M.; Jean, M.; Vanthuyne, N.; Toupet, L.; Williams, J. A. G.; Torres, A. R.; Riives, A. J.; Muller, G.; Autschbach, J.; Crassous, J. *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 407-418.



4

BAI.

**COLORANTES ORGANOBORO CON
TRANSFERENCIA DE CARGA QUE MUESTRAN
ABSORCIÓN BIFOTÓNICA**

4

BAI

Colorantes organoboro con transferencia de carga que muestran absorción bifotónica

4.1. SINOPSIS

En este capítulo se muestra el estudio de nuevos colorantes organoboro *N,C*-tetracoordinados con diferentes sustituyentes separados con cadenas alquínicas. Estos colorantes son análogos a los compuestos mencionados en el capítulo anterior (Capítulo 3 sobre los azabore[5]helicenos), es decir, contienen un esqueleto de arilisoquinolinas boriladas (BAI), que dependiendo de la sustitución del grupo donador de electrones presentan un diferente carácter de transferencia de carga interna (ICT) en el estado excitado. Modulando estas características se llega a pronunciados desplazamientos de Stokes (hasta valores de unos $8\ 000\ \text{cm}^{-1}$) y un indiscutible comportamiento solvatofluorocrómico. En cuanto a los resultados observados en los rendimientos cuánticos de fluorescencia, son destacablemente altos en medios no polares, con valores aproximadamente de 0.5–0.6. Hay que destacar uno de los colorantes, el **BAI-2**, que posee la ICT más pronunciada y el rendimiento cuántico de fluorescencia más alto, en torno a 0.4 para emisiones con longitudes de onda máximas mayores a 600 nm en disolventes de polaridad moderada.

Asimismo, estos colorantes muestran propiedades de absorción bifotónica (TPA) logrando altos valores de hasta 60 GM en sección transversal de dos fotones (*o cross sections*) en el rango de longitud de onda del infrarrojo cercano, es decir, mayores que 900 nm. Por otro lado, también hay que enfatizar que

BAI

otro de los compuestos (**BAI-4**) ha sido diseñado como cromóforo dimérico, integrando un formato estructural tipo «Aceptor-Espaciador-Aceptor» (A- π -A). Éste, si bien no presentó ningún comportamiento de transferencia de carga interna (ICT), sí condujo a la observación de secciones transversales altas de TPA, aproximadamente 220 GM con una longitud de onda de 700 nm. Por último, todos los compuestos organoboro aquí mostrados muestran una alta fotoestabilidad, cualidad que les proporciona un *plus* de interés.

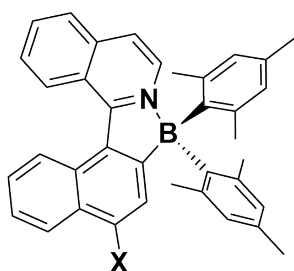


Figura 4.1. Representación de la estructura principal de los colorantes, donde X será los distintos sustituyentes.

El capítulo está basado en el artículo « *π -Extended Four-Coordinated Organoboron N,C-Chelates as Two-Photon Absorbing Chromophores*». Z. Domínguez, V. F. Pais, D. Collado, P. Vázquez-Domínguez, F. Nájera, E. Pérez-Inestrosa, A. Ros, U. Pischel. *The Journal of Organic Chemistry*, **2019**, *84*, 13384–13393».

4.2. INTRODUCCIÓN

Como se demuestra en el capítulo anterior (Capítulo 3 sobre los azabore[5]helicenos), la posibilidad de controlar el diseño de los colorantes organoboro tri- y tetracoordinados, así como de sus propiedades electrónicas y fotofísicas, hace aún más interesante el estudio de estos cromóforos¹⁻³. Por tanto, este control conlleva a numerosas aplicaciones similares a las mencionadas anteriormente como son la optoelectrónica, bioimagen, detección y procesamiento de información molecular⁴⁻¹⁸.

Inicialmente, los compuestos aquí presentados se diseñaron con la intención de que se comportaran como rotores moleculares. El propósito inicial de un rotor molecular es el de usarse para medir la microviscosidad mediante el calibrado de sus intensidades de fluorescencia en mezclas de disolventes con viscosidad conocida y posterior medida de la viscosidad en la muestra de interés en base a dicha calibración. Sin embargo, desafortunadamente, nuestros compuestos no mostraron este comportamiento deseado al inicio del proyecto, aunque sí se observaron otras propiedades aún más interesantes como se verá a continuación. Véase el apartado 4.10 sobre los experimentos adicionales que se realizaron para este proyecto.

En este capítulo se mostrará cómo estructuras típicas de colorantes BAI ubicadas junto a una extensión estructural y electrónica permiten obtener cromóforos que emiten en el rango del rojo y presentan propiedades con capacidad de absorber dos fotones (TPA) en la región espectral del infrarrojo cercano (NIR). Como ya se ha adelantado anteriormente, estas interesantes propiedades pueden ser moduladas según el diseño de donador-aceptor de electrones y la conjugación π que posea el compuesto correspondiente.

En nuestro grupo de investigación ya se publicaron anteriormente otras estructuras organoboro del tipo de los colorantes BAI. Éstas demostraron que el

BAI

grupo aceptor de electrones estaba condicionado por la unidad de isoquinolina que contenía la estructura¹⁴. Además, se dio a conocer que para otros compuestos también organoboro tipo *N,C*-quelatos, la interacción del enlace boro-nitrógeno (B-N) contribuye a una estabilización energética del orbital π^* del ligando quelato⁴, incrementando así sus propiedadesceptoras de electrones. Asimismo, se sabe que la fuerza del grupo donador puede modificarse a través del grupo sustituyente en el resto arilo¹⁴. Por ello en este estudio se decide añadir un nivel más de complejidad: la extensión de la conjugación π mediante la introducción de espaciadores alquínico en las estructuras de los cromóforos diseñados.

4.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Al igual que el capítulo anterior, el procedimiento experimental empleado en este apartado se encuentra explicado más detalladamente en la información adicional del propio artículo publicado. En este apartado, se describirán brevemente los aspectos relacionados con el enfoque experimental.

Inicialmente, se diseñaron y sintetizaron una serie de cinco derivados de compuestos arilisoquinolinas boriladas (**BAI-D**), que contienen diferentes derivados estructurales de arilo en la posición 3 del fragmento naftalénico de la estructura principal (ver Figura 4.1).

Todos estos derivados de BAI tienen estructuralmente en común la presencia de un átomo de N y otro de B, y están compuestos por cinco anillos contiguos. Como se ha mencionado anteriormente, la única diferencia entre estos compuestos va a residir en los fragmentos de arilo enlazados al resto naftalénico que presenta la estructura principal. Estos derivados se pueden agrupar y posteriormente comparar sus resultados según sus fragmentos diferentes:

- i. Los compuestos **BAI-1** y **BAI-2** pueden ser comparados por el tipo de sustituyentes que albergan, siendo esta su única diferencia puesto que tienen una estructura principal similar. El primero (**BAI-1**) contiene un grupo metoxi (MeO) en el fenilo y, el segundo (**BAI-2**), un grupo dimetilamino (NMe₂).
- ii. **BAI-1** y **BAI-3** pueden ser diferenciados por el número de anillos aromáticos que tienen en su estructura terminal, en el **BAI-1** el grupo MeO está conectado a un fenilo, mientras que el **BAI-3** el grupo MeO está conectado a un naftaleno.
- iii. La diferencia entre **BAI-3** y **BAI-5** radica en la presencia o no de insaturación en el sustituyente: en el **BAI-3** posee un triple enlace carbono-carbono (C≡C), mientras que el **BAI-5** contiene un enlace simple.
- iv. Finalmente, el **BAI-4** se trata de un compuesto dimérico como se muestra en la Figura 4.2.

BAI

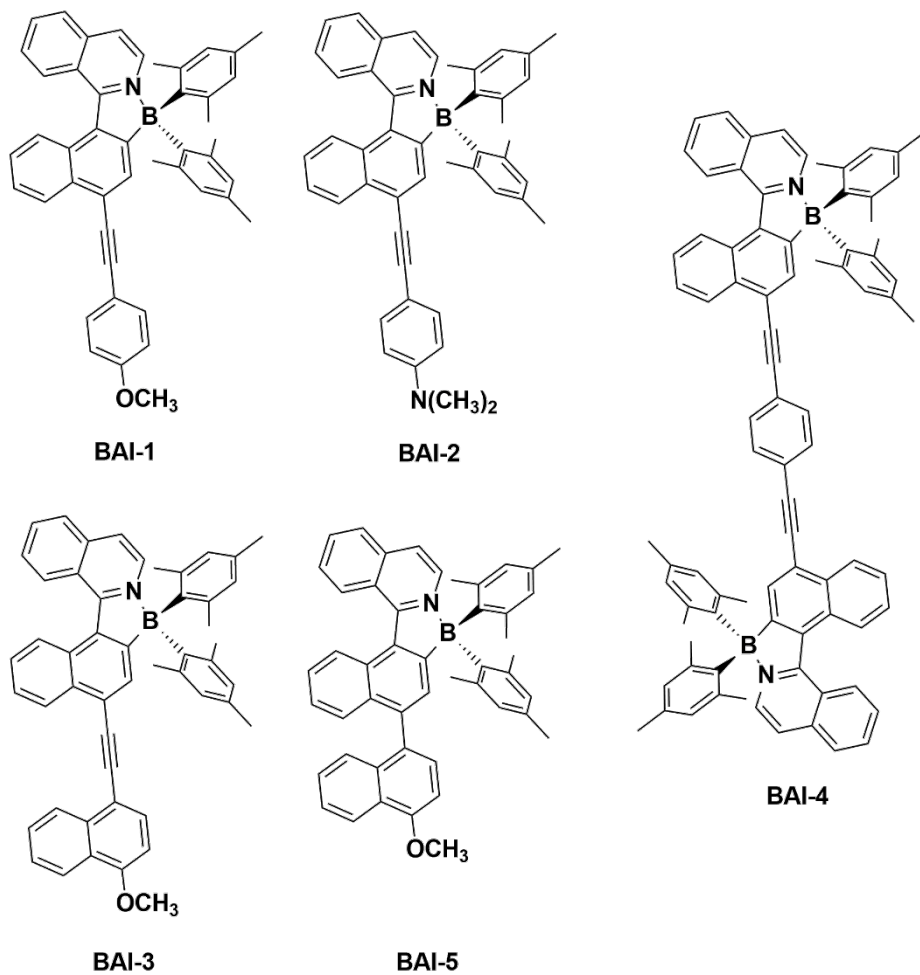


Figura 4.2. Estructuras de los derivados utilizados en este estudio.

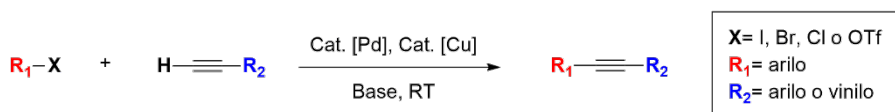
4.4. SÍNTESIS

Los compuestos helicénicos que se muestran en este capítulo fueron sintetizados en colaboración con el Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Sevilla.

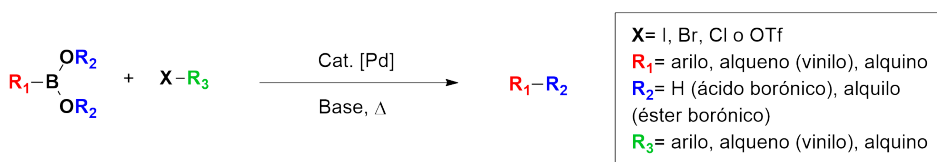
A continuación, se describe brevemente la síntesis de los compuestos del **BAI-1** al **5**.^b

La secuencia sintética (Esquema 4.2) implica el empleo de una alquilación de Heck (Esquema 4.1a, acoplamiento de Sonogashira) para la elaboración de los compuestos **BAI-1** al **4**, mientras que para el **BAI-5** se utilizó una reacción de Suzuki-Miyaura, como muestra a continuación:

a)



b)



Esquema 4.1. Reacciones generales de acoplamiento de Sonogashira (a) y Suzuki-Miyaura (b).

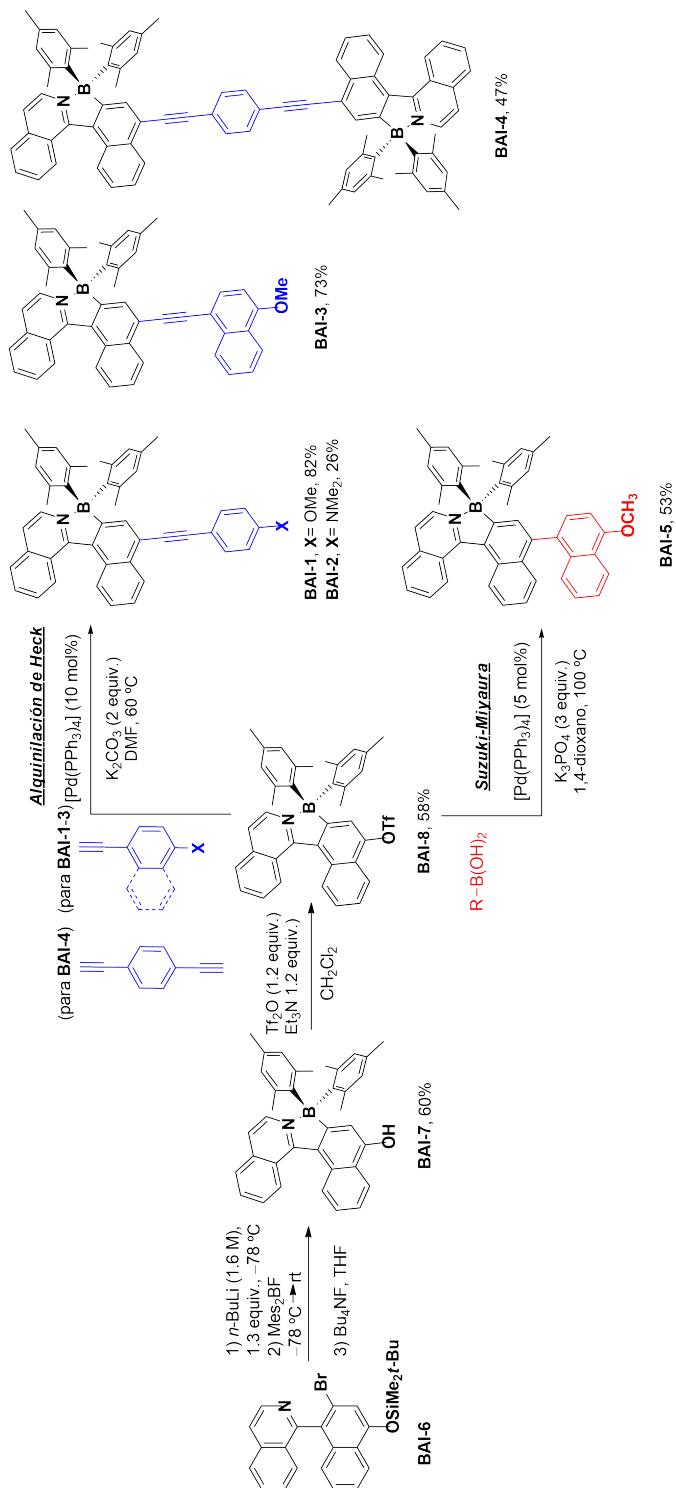
Como se muestra en el Esquema 4.2, en ambas rutas existe un precursor en común, y es el triflato **BAI-8**. Además, como también se describió en el capítulo anterior¹⁴, se parte de la arilisoquinolina **BAI-6**, obteniéndose el alcohol **BAI-7** a través de una secuencia de múltiples pasos: intercambio Br-Li, una reacción con (Mes)₂BF y una desililación con Bu₄NF (con rendimiento global del 60 %). El triflato **BAI-8** se obtuvo a partir del compuesto **BAI-7** con un rendimiento del 58 % usando condiciones estándar para este procedimiento, es decir, anhídrido de trifluorometansulfónico (Tf₂O), trietilamina (Et₃N) y una cantidad catalítica de dimetilaminopiridina (DMAP). Desde el precursor **BAI-8**, se efectúa la reacción de alquilación de Heck usando el complejo de paladio [Pd(PPh₃)₄] como

^b La descripción de manera más detallada se puede encontrar en la información suplementaria del artículo científico publicado en *The Journal of Organic Chemistry*.

BAI

catalizador. A pesar de las posibles reacciones secundarias, como la hidrólisis del triflato y la activación del resto borano de la estructura mediante la transmetalación B-Pd, la reacción funciona con éxito a 60° C, y los rendimientos que se obtuvieron para los compuestos **BAI-1** al **BAI-3** fueron de moderados a altos (26-82 %).

El **BAI-4**, que contiene dos fragmentos terminales de alquino en la posición *para* de un fenilo, se obtuvo igualmente desde **BAI-8** en este caso con un rendimiento del 47 %. Para la ruta a través de la reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura se requirieron temperaturas más altas, hasta los 100° C. A pesar de estas condiciones, el producto deseado **BAI-5** se obtuvo con un buen rendimiento, del 53 %. En la información adicional del artículo publicado se recoge la caracterización por espectroscopia de RMN-¹H, ¹³C y ¹¹B de todos los compuestos de este proyecto.



Esquema 4.2. Síntesis de los compuestos BAI-1 – BAI-5.

BAI

4.5. PROPIEDADES FOTOFÍSICAS

La Tabla 4.1 contiene los valores obtenidos de los derivados BAI en diferentes disolventes, uno polar (acetonitrilo) y otro apolar (*n*-hexano). Para facilitar la lectura de este capítulo, se ha simplificado la cantidad de valores obtenidos, y se complementa con unas tablas mucho más extensas en el apartado 4.11 Anexo a este capítulo, añadiendo una mayor variedad de disolventes orgánicos al estudio (como DMSO, acetona, THF, EtOAc y tolueno).

Tabla 4.1. Propiedades fotofísicas de los derivados **BAI-1** al **BAI-5** en diferentes medios, como *n*-hexano y acetonitrilo.

	$\lambda_{\text{abs, max}} \text{ (nm)}^{[a]}$ [$\epsilon \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1})$]	$\lambda_{\text{fluo, max}} \text{ (nm)}^{[b]}$	$\Delta\nu \text{ (cm}^{-1})^{[c]}$	$\Phi_{\text{fluo}}^{[d]}$	$\tau \text{ (ns)}^{[e]}$
<i>n</i> -hexano					
BAI-1	431 [22 800]	479	3 238	0.53	5.39
BAI-2	451 [10 900]	503	2 265	0.77	3.32
BAI-3	440 [17 200]	485	2 167	0.57	2.83
BAI-4	450 ^[f]	483	1 557	0.29	3.14
BAI-5	422 [16 400]	476	3 200	0.52	4.62
acetonitrilo					
BAI-1	425 [21 600]	502	3 821	0.55	3.88
BAI-2	450 [22 200]	700	8 044	0.02	0.37
BAI-3	433 [19 000]	540	4 865	0.59	3.75
BAI-4	447 [40 500]	484	1 912	0.49	3.61
BAI-5	414 [15 300]	522	5 268	0.47	5.86

[a] Máximo de absorción UV/vis (>400 nm), entre corchetes se muestra el coeficiente de absorción molar ϵ en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. [b] Máximo de emisión de fluorescencia. [c] Desplazamiento de Stokes. [d] Rendimiento cuántico de fluorescencia, con un error del 15 %. Se midió con 4-amino-*N*-propil-1,8-

naftalimida ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.48$ en acetonitrilo) como referencia y corregido para las diferencias del índice de refracción de los disolventes usados. [e] Tiempo de vida media de la fluorescencia en nanosegundos medida por recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente, con un error del 5 %. Se aplicó un ajuste biexponencial para todos los compuestos sintetizados en todos los medios estudiados. Sólo está mostrado el componente del decaimiento principal. [f] Coeficiente de absorción molar no añadido puesto que sufría de agregación en disolventes no polares.

En la Figura 4.3 se muestran los espectros de absorción UV/vis y emisión de fluorescencia también en *n*-hexano y acetonitrilo como disolventes. Asimismo, en el apartado de Anexo 4.11 de este capítulo están todas las figuras de los espectros correspondientes a los demás disolventes orgánicos utilizados en este estudio.

BAI

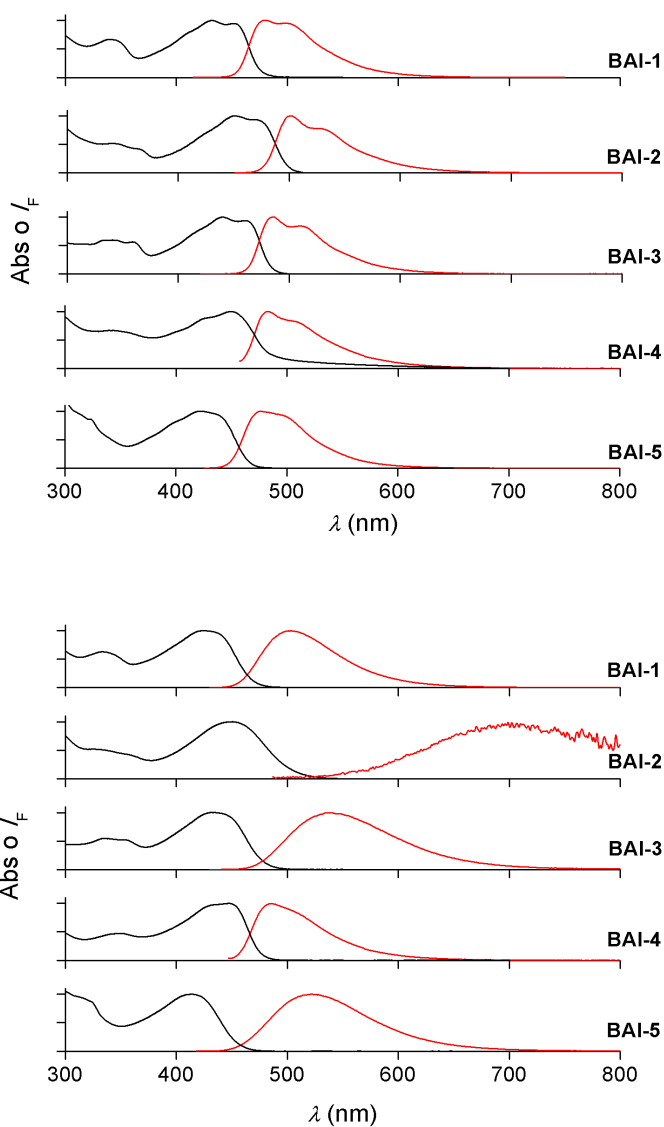


Figura 4.3. Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del **BAI-1** al **BAI-5**, en los disolventes *n*-hexano (arriba) y acetonitrilo (abajo).

De todos estos datos se pueden extraer importantes tendencias espectrofotométricas. Todos los máximos de longitud de onda de las bandas de absorción están por encima de los 400 nm y muestran variaciones típicas según en el medio donde se encuentre el BAI disuelto, también dependiendo del

carácter *push-pull* (grupo donador-aceptor de electrones) de éstos, y del grado de conjugación π . Por ejemplo, el colorante **BAI-2**, que contiene el grupo NMe_2 (el grupo donador de electrones más fuerte de todos los derivados estudiados), presenta la banda de absorción más desplazada batocrómicamente (hacia el rojo) en acetonitrilo. Para el mismo disolvente, los compuestos **BAI-1** y **BAI-3**, que contienen un grupo MeO (considerado el grupo donador de electrones más débil de la serie), muestran bandas de absorción desplazadas hipsocrómicamente (hacia el azul). Asimismo, existen diferencias en los espectros de los compuestos **BAI-3** y **BAI-5**, los cuales difieren en su estructura por la presencia de un triple enlace en **BAI-3**, es decir, en su conjugación π . Por otro lado, el dímero con la cadena principal π más extendida **BAI-4** que, además, carece de grupos donadores de electrones, muestra espectros muy similares al del **BAI-2** con desplazamientos batocrómicos.

De la misma manera, este carácter *push-pull* observado en los espectros de absorción UV/vis parece que igualmente es determinante en los espectros de emisión de fluorescencia, siendo esto debido a la transferencia de carga interna (ICT) en el estado excitado. En disolventes no polares, como *n*-hexano, con una ICT estimada mucho menor, los máximos de fluorescencia de los BAI varían relativamente poco, aproximadamente entre 20–30 nm para todos los compuestos estudiados. Particularmente, el compuesto **BAI-2** posee un elevado desplazamiento batocrómico en acetonitrilo, mostrando una banda de ICT típicamente ancha a 700 nm aproximadamente. Además, este colorante presenta propiedades solvatofluorocrómicas mucho más pronunciadas. Por otro lado, el compuesto **BAI-4** muestra una emisión de fluorescencia casi independiente al disolvente, como se comenta más adelante detalladamente.

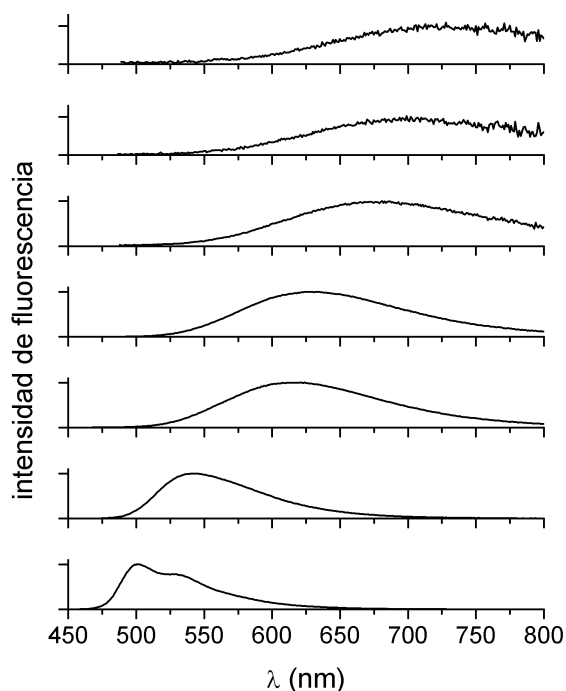


Figura 4.4. Espectros de emisión de fluorescencia del colorante **BAI-2** en diferentes disolventes (desde abajo hacia arriba): *n*-hexano, tolueno, EtOAc, THF, acetona, acetonitrilo, DMSO. Los espectros están normalizados a una intensidad de 1 al máximo de su longitud de onda de emisión.

En todos los compuestos aquí estudiados existen cambios en los desplazamientos de Stokes significativos que se mencionaran detalladamente. Como era de esperar, y en base a las afirmaciones que se han hecho anteriormente, el **BAI-2** tiene el mayor desplazamiento de Stokes en acetonitrilo como disolvente (aprox. $8\,000\text{ cm}^{-1}$) promoviendo las ICT, mientras que para el dímero **BAI-4** se observa el menor desplazamiento de Stokes (aproximadamente $1\,900\text{ cm}^{-1}$). En cuanto a los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_{fluo}) de estos compuestos, son generalmente altos, con valores alrededor de 0.5 y 0.8. Esto ocurre especialmente al encontrarse en un entorno no polar como son los disolventes *n*-hexano y tolueno.

Hay que destacar que estos compuestos muestran una fotoestabilidad muy elevada en comparación con otros colorantes derivados de 2-fenilpiridina que contienen «separadores» de tipo alquinilo¹⁴. Los compuestos **BAI-1** – **BAI-4** presentan variaciones insignificantes cuando están disueltos en tolueno, en torno al 1 y 6 % de disminución en la intensidad de absorción (en sus máximos de longitud de onda en los espectros de absorción UV/vis) al ser irradiados con lámpara de xenón de 150 W y un filtro de corte de 395 nm durante dos horas. Cabe destacar que, en los disolventes de moderada polaridad como son el EtOAc o el THF, el espectro de emisión de fluorescencia de **BAI-2** se desplaza a longitudes de onda superiores a 600 nm (ver Tabla 4.2). A pesar de ello, se mantienen rendimientos cuánticos bastante altos, de alrededor 0.4. No obstante, el **BAI-2** muestra un valor muy bajo de rendimiento cuántico en medios más polares como en acetonitrilo (0.02). Esto se debe a dos situaciones: a un estado emisoro energéticamente bajo ($\lambda_{\text{fluor,max}} = 700$ nm, correspondiente a 1.77 eV) y a la intervención de la *energy-gap law* (la cual predice la desactivación no radiante altamente competitiva del primer estado singlete excitado). El compuesto **BAI-2** confirma estos comportamientos mostrando una constante de velocidad de desintegración no radiante (k_{nr}) más alta en comparación con los otros compuestos estudiados en este capítulo: valores de $k_{\text{nr}} = 2.6 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ para **BAI-2** frente a los valores de $(0.9\text{--}1.2) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ para los colorantes **BAI-1**, **BAI-3** y **BAI-5** en acetonitrilo (ver en el apartado Anexo las Tablas 4.4–4.8). Sin embargo, no se detecta una alta fotorreactividad para el **BAI-2** en acetonitrilo, lo que confirma el hecho de que el estado de las ICT de los compuestos organoboro arilisoquinolinas parece funcionar como un sumidero de energía (mencionado anteriormente), haciendo que el sistema sea inaccesible para otras rutas de transformación fotoquímica¹⁵.

BAI

Tabla 4.2. Propiedades fotofísicas del colorante **BAI-2** en diferentes disolventes.

	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm) [ϵ (M^{-1} cm^{-1})]	$\lambda_{\text{fluo, max}}$ (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	Φ_{fluo}	τ (ns)	$10^7 \times k_r$ (s^{-1})	$10^7 \times k_{nr}$ (s^{-1})
BAI-2							
DMSO	459 [23 600]	728	8 508	0.02	0.31	6.5	320
acetonitrilo	450 [22 200]	700	8 044	0.02	0.37	5.4	260
acetona	450 [29 500]	675	7 668	0.05	0.80	6.3	120
THF	454 [23 500]	628	6 356	0.36	3.68	9.8	17
EtOAc	452 [22 600]	613	6 059	0.42	3.82	11	15
tolueno	457 [17 800]	544	3 521	0.69	3.02	23	10
n-hexano	451 [10 900]	502	2 265	0.77	3.32	23	6.9

4.6. PROPIEDADES SOLVATOFUOROCRÓMICAS

Para respaldar el papel discutido anteriormente de las ICT en el estado excitado de algunos de los compuestos estudiados en los distintos disolventes, se han realizado estudios solvatofluorocrómicos.

Como se pueden ver en la Tabla 4.2, **BAI-2** muestra las variaciones más pronunciadas al incrementar la polaridad del disolvente, obteniéndose desplazamientos batocrómicos de hasta 200 nm al cambiar de *n*-hexano a acetonitrilo o DMSO. Además, como se presenta en la Tabla 4.2 y la Figura 4.4, existe una variación muy consistente del máximo de emisión de fluorescencia. Por tanto, estas experiencias indican una emisión de ICT.

Se ha llevado a cabo la representación gráfica de Lippert-Mataga (Δf)²⁰⁻²² (ver Figura 4.5) gracias a los desplazamientos de Stokes obtenidos de los colorantes organoboro aquí presentados en diferentes disolventes. Los gráficos de Lippert-Mataga ayudaran a determinar el efecto solvatofluorocrómico que tienen nuestros derivados. Estos gráficos se basan en la aplicación de la Ecuación 4.1 de Lippert-Mataga^{46,47}, que relaciona el desplazamiento de Stokes del compuesto con la permitividad ε y el índice de refracción n del disolvente.

$$\Delta\nu = \frac{2\Delta f}{4\pi\varepsilon_0\hbar c a^3} (\mu_e - \mu_g)^2 + b$$

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$$

Ecuación 4.1. Fórmulas para la aplicación gráfica de Lippert-Mataga.

En ellas, $\Delta\nu$ equivale a $\nu_{abs} - \nu_{em}$ y representa el desplazamiento de Stokes; ν_{abs} y ν_{em} son la frecuencia de absorción y emisión en unidades de cm^{-1} ; \hbar es la constante de Planck; c es la velocidad de la luz en el vacío; a es el radio Onsager; b es una constante. Δf es la orientación de la polarización; ε es el índice de refracción; n es la constante dieléctrica; μ_e y μ_g son los momentos dipolares de los estados fundamental y emisivo, respectivamente; ε_0 es la permitividad en el vacío.

Los cambios espectrales dependientes de los disolventes influyen en un espectro de emisión de fluorescencia en mayor medida que en un espectro de absorción. En los casos de los compuestos **BAI-1**, **BAI-2**, **BAI-3** y **BAI-5** se obtuvieron buenas relaciones lineales, con un coeficiente de regresión lineal de $r > 0.78$, $n = 7$. Las pendientes relativas apuntan al compuesto **BAI-2** como el cromóforo con el carácter de ICT más fuerte en el estado excitado y al **BAI-1** como el más débil. Los valores de las pendientes relativas obtenidas de los diagramas de Lippert-Mataga obtenidos fueron éstas: **BAI-2** (8.7) > **BAI-3** (3.9) >

BAI

BAI-5 (3.0) > **BAI-1** (1.0). Por último, el colorante **BAI-4** apenas muestra variación del desplazamiento de Stokes (variación máxima de aproximadamente 400 cm^{-1}), en consonancia con la ausencia de las ICT en la excitación.

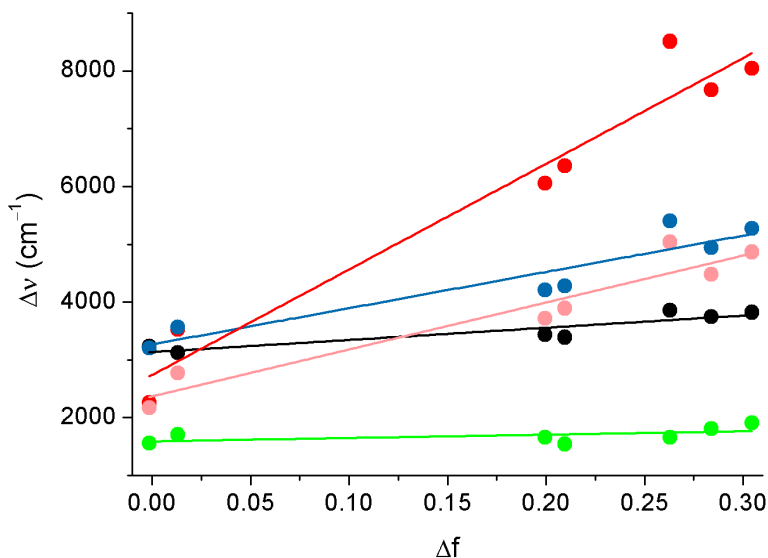


Figura 4.5. Diagrama de Lippert-Mataga para los colorantes estudiados, **BAI-1** (negro), **BAI-2** (rojo), **BAI-3** (rosa), **BAI-4** (verde) y **BAI-5** (azul).

Para el **BAI-2**, el análisis del máximo de emisión de fluorescencia en dependencia de los parámetros del disolvente que plantea Kamlet-Taft, es decir, los parámetros β y π^* , revela una tendencia sobre una basicidad aumentada y que la polaridad estabiliza el estado emisor, pudiéndose observar en la Figura 4.6.

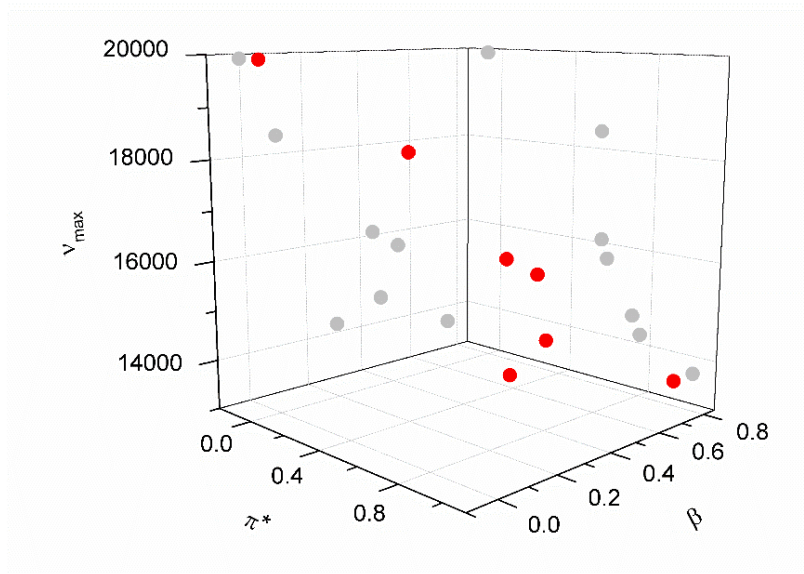
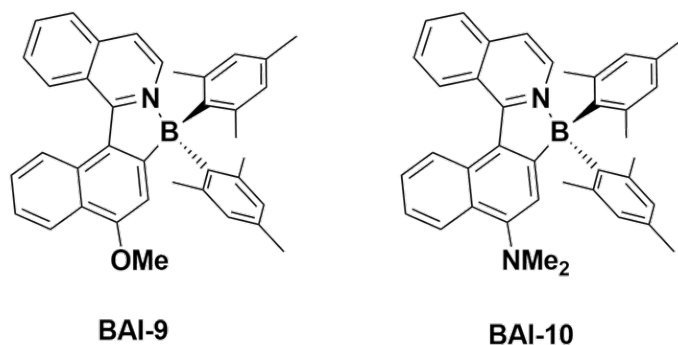


Figura 4.6. Diagrama en 3D del máximo de emisión de **BAI-2** en diferentes disolventes (ver Tabla 4.2) frente a los parámetros de Kamlet-Taft, β y π^* (puntos rojos). Los puntos grises corresponden al diagrama 2D para cada parámetro individual del disolvente. Los parámetros de Kamlet-Taft están sacados de la ref.²³.

Otro de los parámetros relevantes estudiados aquí sobre el compuesto **BAI-2**, es el análisis de las constantes de velocidad de desactivación radiante (k_r) y no radiante (k_{nr}) en distintos disolventes. Estos análisis dan consistencia a los aumentos de los rendimientos cuánticos de fluorescencia en los disolventes de menor polaridad observados (ver Tabla 4.2), mientras que la relación de estos parámetros k_r/k_{nr} permite interpretar cómo es la desactivación radiante. Apenas se encontró influencia del disolvente en la relación de los parámetros k_r/k_{nr} para los compuestos **BAI-1** y **BAI-3**, debido al pobre carácter de las ICT que presentan estos colorantes. En consecuencia, los rendimientos cuánticos de fluorescencia de estos colorantes no mostraron una dependencia marcada de la polaridad del medio, estando siempre en el rango entre 0.5 y 0.6. Esta tendencia también es coincidente con todo el comportamiento mencionado del compuesto **BAI-2**.

BAI

Estos resultados coinciden al comparar las propiedades de emisión de los colorantes **BAI-1** y **BAI-2** con los colorantes BAI estudiados y publicados anteriormente en nuestro grupo de investigación (ver Figura 4.7, **BAI-9** con grupo terminal MeO y **BAI-10** con grupo NMe₂). La configuración π -extendida en el colorante **BAI-1** parece no contribuir al aumento de las ICT y, en consecuencia, no se observa un drástico desplazamiento batocrómico de los máximos de emisión. Por ejemplo, en DMSO como disolvente polar se diferencia sólo 5 nm, siendo de 503 nm para **BAI-9** frente a 508 nm para **BAI-1**. No obstante, esta situación se altera significativamente para el compuesto **BAI-2**: la extensión π contribuye decisivamente a un desplazamiento batocrómico pronunciado adicional de la fluorescencia, por ejemplo, 567 nm para **BAI-10** frente a 628 nm para **BAI-2** en THF o, incluso, 591 nm para **BAI-10** frente a 712 nm para **BAI-2** en el disolvente más polar (DMSO).



La sección transversal bifotónica σ_2 para los compuestos **BAI-D** se mide en tolueno por la metodología «*two-photon excited fluorescence*», tomándose como referencia el colorante rodamina 6G.

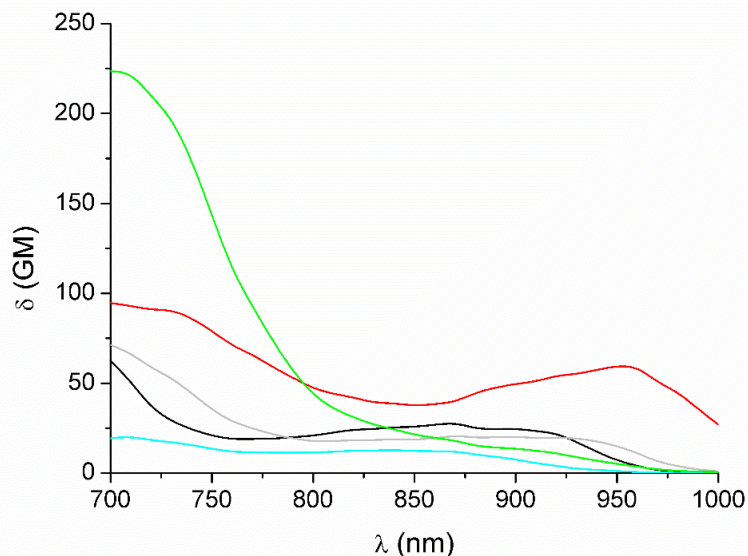


Figura 4.8. Espectro de absorción bifotónica de los colorantes **BAI-1** (negro), **BAI-2** (rojo), **BAI-3** (gris), **BAI-4** (verde) y **BAI-5** (azul) en tolueno.

Para la observación de estas propiedades de absorción de dos fotones se han empleado tres estrategias principales encontradas en la literatura²⁷:

- i. La primera, los colorantes *push-pull* dipolares con un par donador-aceptor (D-A) conectado a través de un puente π conjugado, es decir, tipo D- π -A^{28,29}.
- ii. La segunda estrategia, colorantes cuadrupolares con un patrón simétrico tipo D- π -D o A- π -A, así como estructuras D-A-D y A-D-A³⁰⁻³³.
- iii. Y, por último, los colorantes octopolares con una arquitectura con formato DA₃ o AD₃³⁴⁻³⁸.

En la Figura 4.8 se muestran los espectros de TPA en tolueno de los compuestos estudiados. Se puede observar que los dos compuestos de la serie que da mejor rendimiento son el **BAI-2** para un formato D- π -A y el **BAI-4** para un formato A-

BAI

π -A. Estos dos derivados muestran secciones transversales de TPA (σ_2) a 700 nm cerca de los 100 GM (unidad de Goeppert-Mayer, donde $1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s molécula}^{-1} \text{ fotón}^{-1}$) o incluso por encima de los 200 GM para **BAI-2** y **BAI-4**, respectivamente. El **BAI-2**, que como se ha indicado tiene el carácter de ICT más significativo, muestra un TPA considerable incluso a longitudes de onda superiores a 950 nm. Los compuestos **BAI-1** y **BAI-3** que tienen un grupo terminal MeO y un carácter ICT menos pronunciado, muestran los valores de σ_2 más pequeños y los máximos de TPA a la longitud de onda más desplazada (950 nm) por debajo del observado para el **BAI-2**. Finalmente, el **BAI-5**, que también tiene grupo terminal MeO, pero sin un conector alquinilo, presenta el valor σ_2 de TPA más pequeño. Esto es debido al menor grado de conjugación π de este compuesto, en comparación con el **BAI-3**.

La selección de las longitudes de onda de excitación se hizo atendiendo a la regla $\lambda_{\text{TPE}} \approx 2 \lambda_{\text{OPE}}$ en TPA, aunque dichas longitudes de ondas son algo dispares de las del máximo encontrado en los espectros de absorción bifotónica TPA. Finalmente, la fluorescencia que emitieron los colorantes tras la excitación de los dos fotones (TPE) es comparable con la observada en la espectroscopía de fluorescencia convencional, es decir, excitación por un fotón (OPE), siendo una clara indicación de que el mismo estado emisor está poblado.

Tabla 4.3. Propiedades de absorción bifotónicas de los colorantes
BAI-1 – 5.

	$\lambda_{\text{fluo}}^{\text{TPE}}$ (nm)	$\lambda_{\text{fluo}}^{\text{OPE}}$ (nm)	σ_2 a 700 nm (GM)	σ_2 a 850 nm (GM)	σ_2 a 950 nm (GM)
BAI-1	505	491	63	28	7
BAI-2	543	544	95	39	60
BAI-3	513	500	71	21	15
BAI-4	505	486	223	18	5
BAI-5	505	493	20	12	1

Los valores obtenidos de los derivados estudiados también se pueden comparar con los colorantes previamente publicados, **BAI-9** y **BAI-10** que se muestran en la Figura 4.7¹⁵. Se observa que los valores de los colorantes ya publicados están en el mismo rango que los presentados en este estudio. Sin embargo, el máximo de longitud de onda más desplazada se mueve aún más batocrómicamente debido a la conjugación π extendida. Por tanto, el organoboro arilisoquinolina **BAI-10**, que contiene un sustituyente dimetilamino (NMe_2) directamente en la posición 4 del resto naftaleno borilado, presenta un valor σ_2 de aproximadamente 60 GM a 890 nm¹⁵. Y para el colorante **BAI-9**, con el sustituyente MeO como grupo donador de electrones más débil, tiene una sección transversal TPA más baja de aproximadamente 30 GM a 840 nm¹⁵. Además, cabe señalar que el rendimiento de los colorantes estudiados en este capítulo es comparable a otros fluoróforos organoboro, como son algunos derivados de BODIPY^{5,6,24} o colorantes organoboro tricoordinados^{34,36,39-45}.

4.8. CÁLCULOS DE DENSIDAD TEÓRICA FUNCIONAL

Se realizaron los cálculos teóricos de densidad funcional (DFT) y los teóricos de densidad dependientes del tiempo (TD-DFT), con el fin de obtener información adicional sobre la fotofísica únicamente de los colorantes **BAI-1**, **BAI-2** y **BAI-4**^{25,26}. Cada vez se muestra mayor interés en el uso de estas herramientas, sobretodo en el contexto de los colorantes organoboro¹⁵⁻¹⁷. Para los datos calculados se utiliza acetonitrilo como medio polar, lo que se tuvo en cuenta al incluir el modelo de polarización continua (PCM)⁴⁶.

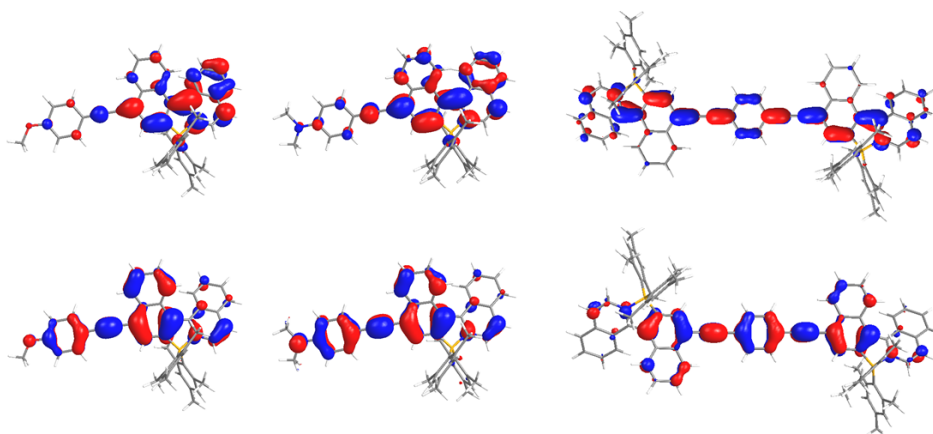


Figura 4.9. Orbitales NTO (abajo: hueco, arriba: electrón) de **BAI-1** (izquierda), **BAI-2** (centro) y **BAI-4** (derecha). El peso NTO para la transición correspondiente $S_1 \leftarrow S_0$ son 91 %, 93 % y 72 % para **BAI-1**, **BAI-2** y **BAI-4**, respectivamente.

Para los colorantes **BAI-1** y **BAI-2**, la transición de energía más baja, es decir, $S_1 \leftarrow S_0$, involucra exclusivamente los orbitales frontera HOMO y LUMO. En ambos casos, y como se espera del carácter ICT de los colorantes, el HOMO se encuentra principalmente en el resto feniletinil del naftaleno, con una participación significativa del sustituyente heteroátomo, es decir, del grupo MeO o del NMe₂; mientras que el LUMO se encuentra principalmente en el resto isoquinolinil, similar a la situación observada para otros colorantes BAI. El análisis orbital de transición natural (NTO) correspondiente⁴⁷, que proporciona

una descripción más coherente de las propiedades de transferencia de carga de **BAI-1** y **BAI-2**, confirma la aparición de la ICT del resto feniletinil naftaleno al isoquinolinil (ver Figura 4.9). Como se esperaba del carácter ICT de los colorantes, los vectores del momento dipolar calculados presentan un cambio en la dirección y el valor al pasar del estado fundamental al estado excitado. El cambio del momento dipolar en la excitación del colorante **BAI-2** asciende a 10.3 Debye, estando cerca del valor esperado para la transferencia completa de electrones, es decir, aproximadamente 15 Debye. Si se comparan, en el colorante **BAI-1** se ha calculado un cambio del momento dipolar de solo 2.3 Debye, lo que concuerda con su carácter muy reducido en las ICT. Esto confirma muy bien los resultados de los estudios solvatofluorocrómicos ya mencionados anteriormente, sobretodo las conclusiones extraídas de los diagramas de Lippert-Mataga. Con respecto a las propiedades de TPA, los cálculos predicen que la transición $S_1 \leftarrow S_0$ es muy activa con secciones transversales de 89 GM (a 795 nm) y 249 GM (a 816 nm) para **BAI-1** y **BAI-2**, respectivamente.

Por último, haremos mención a las propiedades electrónicas del colorante dímero **BAI-4**. Para este compuesto organoboro, el HOMO se encuentra principalmente en el resto fenil-1,4-dietinil y el LUMO se extiende a lo largo del eje de la molécula en una distribución similar a la cianina. Esto concuerda teóricamente con la ausencia de fenómenos de las ICT, que se manifiesta experimentalmente con la independencia del disolvente en la emisión de este colorante. El análisis NTO muestra una gran contribución del HOMO al LUMO para el proceso de un fotón, correspondiente a la transición $S_1 \leftarrow S_0$ (ver la representación NTO para el colorante **BAI-4** en la Figura 4.9). La ausencia de efectos del disolvente se ve reforzada por la falta de cambio del momento dipolar en la excitación de la luz (4.6 Debye frente a 4.5 Debye para S_0 y S_1 , respectivamente). El proceso de TPA se rige por la transición $S_2 \leftarrow S_0$ (223 GM a

BAI

770 nm), que tiene contribuciones iguales de las transiciones de HOMO-1 a LUMO y de HOMO a LUMO+1.

4.9. CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo con éxito el diseño y la síntesis de cinco colorantes *N,C*-tetracoordinados de tipo organoboro, los cuales poseen como principal característica estructural un fragmento de arilisoquinolina. El alcance electrónico de la estructura principal BAI se ha conseguido ampliar al insertar estructuras π extendidas y de carácter cromóforo siguiendo el formato donador-aceptor. Todos los compuestos se prepararon a través de una secuencia que incluye como paso determinante una alquilación de Heck de un precursor triflato-BAI común.

El mayor efecto de la conjugación π extendida se ha manifestado en el compuesto **BAI-2**, que presenta el carácter más pronunciado en las ICT de la serie de BAI estudiados en este proyecto. En comparación, los **BAI-1** y **BAI-3** presentan mucho menos carácter en las ICT, según la clasificación del comportamiento solvatofluorocrómico.

Se ha comprobado que la respuesta espectroscópica del derivado **BAI-2** en dependencia de la polaridad del medio es muy sensible, como se puede observar en el diagrama de Lippert-Mataga correspondiente o en la correlación de la emisión máxima con el parámetro π^* de Kamlet-Taft. La eficiencia cuántica de emisión es bastante alta en el rango de polaridad más bajo, es decir, de *n*-hexano a THF, y muestra solo una disminución en los disolventes de mayor polaridad, la serie desde acetona a DMSO.

Además, el carácter mejorado en las ICT del **BAI-2** también se ha manifestado mediante una absorción significativa de dos fotones. Por otra parte, se ha

demostrado que la familia de compuestos BAI aquí estudiada era fotoestable bajo las condiciones de irradiación empleadas.

Todos los compuestos han mostrado propiedades significativas de TPA, siendo más pronunciados para las ICT en el **BAI-2** y para el formato Aceptor- π -Aceptor en el **BAI-4**.

4.10. EXPERIMENTOS ADICIONALES

Como se ha mencionado al inicio de este capítulo, estos compuestos organoboro se diseñaron inicialmente con la intención de que se comportaran como rotores moleculares. Por ello, se comenzó a estudiar sus propiedades fotofísicas en disolventes con mayor grado de viscosidad, para finalmente poder realizar una comparativa. La lista de los disolventes que se emplearon para medir las propiedades fotofísicas fueron: glicerol, (\pm)-1,3-butanediol, metanol, DMSO, acetonitrilo, acetona, THF, EtOAc, tolueno y *n*-hexano. Como se puede comprobar, los disolventes que faltan en los resultados finales son el glicerol y el (\pm)-1,3-butanediol, los cuales presentan una mayor viscosidad que el resto de disolventes estudiados. Nuestros compuestos eran solubles y presentaban propiedades fotofísicas medibles en estos disolventes, sin embargo, no nos llegaron a aportar ningún valor a las propiedades que se querían mostrar como rotores moleculares.

Además, se realizaron experimentos variando la temperatura en los distintos disolventes mientras se obtenía la fluorescencia de cada compuesto. La variación de temperatura se encontraba en el rango de 283 K a 323 K. No obstante, tampoco se observó grandes cambios concluyentes en estos experimentos.

BAI

Por último, se ha realizado un experimento nuevo en nuestro grupo de investigación, se trata de captar la fluorescencia de la serie de compuestos en estado sólido. Esta experiencia si se encuentra disponible en el artículo publicado. Se lleva a cabo con éxito dejando secar capas finas de los distintos compuestos disueltos en acetona durante una semana y, posteriormente, se mide su fluorescencia.

A continuación, en la Figura 4.10 se observan los diferentes espectros de emisión de fluorescencia normalizados de los distintos compuestos estudiados aquí. Como se puede comprobar, por comparación con la Figura 4.13, los máximos de emisión que muestran los compuestos en estado sólido no son iguales a los máximos de emisión al estar disueltos en acetona (ver en el apartado de 4.11 Anexos las Tabla 4.4 a la 4.8, donde se muestran los datos de los distintos compuestos disueltos en acetona). Con esto se comprueba que las capas finas de sólido están totalmente secas y que realmente se está midiendo la fluorescencia de los diferentes colorantes en estado sólido.

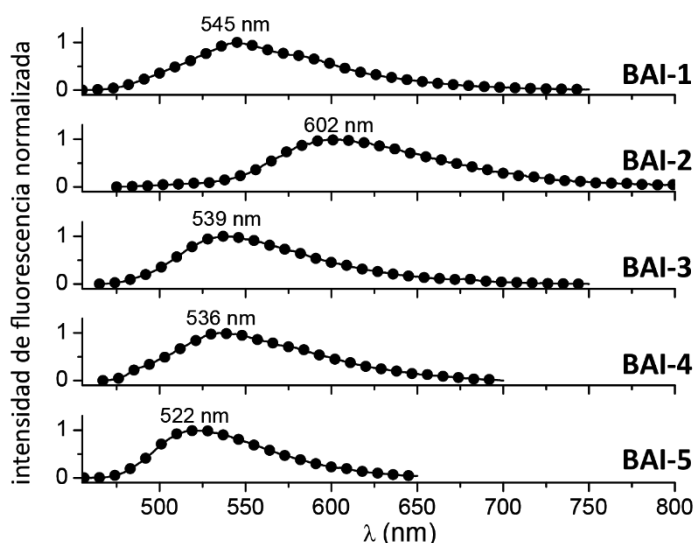


Figura 4.10. Espectros de emisión de fluorescencia en estado sólido de los colorantes **BAI-1 – BAI-5**, excitando a 425 nm.

4.11. ANEXOS

A continuación, se mostrarán todas las tablas que recogen las propiedades fotofísicas de todos los colorantes estudiados en los distintos disolventes, como también las figuras correspondientes a sus espectros tanto de absorción UV/vis como de emisión de fluorescencia en los distintos medios.

Tabla 4.4. Propiedades fotofísicas del colorante **BAI-1** en diferentes disolventes.

	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm) [ϵ (M^{-1} cm^{-1})]	$\lambda_{\text{fluo, max}}$ (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	Φ_{fluo}	τ (ns)	$10^7 \times$ k_r (s^{-1})	$10^7 \times$ k_{nr} (s^{-1})
BAI-1							
DMSO	429 [22 600]	508	3 858	0.60	3.61	17	11
acetonitrilo	425 [21 600]	502	3 821	0.55	3.88	14	12
acetona	425 [24 200]	501	3 748	0.56	3.64	15	12
THF	429 [26 600]	495	3 390	0.62	3.90	16	9.7
EtOAc	427 [23 400]	495	3 434	0.57	3.66	16	12
tolueno	433 [23 000]	491	3 125	0.52	3.42	15	14
n-hexano	431 [22 800]	479	3 238	0.53	5.39	9.8	8.8

BAI

Tabla 4.5. Propiedades fotofísicas del colorante **BAI-3** en diferentes disolventes.

	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm) [ϵ (M^{-1} cm^{-1})]	$\lambda_{\text{fluo, max}}$ (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	Φ_{fluo}	τ (ns)	$10^7 \times$ k_r (s^{-1})	$10^7 \times$ k_{nr} (s^{-1})
BAI-3							
DMSO	436 [18 900]	551	5 035	0.60	3.52	17	11
acetonitrilo	433 [19 000]	540	4 865	0.59	3.75	16	11
acetona	433 [17 200]	531	4 476	0.59	3.48	17	12
THF	437 [16 000]	521	3 890	0.58	3.12	19	13
EtOAc	435 [17 800]	515	3 715	0.58	3.07	19	14
tolueno	441 [17 600]	500	2 771	0.58	2.72	21	15
n-hexano	440 [17 200]	485	2 167	0.57	2.83	20	15

Tabla 4.6. Propiedades fotofísicas del colorante **BAI-4** en diferentes disolventes.

	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm) [ϵ (M^{-1} cm^{-1})]	$\lambda_{\text{fluo, max}}$ (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	Φ_{fluo}	τ (ns)	$10^7 \times$ k_r (s^{-1})	$10^7 \times$ k_{nr} (s^{-1})
BAI-4							
DMSO	454 [38 900]	489	1 659	0.56	3.25	17	14
acetonitrilo	447 [40 500]	484	1 912	0.49	3.61	14	14
acetona	447 [43 100]	485	1 812	0.57	3.50	16	12
THF	452 [46 600]	485	1 543	0.57	3.25	18	13
EtOAc	449 [42 900]	484	1 661	0.55	3.10	18	15
tolueno	450 [41 200]	487	1 702	0.54	2.89	19	16
n-hexano	450 [n. d.]	483	1 557	0.29	3.14	9.2	23

BAI

Tabla 4.7. Propiedades fotofísicas del colorante **BAI-5** en diferentes disolventes.

	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm) [ϵ (M^{-1} cm^{-1})]	$\lambda_{\text{fluo, max}}$ (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	Φ_{fluo}	τ (ns)	$10^7 \times$ k_r (s^{-1})	$10^7 \times$ k_{nr} (s^{-1})
BAI-5							
DMSO	418 [16 000]	530	5 397	0.59	5.68	10	7.2
acetonitrilo	414 [15 300]	522	5 268	0.47	5.86	8.0	9.0
acetona	414 [17 700]	509	4 940	0.54	5.37	10	8.6
THF	418 [14 000]	504	4 281	0.59	4.99	12	8.2
EtOAc	417 [14 600]	499	4 207	0.55	4.87	11	9.2
tolueno	422 [13 700]	493	3 562	0.54	4.35	12	11
n-hexano	422 [16 400]	476	3 200	0.52	4.62	11	10

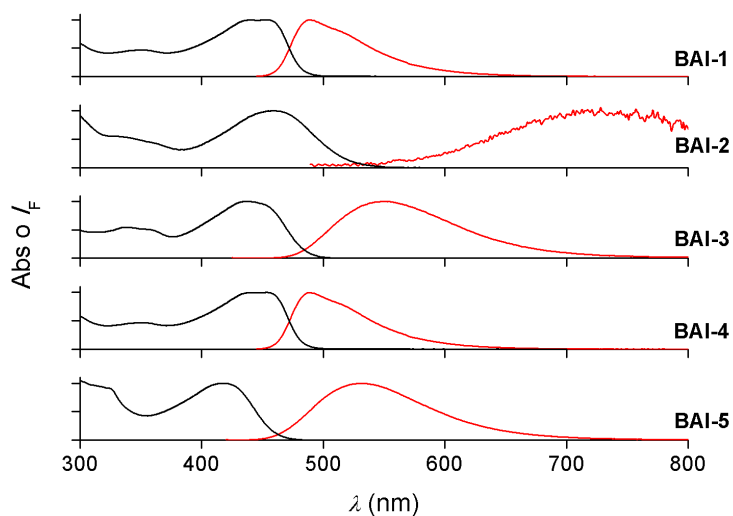


Figura 4.11. Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del **BAI-1** al **BAI-5**, en el disolvente DMSO.

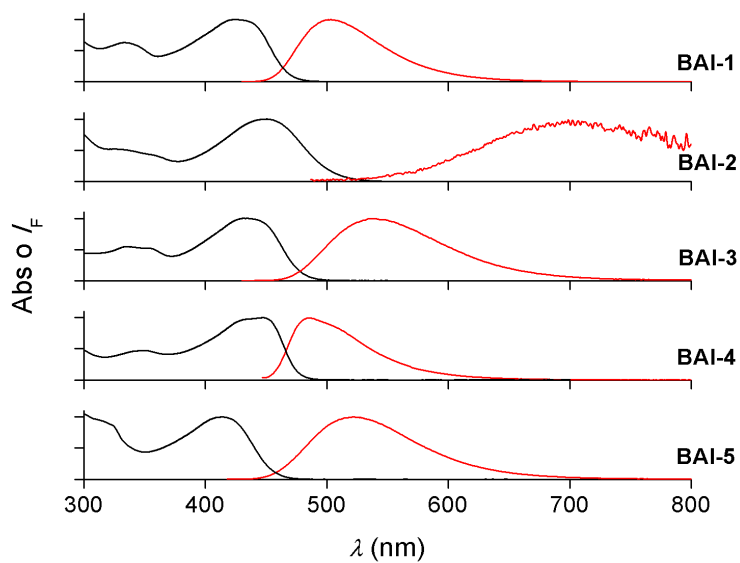


Figura 4.12. Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del **BAI-1** al **BAI-5**, en el disolvente acetonitrilo.

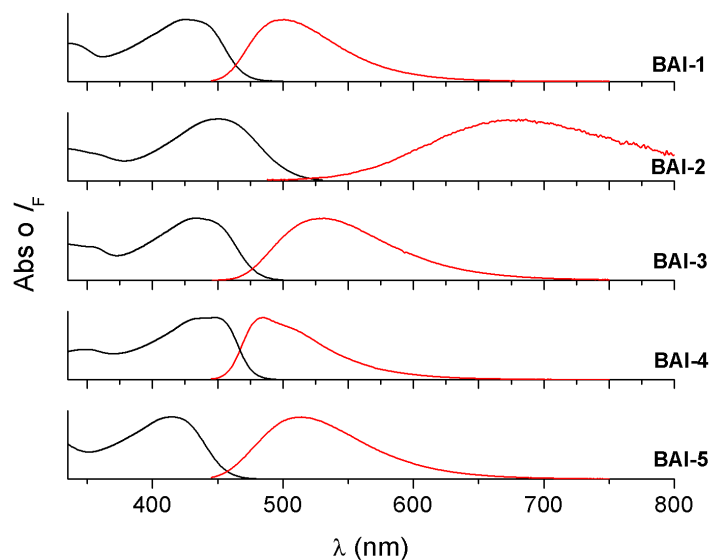


Figura 4.13. Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del **BAI-1** al **BAI-5**, en el disolvente acetona.

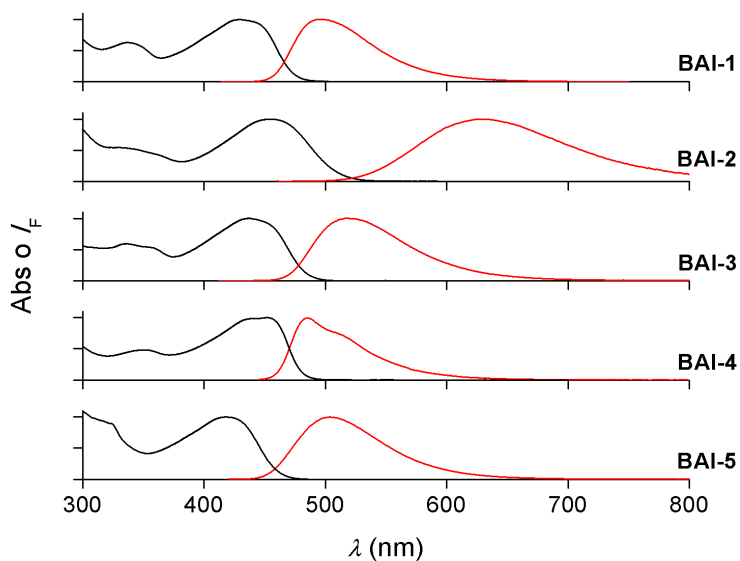


Figura 4.14. Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del **BAI-1** al **BAI-5**, en el disolvente THF.

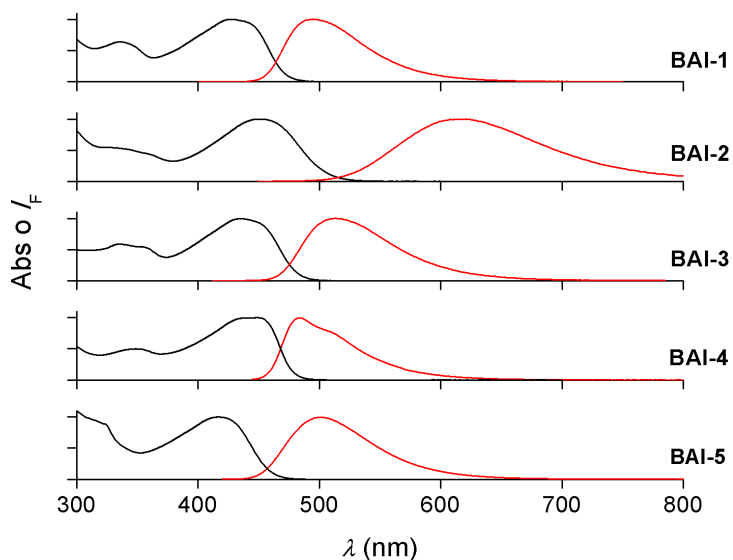


Figura 4.15. Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del **BAI-1** al **BAI-5**, en el disolvente acetato de etilo.

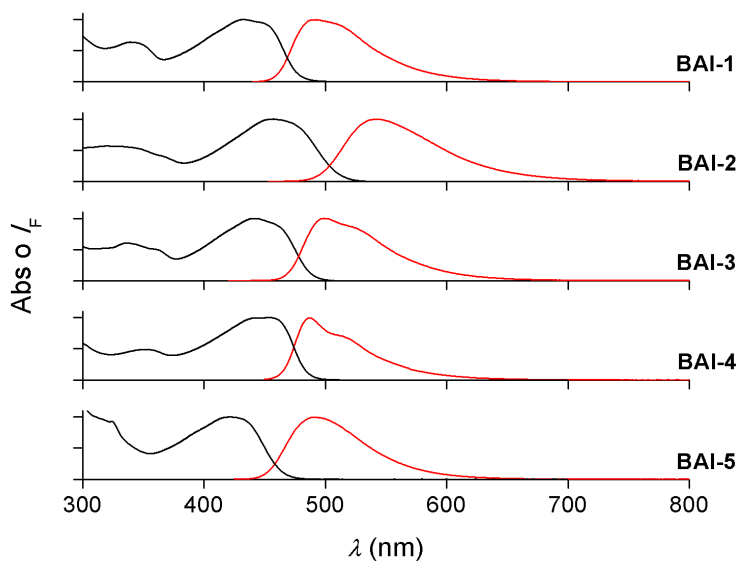


Figura 4.16. Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del **BAI-1** al **BAI-5**, en el disolvente tolueno.

BAI

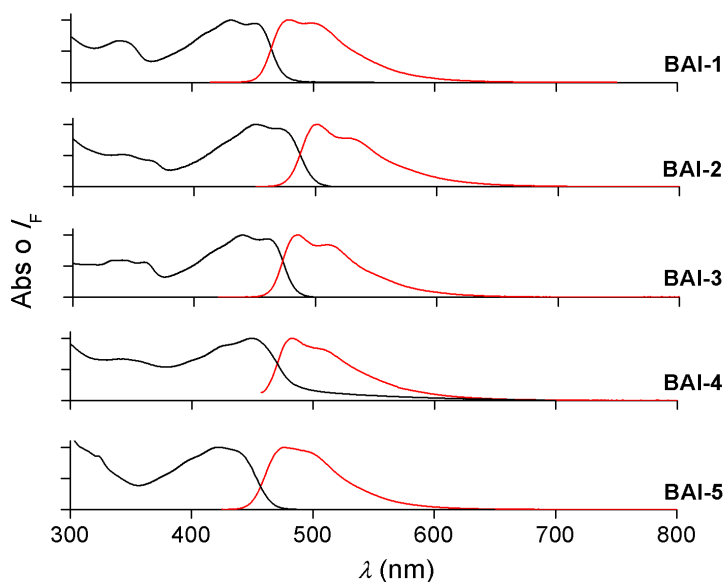


Figura 4.17. Espectros de absorción UV/vis (negro) y de emisión de fluorescencia (rojo) de los colorantes del **BAI-1** al **BAI-5**, en el disolvente *n*-hexano.

4.12. ANEXO EXPERIMENTAL

Todas las reacciones mostradas en este capítulo se llevaron a cabo en tubos de Schlenk, secados en estufa bajo atmósfera de argón. Tanto los reactivos como los disolventes que se utilizaron en la síntesis son comerciales (excepto que se indique lo contrario en la descripción) y se compraron con la más alta calidad disponible. Al igual que el anterior capítulo, se obtuvo el THF anhidro utilizando columnas de secado con disolvente de tipo Grubbs. El sustrato de arilisoquinolina de partida **BAI-6** y el reactivo Mes_2BF se sintetizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura^{15,45}.

Las medidas realizadas de absorción UV/vis y fluorescencia se realizaron en disolventes orgánicos diferentes (DMSO, acetonitrilo, acetona, THF, EtOAc, tolueno y *n*-hexano) y se compraron en calidad espectroscópica. Las

concentraciones utilizadas de los compuestos fueron aproximadamente de 10 μM , asegurando que la absorbancia a la longitud de onda de excitación no excediera de 0.2 para cubetas rectangulares de cuarzo de 1.0 cm de camino óptico. Los espectros de absorción UV/vis se registraron con un espectrómetro Cary50 UV/vis (Varian). Mientras que los espectros de fluorescencia de estado estacionario se obtuvieron con un fluorímetro estándar (Varian Cary Eclipse) con una lámpara de xenón pulsada. Los espectros de excitación se registraron para verificar la autenticidad de la emisión observada. Los espectros de excitación y emisión fueron corregidos dependiendo de la sensibilidad del fotomultiplicador. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los colorantes de este capítulo se determinaron con quinín sulfato ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.55$ en 0.05 M H_2SO_4) y 4-amino-*N*-propil-1,8-naftalimina ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.48$ en acetonitrilo) como estándares de referencia y fueron corregidos con las diferencias entre los índices refractivos de los disolventes de las muestras y la referencia. El tiempo de vida media de la fluorescencia en nanosegundos es medida por el recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente, con un error del 5 %. Se aplicó un ajuste biexponencial para todos los compuestos en todos los medios estudiados, sólo mostrando el componente del decaimiento principal. Se utilizó un láser de diodo pulsado de picosegundos empleado como fuente de excitación (EPL-445, $\lambda_{\text{exc}} = 442.2$ nm, ancho de pulso 78.3 ps) y el ajuste de las trazas de decaimiento cinético se realizó por desconvolución de la función de respuesta del instrumento. Se realizó en un Edinburgh Instruments con equipo fluorescente FS920.

Con respecto a las medidas de *cross sections* (TPA) de los colorantes se determinaron por el método de «fluorescencia inducida por dos fotones» y se realizaron en tolueno con una concentración que oscila entre 5–10 μM . Los espectros de emisión se midieron en cubetas de cuarzo de alta precisión Suprasil de 2.0 mm de camino óptico y se empleó excitaciones de dos fotones entre 700

BAI

y 1000 nm. Se registró en un instrumento Leica SP5 AOBS MP, equipado con un láser MaiTai Ti:Sapphire HP (Spectra-Physics, Inc.) como fuente de excitación. En la detección de la emisión se utilizó una ventana espectral dinámica de 15 nm de ancho que se movió en 18 pasos entre 400 y 670 nm. La rodamina G se empleó como referencia, con una concentración de 5 μM en metanol, en condiciones experimentalmente idénticas. Todas las mediciones se realizaron con unas potencias de láser que aseguraron la absorción de dos fotones.

4.13. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4891-4932.
- [2] Frath, D.; Massue, J.; Ulrich, G.; Ziessel, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2014**, *53*, 2290-2310.
- [3] Ji, L.; Griesbeck, S.; Marder, T. B. *Chem. Sci.*, **2017**, *8*, 846-863.
- [4] Wakamiya, A.; Taniguchi, T.; Yamaguchi, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2006**, *45*, 3170-3173.
- [5] Zheng, Q.; Xu, G.; Prasad, P. N. *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 5812-5819.
- [6] Didier, P.; Ulrich, G.; Mély, Y.; Ziessel, R. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 3639-3642.
- [7] Bozdemir, O. A.; Guliyev, R.; Buyukcakir, O.; Selcuk, S.; Kolemen, S.; Gulseren, G.; Nalbantoglu, T.; Boyaci, H.; Akkaya, E. U. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 8029-8036.
- [8] Rao, Y. L.; Wang, S. *Inorg. Chem.*, **2011**, *50*, 12263-12274.
- [9] Niu, S. I.; Massif, C.; Ulrich, G.; Renard, P. Y.; Romieu, A.; Ziessel, R. *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 7229-7242.

- [10] Erbas-Cakmak, S.; Bozdemir, O. A.; Cakmak, Y.; Akkaya, E. U. *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 858-862.
- [11] Kolemen, S.; Işık, M.; Kim, G. M.; Kim, D.; Geng, H.; Buyuktemiz, M.; Karatas, T.; Zhang, X.-F.; Dede, Y.; Yoon, J.; Akkaya, E. U. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2015**, *54*, 5340-5344.
- [12] Bonn, A. G.; Wenger, O. S. *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 4097-4107.
- [13] Kowada, T.; Maeda, H.; Kikuchi, K. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 4953-4972.
- [14] Mellerup, S. K.; Li, C.; Wang, X.; Wang, S. *J. Org. Chem.*, **2018**, *83*, 11970-11977.
- [15] Pais, V. F.; Alcaide, M. M.; López-Rodríguez, R.; Collado, D.; Nájera, F.; Pérez-Inestrosa, E.; Álvarez, E.; Lassaletta, J. M.; Fernández, R.; Ros, A.; Pischel, U. *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 15369-15376.
- [16] Zhang, Z.; Edkins, R. M.; Nitsch, J.; Fucke, K.; Eichhorn, A.; Steffen, A.; Wang, Y.; Marder, T. B. *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 177-190.
- [17] Pais, V. F.; Ramírez-Lopez, P.; Romero-Arenas, A.; Collado, D.; Nájera, F.; Pérez-Inestrosa, E.; Fernández, R.; Lassaletta, J. M.; Ros, A.; Pischel, U. *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 9605-9611.
- [18] Santos, F. M. F.; Rosa, J. N.; Candeias, N. R.; Parente Carvalho, C.; Matos, A. I.; Ventura, A. E.; Florindo, H. F.; Silva, L. C.; Pischel, U.; Gois, P. M. P. *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 1631-1637.
- [19] Collot, M.; Fam, T. K.; Ashokkumar, P.; Faklaris, O.; Galli, T.; Danglot, L.; Klymchenko, A. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 5401-5411.
- [20] Lippert, E. *Z. Naturforsch. A* **1955**, *10*, 541-545.
- [21] Mataga, N.; Kaifu, Y.; Koizumi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1955**, *28*, 690-691.

BAI

- [22] Mataga, N.; Kaifu, Y.; Koizumi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1956**, *29*, 465-470.
- [23] Kamlet, M. J.; Abboud, J.-L. M.; Abraham, M. H.; Taft, R. W. *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 2877-2887.
- [24] Zhang, X.; Xiao, Y.; Qi, J.; Qu, J.; Kim, B.; Yue, X.; Belfield, K. D. *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 9153-9160.
- [25] Casida, M. E., Time-Dependent Density Functional Response Theory for Molecules. In *Recent Advances in Density Functional Methods*, Chong, D. P., Ed. World Scientific: Singapore, **1995**; Vol. 1, pp 155-192.
- [26] Adamo, C.; Jacquemin, D. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 845-856.
- [27] Pawlicki, M.; Collins, H. A.; Denning, R. G.; Anderson, H. L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2009**, *48*, 3244-3266.
- [28] Reinhardt, B. A.; Brott, L. L.; Clarson, S. J.; Dillard, A. G.; Bhatt, J. C.; Kannan, R.; Yuan, L.; He, G. S.; Prasad, P.N. *Chem. Mater.*, **1998**, *10*, 1863-1874.
- [29] Kogej, T.; Beljonne, D.; Meyers, F.; Perry, J. W.; Marder, S. R.; Brédas, J. L. *Chem. Phys. Lett.*, **1998**, *298*, 1-6.
- [30] Albota, M.; Beljonne, D.; Brédas, J. L.; Ehrlich, J. E.; Fu, J. Y.; Heikal, A. A.; Hess, S. E.; Kogej, T.; Levin, M. D.; Marder, S. R.; McCord-Maughon, D.; Perry, J. W.; Röckel, H.; Rumi, M.; Subramaniam, G.; Webb, W. W.; Wu, X. L.; Xu, C. *Science*, **1998**, *281*, 1653-1656.
- [31] Rumi, M.; Ehrlich, J. E.; Heikal, A. A.; Perry, J. W.; Barlow, S.; Hu, Z.; McCord-Maughon, D.; Parker, T. C.; Röckel, H.; Thayumanavan, S.; Marder, S. R.; Beljonne, D.; Brédas, J. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 9500-9510.
- [32] Ventelon, L.; Charier, S.; Moreaux, L.; Mertz, J.; Blanchard-Desce, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2001**, *40*, 2098-2101.

[33] Chung, S. J.; Rumi, M.; Alain, V.; Barlow, S.; Perry, J. W.; Marder, S. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 10844-10845.

[34] Griesbeck, S.; Michail, E.; Rauch, F.; Ogasawara, H.; Wang, C.; Sato, Y.; Edkins, R.; Zhang, Z.; Taki, M.; Lambert, C.; Yamaguchi, S.; Marder, T. B. *Chem. Eur. J.*, **2019**, 2927.

[35] Chung, S. J.; Kim, K. S.; Lin, T. C.; He, G. S.; Swiatkiewicz, J.; Prasad, P. N. *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 10741-10745.

[36] Colling, J. C.; Poon, S. Y.; Le Droumaguet, C.; Charlot, M.; Katan, C.; Pålsson, L. O.; Beeby, A.; Mosely, J. A.; Kaiser, H. M.; Kaufmann, D.; Wong, W. Y.; Blanchard-Desce, M.; Marder, T. B. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 198-208.

[37] Le Droumaguet, C.; Sourdon, A.; Genin, E.; Mongin, O.; Blanchard-Desce, M. *Chem. Asian J.*, **2013**, *8*, 2984-3001.

[38] Chen, P.; Marshall, A. S.; Chi, S. H.; Yin, X.; Perry, J. W.; Jäkle, F. *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 18237-18247.

[39] Liu, Z. Q.; Shi, M.; Li, F. Y.; Fang, Q.; Chen, Z. H.; Yi, T.; Huang, C. H. *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 5481-5484.

[40] Griesbeck, S.; Michail, E.; Wang, C.; Ogasawara, H.; Lorenzen, S.; Gerstner, L.; Zang, T.; Nitsch, J.; Sato, Y.; Bertermann, R.; Taki, M.M Lambert, C.; Yamaguchi, S.; Marder, T. B. *Chem. Sci.*, **2019**, *10*, 5405-5422.

[41] Liu, Z. Q.; Fang, Q.; Wang, D.; Xue, G.; Yu, W. T.; Shao, Z. S.; Jiang, M. H. *Chem. Comm.*, **2002**, 2900-2901.

[42] Liu, Z. Q.; Fang, Q.; Wang, D.; Cao, D. X.; Xue, G.; Yu, W. T.; Lei, H. *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 5074-5084.

[43] Entwistle, C. D.; Collings, J. C.; Steffen, A.; Pålsson, L. O.; Beeby, A.; Albesa-Jové, D.; Burke, J. M.; Batsanov, A. S.; Howard, J. A. K.; Mosely, J. A.; Poon, S. Y.;

BAI

Wong, W. Y.; Ibersiene, F.; Fathallah, S.; Boucekkine, A.; Halet, J. F.; Marder, T. *B. J. Mater. Chem.*, **2009**, *19*, 7532-7544.

[44] Ji, L.; Fang, Q.; Yuan, M. S.; Liu, Z. Q.; Shen, Y. X.; Chen, H. F. *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 5192-5195.

[45] Ji, L.; Edkins, R. M.; Sewell, L. J.; Beeby, A.; Batsanov, A. S.; Fucke, K.; Drafz, M.; Howard, J. A. K.; Moutounet, O.; Ibersiene, F.; Boucekkine, A.; Furet, E.; Liu, Z. Q.; Halet, J. F.; Katan, C.; Marder, T. B. *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 13618-13635.

[46] Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 2999-3093.

[47] Martin, R. L. *J. Chem. Phys.*, **2003**, *118*, 4775-4777.

[45] Eisch, J. J.; Shafii, B.; Odom, J. D.; Rheingold, A. L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 1847- 1853.

[46] Lippert, E. Z. *Electrochemistry*, **1957**, *61*, 962-975.

[47] Mataga, N.; Kaifu, Y.; Koizumi, M. *Bull. Chem. Soc.*, **1956**, *29*, 465-470.



5

**BASHY-BODIPY.
COLORANTES ORGANOBORO CON
TRANSFERENCIA DE ENERGÍA
ALTAMENTE EFICIENTE**

5

BASHY-BODIPY.**Colorantes organoboro con transferencia de energía altamente eficiente****5.1. SINOPSIS**

En este capítulo se presenta el estudio de nuevos colorantes organoboro *N,O*-tetracoordinados con capacidad de implicarse en procesos de transferencia de energía. Estos compuestos poseen una estructura principal de ácido borónico junto con un sistema de ligando de salicilidenhidrazona, llamados abreviadamente BASHY. Como se ha adelantado en el Capítulo 1 de esta memoria (Introducción), estos compuestos son cromóforos con flexibilidad funcional debido a su papel modulable como donador o aceptor de energía, normalmente formado por díadas bicromofóricas compactas y no conjugadas. La transferencia de energía aquí estudiada es muy eficiente ($\Phi_{ET} > 0.95$). Gracias a la integración en «casetes» de transferencia de energía, se producen unos beneficios mutuos como son:

- i. Se produce un incremento en el pseudo-desplazamiento de Stokes de unos 110–200 nm.
- ii. El cromóforo de la antena, es decir, el que actúa como donador de energía mejora la absorción de luz del cromóforo aceptor.
- iii. Y, en tercer lugar, la ventana de la emisión de fluorescencia del cromóforo BASHY se expande al formarse el colorante combinado (BASHY-BODIPY), observándose rendimientos cuánticos de fluorescencia altos.

BASHY-BODIPY

Estos casetes mencionados anteriormente pueden ser establecidos como nanopartículas poliméricas fluorescentes, y se aplican incubándolas en células, observando las imágenes celulares fluorescentes de éstas, utilizando el colorante mixto BASHY-BODIPY como ejemplo.

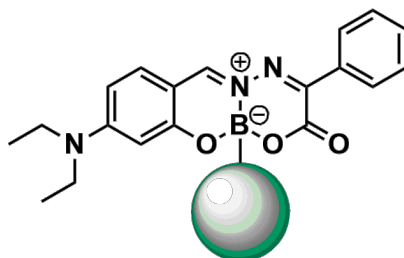


Figura 5.1. Representación de la estructura general del colorante BASHY.

El capítulo está basado en el artículo «*Highly Efficient Energy Transfer Cassettes by Assembly of Boronic Acid Derived Salicylidenehydrazone Complexes*. F. M. Santos, Z. Domínguez, M. M. Alcaide, A. I. Matos, H. F. Florindo, N. R. Candeias, P. M. P. Gois, U. Pischel. *ChemPhotoChem*, **2018**, 2, 1038–1045».

5.2. INTRODUCCIÓN

Como se ha avanzado en el primer capítulo de la memoria, la familia de colorantes BASHY exhibe mayoritariamente una emisión dependiente de la polaridad del medio donde se encuentre, normalmente en el rango espectral de verde a amarillo, presentando unos rendimientos cuánticos de fluorescencia de hasta 0.6 en disolventes no polares y un brillo notable similar a otros fluoróforos con estructuras semejantes¹. Asimismo, los compuestos BASHY exhiben una estructura muy modular que se puede ajustar fácilmente para utilizarlos en diversas aplicaciones¹⁹.

Por otra parte, las reacciones multicomponentes tienen cada vez un mayor potencial puesto que son utilizadas para la obtención de estas nuevas estructuras de fluoróforos multifuncionales²⁻⁴. Se denomina reacción multicomponente (MCR) al proceso en el cual al menos tres o más reactivos forman un aducto final a través de un mecanismo único, en un procedimiento que se denomina *one-pot*⁵. Las MCRs presentan muchas mejoras en comparación con la síntesis clásica, puesto que en las MCRs el producto final se obtiene utilizando una secuencia multietapa con la formación de un solo enlace en cada paso individual.

En la siguiente figura se comparan una ruta sintética clásica (Figura 5.2a) y otra multicomponente (Figura 5.2b). En base a la comparación se puede suponer que, en una síntesis clásica el rendimiento global de las reacciones producidas mayoritariamente es menor que el rendimiento de una sola reacción multicomponente. Además, las MCRs son métodos muy eficaces que desempeñan reacciones con buena velocidad, diversidad molecular y tienen la capacidad de obtener compuestos altamente funcionales llevándose a cabo transformaciones simples y directas, es decir, en una sola etapa. Al fin y al cabo, este tipo de reacciones son procedimientos versátiles para la síntesis de esqueletos heterocíclicos con patrones de sustitución variable^{2,6-9}.

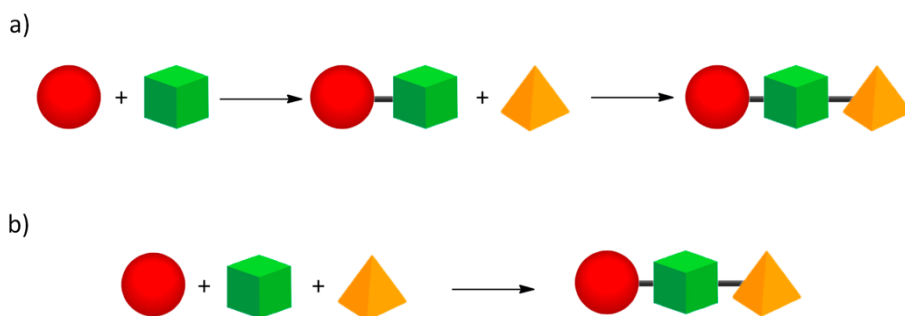


Figura 5.2. Comparación a) síntesis clásica y b) síntesis multicomponentes.

BASHY-BODIPY

El empleo de esta metodología supone una gran expansión para este tipo de Química, la de nuevos fluoróforos multifuncionales⁴. Y, sobre todo, permite la optimización basada en su modulación estructural, viéndose las propiedades de los compuestos propicias para aplicaciones en bioimagen y detección¹⁰⁻¹⁶. Nuestro grupo de investigación en colaboración con el grupo del Prof. P. Gois (Universidad de Lisboa) ha contribuido a esta moderna tendencia de la Química de los colorantes multifuncionales con el desarrollo sintético y funcionalmente flexible¹⁷⁻¹⁹ de nuevos compuestos tipo BASHY. Fundamentalmente, se basa en reacciones de condensación directas de múltiples componentes, empleando hidrazonas y ácidos borónicos. Como es de suponer, estos colorantes BASHY tienen un gran potencial para ser aplicados en bioimagen^{17,20,21}.

Una de las facetas más significativas del campo de la fotofísica de estos fluoróforos es su integración en casetes de transferencia de energía (ETC)²²⁻²⁷. Concretamente, se nombra «casete» a todo compuesto formado por la unión de dos o más cromóforos en el que uno de ellos interviene como donador, el cual tras ser excitado a una cierta longitud de onda transfiere la energía al otro cromóforo que actuará como aceptor. Este proceso de transferencia de energía de excitación (EET o *Excitation Energy Transfer*) puede tener lugar por dos mecanismos, como es la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) o por la transferencia de energía a través de enlace (TBET). Observar la Figura 1.3 del primer capítulo introductorio de esta memoria. Esta propiedad característica en sus estructuras permite la mejora fotofísica de los colorantes llegando a un aumento en el pseudo-desplazamiento de Stokes y una absorción o emisión de luz más eficiente, es decir, un «brillo más alto».

Como se menciona anteriormente, estas características contribuyen de manera significativa a las propiedades fotofísicas y permiten por lo tanto poder aplicar estos compuestos en contextos biorelevantes¹. Los colorantes utilizados como ETC se usan en múltiples aplicaciones como: uso en detección²⁶⁻²⁸, en

microscopía de fluorescencia^{26,29-31}, en aplicaciones láser^{32,33}, para etiquetado multicolor en microesferas codificadas³⁴ y en dispositivos teranósticos^{35,36}.

El enlace donador-aceptor que se encuentra en este tipo de estructuras se crea a menudo empleando reacciones de acoplamiento catalizadas por un metal como, por ejemplo, la reacción de tipo *click* catalizada por Cu o el acoplamiento de Sonogashira catalizado por Pd. Sin embargo, estos métodos habitualmente implican la realización de protocolos de purificación laboriosos, debido a que las trazas de catalizador metálico en el producto final pueden causar un *quenching* de la fluorescencia no deseado. Por ello, el desarrollo de alternativas sintéticas sin uso de metales continúa siendo un desafío en esta área.

El ETC obtenido en este estudio presenta una eficiente transferencia de energía que puede ser utilizado para diferentes escenarios de donadores-aceptores, enfatizando la flexibilidad de las propiedades fotofísicas de las estructuras de los colorantes tipo BASHY para el diseño de estos componentes.

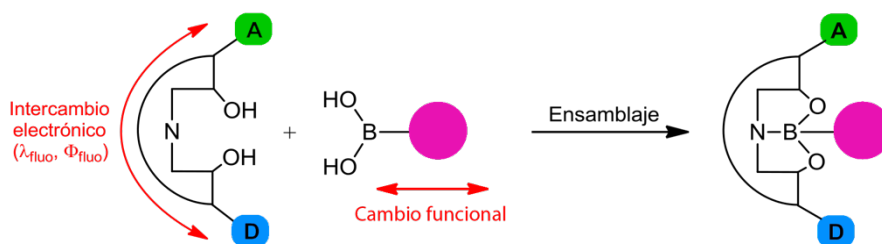


Figura 5.3. Representación de la diversidad estructural de los colorantes BASHY. Imagen adaptada ref. 19.

5.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El procedimiento experimental empleado en este capítulo se encuentra más detallado en la información adicional del propio manuscrito. En este apartado, se describe brevemente los aspectos relacionados con el enfoque experimental.

BASHY-BODIPY

Inicialmente, se diseñaron y sintetizaron una serie de compuestos organoboro tipo BASHY-Cumarina y BASHY-BODIPY, que darán enfoque a este proyecto. El primer compuesto utilizado tipo BASHY-Cumarina se abrevian como **BC-1**, mientras que el compuesto BASHY-BODIPY como **BB-3**.

Como se puede observar en la Figura 5.4, estos compuestos tienen en común su estructura organoborónica tipo BASHY, estando la primera estructura de la serie **BC-1** unida a un esqueleto tipo cumarina, que como se comenta en el primer capítulo introductorio de esta memoria, pertenece a la familia de las benzopironas y se trata también de un colorante orgánico muy utilizado en fluorescencia. Por otra parte, el compuesto **BB-3** contiene acopladas dos estructuras organoborónicas típicas y muy eficientes en cuanto a sus propiedades fotofísicas, como son las estructuras tipo BASHY y tipo BODIPY.

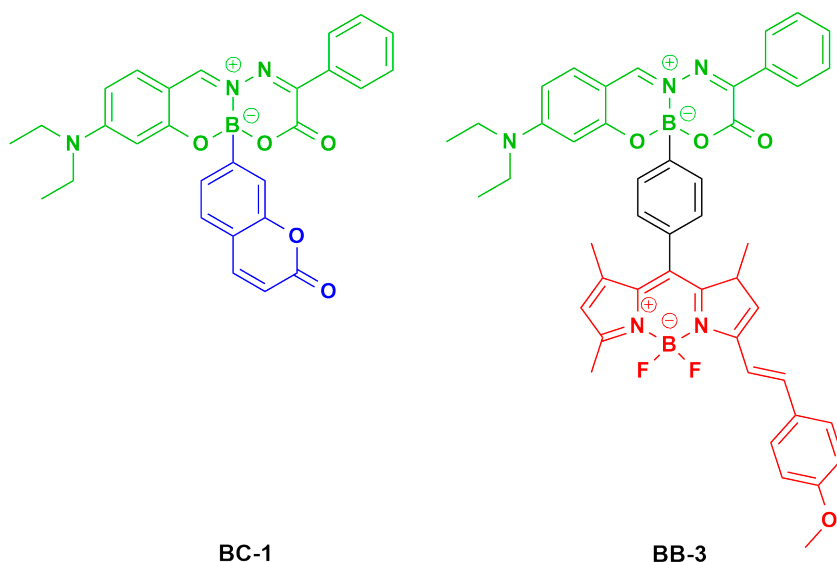


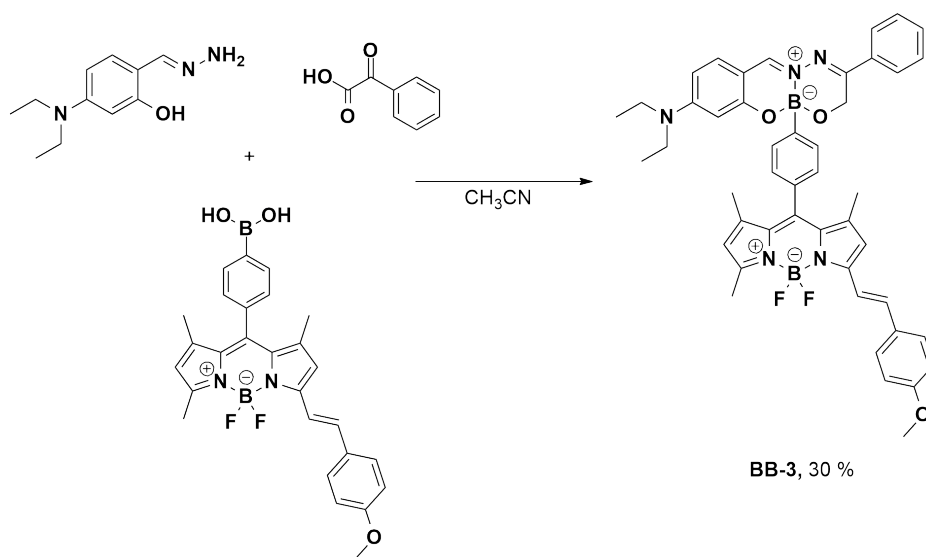
Figura 5.4. Estructuras de estudio: tipo BASHY-Cumarina (**BC-1**) y tipo BASHY-BODIPY (**BB-3**). Los colores muestran las partes cromofóricas: BASHY (verde), Cumarina (azul) y BODIPY (rojo).

5.4. SÍNTESIS Y PROPIEDADES FOTOFÍSICAS

Los compuestos tipo BASHY que se muestran en este capítulo fueron sintetizados en colaboración con el Instituto de Investigación para Medicinas de la Universidad de Lisboa (iMed.Ulissboa). A continuación, se describirá brevemente la síntesis de los compuestos diseñados^c.

5.4.1. SÍNTESIS Y PROPIEDADES FOTOFÍSICAS DE BB-3

El Esquema 5.1. recoge la ruta sintética llevada a cabo para el compuesto BASHY-BODIPY, es decir, el **BB-3**.



Esquema 5.1. Síntesis del compuesto **BB-3**.

El colorante **BB-3** se prepara mediante reacción de condensación entre el ligando de salicilidenhidrazona y un colorante BODIPY modificado previamente con un ácido borónico¹⁹. Como se menciona anteriormente en el apartado de

^c La descripción de manera más detallada se puede encontrar en la información complementaria del artículo científico publicado en *ChemPhotoChem*, **2018**, *2*, 1038–1045.

BASHY-BODIPY

Introducción, se trata de una reacción multicomponente y no de una síntesis clásica compuesta por tres reacciones como sucede para la síntesis de otros colorantes BASHY¹⁷. El hecho que se haya elegido una parte cromofórica tipo BODIPY es para aprovechar sus propiedades como cromóforo aceptor. Se trata de una interesante opción para que el colorante mixto se comporte como un casete de transferencia de energía (ETC). En la bibliografía se pueden encontrar compuestos destinados para ETC que contienen propiedades de absorción y emisión favorables, es decir, unos altos coeficientes de absorción molar como también unos altos rendimientos cuánticos de emisión^{22,23,37,38}.

Las principales medidas de las propiedades fotofísicas de los colorantes se recogen en la Tabla 5.1. El compuesto **BB-3** presenta un espectro de absorción UV/vis con las típicas bandas intensas para ambos fragmentos cromóforos, tanto para la parte BASHY como para la BODIPY (ver Figura 5.5). Por ende, muestra una banda con un máximo a 473 nm, correspondiente a la estructura típica de BASHY^{17,19} y una banda con un máximo a 572 nm que es característica del cromóforo típico BODIPY³⁷. Este hecho señala que ambas unidades de los cromóforos no están conjugadas. El espectro de absorción del cromóforo BASHY no coincide con el del BODIPY, es decir, su banda aparece entre 410–490 nm, donde su absorbancia es menor del 5 % en el punto en el que se encuentra el máximo de la banda del BODIPY (ver Tabla 5.1 y Figura 5.5). Esto llega a permitir la excitación selectiva y el uso de fuentes láser comerciales, como es el láser de iones de argón a 488 nm.

Tabla 5.1. Propiedades fotofísicas de los colorantes bicromóforicos **BC-1** y **BB-3**, además de sus partes cromofóricas individuales.

	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm) ^[a] [ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)]	$\Delta\nu$ (cm^{-1}) ^[b]	$\lambda_{\text{fluo, max}}$ (nm) ^[c]	Φ_{fluo} ^[d]	τ (ns) ^[e]
BB-3 ^[f]	473 [52 000] 572 [74 000]	3 990	582	0.76	3.70
BODIPY ^[f]	574 [75 000]	340	586	0.78	4.04
BASHY ^[f]	471 [63 000]	1 580	508	0.60	2.38
Cumarina ^[g]	323 [4 100]	-	-	-	-
BC-1 ^[g]	320 [13 700] 479 [71 400]	11 980	519	0.69	10.53

[a] Máximo de absorción UV/vis, entre corchetes se muestra el coeficiente de absorción molar ϵ en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. [b] Desplazamiento de Stokes. [c] Máximo de emisión de fluorescencia. [d] Rendimiento cuántico de fluorescencia, con un error del 15%. Se midió con 4-amino-*N*-propil-1,8-naftalimida ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.48$ en acetonitrilo)¹⁵ o rodamina B ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.95$ en etanol) como referencia y corregido para las diferencias entre los índices de refracción de los disolventes usados, respectivamente. [e] Tiempo de vida media de la fluorescencia en nanosegundos medida por recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente, con un error del 5 %. Se aplicó un ajuste biexponencial para todos los compuestos sintetizados en todos los medios estudiados. Sólo está mostrado el componente del decaimiento principal. [f] Medidas realizadas en tolueno. Los datos del colorante BASHY está recogido de la ref. 15. [g] Medidas realizadas en cloroformo.

BASHY-BODIPY

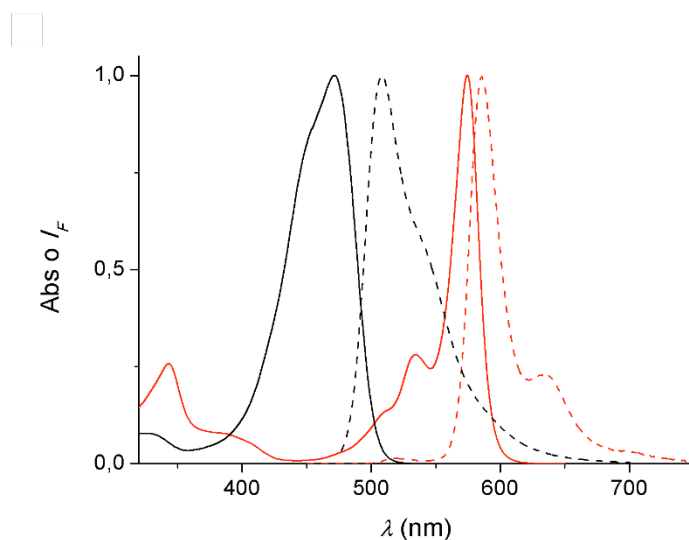


Figura 5.5. Espectros de absorción UV/vis (líneas continuas) y emisión de fluorescencia (línea discontinua) de colorante **BODIPY** (rojo) y **BASHY** (negro) en tolueno.

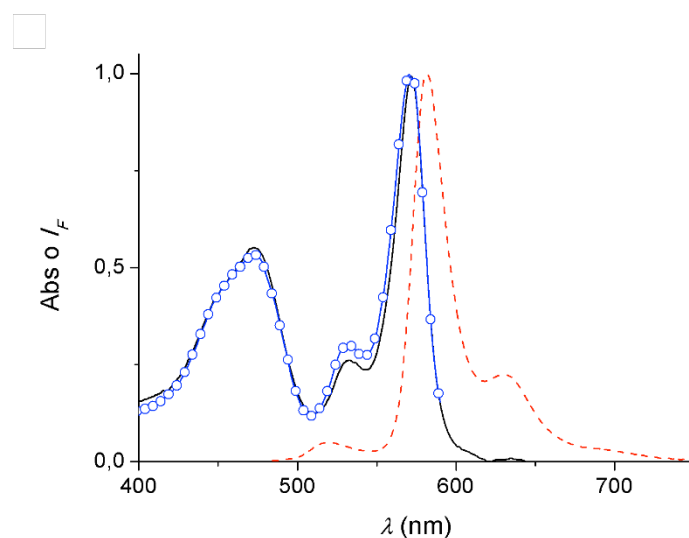


Figura 5.6. Espectros de absorción UV/vis (línea continua negra), emisión de fluorescencia (línea discontinua roja, excitando a 473 nm) de **BB-3** y excitación (línea azul), monitorizando la emisión de **BODIPY** (a 615 nm).

Por otro lado, al excitar selectivamente **BB-3** en la banda de absorción del **BODIPY** a $\lambda_{exc} > 520$ nm, se obtiene el espectro de emisión de fluorescencia típico

de esta parte cromofórica con un máximo a 582 nm y con un rendimiento cuántico de fluorescencia alto, $\Phi_{\text{fluo}} = 0.76$. Si se observa la Tabla 5.1 proporcionada anteriormente, este valor puede compararse con el del cromóforo **BODIPY** individual y se descarta el *quenching* de la fluorescencia a través del espaciador BODIPY-BASHY. Además, al excitar selectivamente a **BB-3** justo en la banda del cromóforo BASHY a 473 nm se produce prácticamente la emisión de fluorescencia de la parte BODIPY. El intenso *quenching* de la fluorescencia producido de la parte BASHY se debe a una transferencia de energía cuantitativa, $\Phi_{\text{ET}} > 95\%$. Esto también se confirma con la superposición de los espectros de absorción y excitación normalizados (monitorizando selectivamente la emisión de BODIPY) de **BB-3**, como se muestra en la Figura 5.6³⁹.

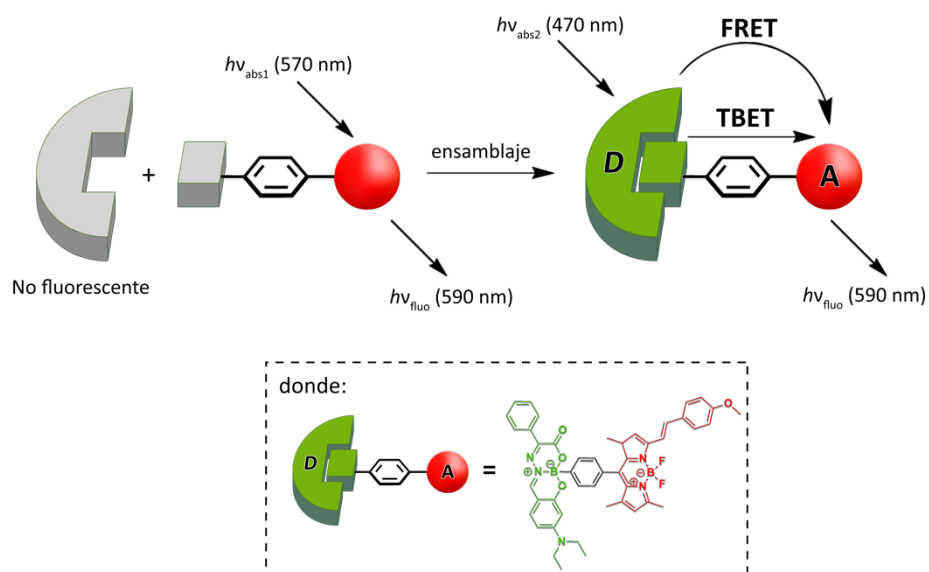


Figura 5.7. Ilustración de la idea del montaje estructural de un ETC con **BB-3**.

Para esta estructura se propone la consecución del fenómeno de transferencia de energía a través de enlaces (TTET), como se indica en la Figura 5.7, debido a que el colorante **BB-3** presenta una rigidez y una no planaridad estructural. Además, existe una marcada proximidad espacial entre ambas partes

BASHY-BODIPY

cromóforas, puesto que se encuentran unidas por el espaciador fenileno, siendo la distancia entre B-B de 8.93 Å. Por otra parte, es típico que se produzca una TBET en estructuras con ETC, donde el donador y el aceptor están unidos por un conector insaturado y, además, con un sistema que no es plano debido a un impedimento estérico^{22,28}.

Por otra parte, cabe destacar que la superposición orbital que se produce gracias a la conexión cromóforo-espaciador está cerca de cero, puesto que el espaciador fenileno asume una orientación perpendicular con respecto a los distintos planos de ambos cromóforos (ver Figura 5.8). Esta evidencia excluye la «transferencia de excitación de intercambio electrónico de Dexter»,^{40,41} como se discute en artículos publicados para una serie de compuestos con propiedades de ETC y condiciones geométricas similares^{23,42}. Esta transferencia de excitación de intercambio electrónico de Dexter se produce como resultado de un mecanismo de intercambio electrónico que requiere el solapamiento de orbitales del donador y del aceptor de energía. Se trata de un mecanismo dominante en la transferencia de energía triplete-triplete.

Así, es probable que la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET)^{41,43} funcione también en paralelo a la TBET²⁸. Todas estas evidencias han sido corroboradas por varios experimentos que se realizaron sobre este compuesto **BB-3**:

- a) Primeramente, la considerable superposición espectral, con un valor de $J = 1.6 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^6 \text{ mol}^{-1}$, entre la emisión de fluorescencia eficiente del donador y la fuerte absorción del aceptor, como muestra los espectros de líneas negras discontinuas y líneas continuas rojas de la anterior Figura 5.5.
- b) La orientación no perpendicular de los momentos dipolares de transición del donador y del aceptor.
- c) Por último, la corta distancia entre las dos mitades cromóforas. De esta manera, el radio crítico de Förster obtenido es de $R_0 = 47 \text{ Å}$, mucho más

grande que la distancia real obtenida B-B en el compuesto **BB-3** que era de 8.93 Å.

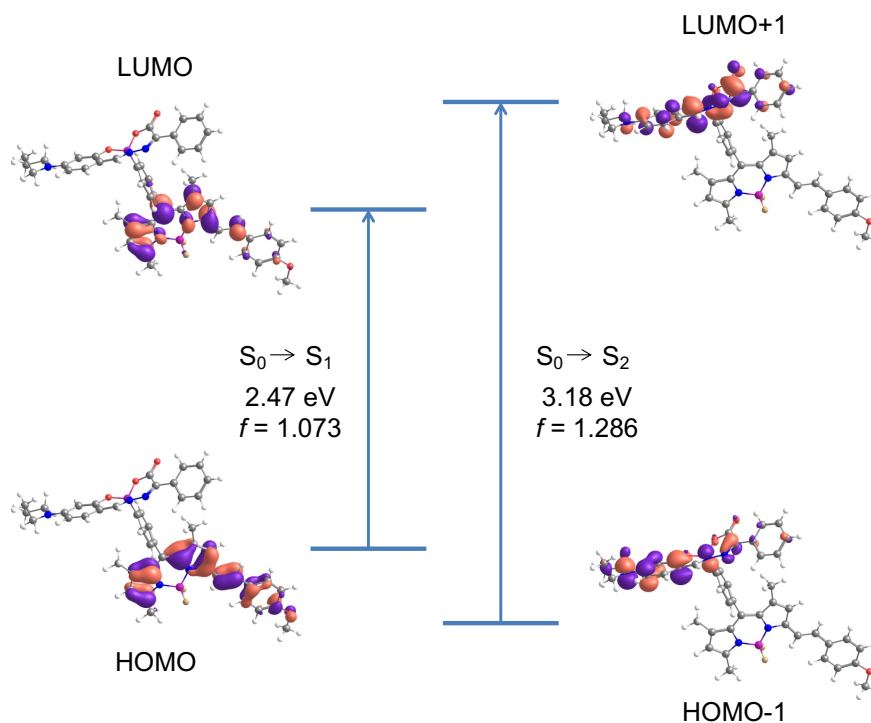


Figura 5.8. Diagrama de contorno de los principales orbitales frontera involucrados en las dos primeras transiciones electrónicas en el colorante **BB-3**.

Con todos estos datos sobre la integración de ambos cromóforos y sus resultados de ETC, se consideró que el cromóforo BODIPY en **BB-3** puede ser excitado en el rango entre 410–490 nm, aprovechando así las propiedades fotofísicas que presenta el BASHY como cromóforo antena. En conjunto, se logra que el pseudo-desplazamiento de Stokes del BODIPY aumente considerablemente de 10 nm a aproximadamente 120 nm (en términos de unidades de energía absoluta son de 340 cm^{-1} a 3990 cm^{-1}) y, la emisión de fluorescencia obtenida por excitación del cromóforo BASHY, puede desplazarse aún más hacia el rojo en comparación con el cromóforo de **BASHY** individual. En teoría, dicho desplazamiento hacia el rojo también podría lograrse aumentando

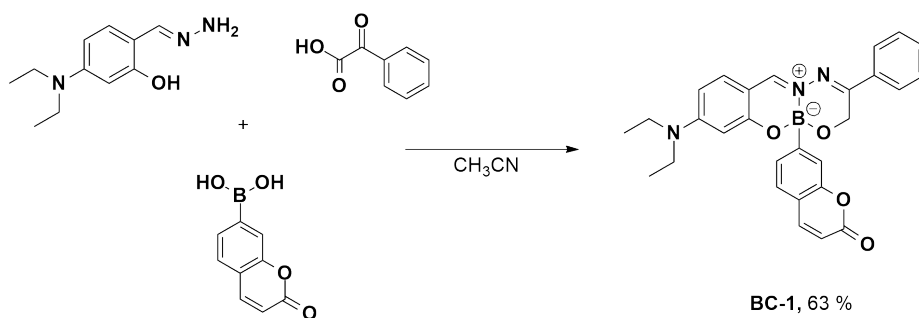
BASHY-BODIPIY

el carácter de transferencia de carga de la estructura BASHY^{17,19}. Sin embargo, el rendimiento cuántico de fluorescencia disminuye debido a la *energy-gap law*.

Por último, hacer hincapié en que los colorantes organoboro tipo BASHY son muy fotoestables durante irradiaciones prolongadas y realizadas con una lámpara de xenón de 150 W, como se ha podido demostrar para otros conjuntos de colorantes similares^{17,19}.

5.4.2. SÍNTESIS Y PROPIEDADES FOTOFÍSICAS DE BC-1

La síntesis del colorante **BC-1** se ha realizado de manera análoga al colorante **BB-3**, usando el ligando BASHY y el ácido cumarinilborónico. Su secuencia sintética se puede ver en el Esquema 5.2. El diseño de síntesis permite obtener como resultado una disposición muy compacta de ambos fluoróforos en un ETC final, puesto que ambas subestructuras se encuentran separadas simplemente por un enlace simple B-C.



Esquema 5.2. Síntesis del compuesto **BC-1**.

De nuevo la idea consistía demostrar la flexibilidad fotofísica que podían tener nuestros diseños estructurales, en este caso con el estudio de las propiedades del colorante **BC-1**. Para este compuesto concreto el cromóforo BASHY actuará como aceptor de energía en vez de donador como ocurría en **BB-3** (ver Figura 5.9 comparada con la anterior Figura 5.7). Era de esperar que esta combinación

estructural BASHY-Cumarina pudiera servir para corroborar este comportamiento, basándonos en los fundamentos fotofísicos anteriormente publicados^{33,44-46}.

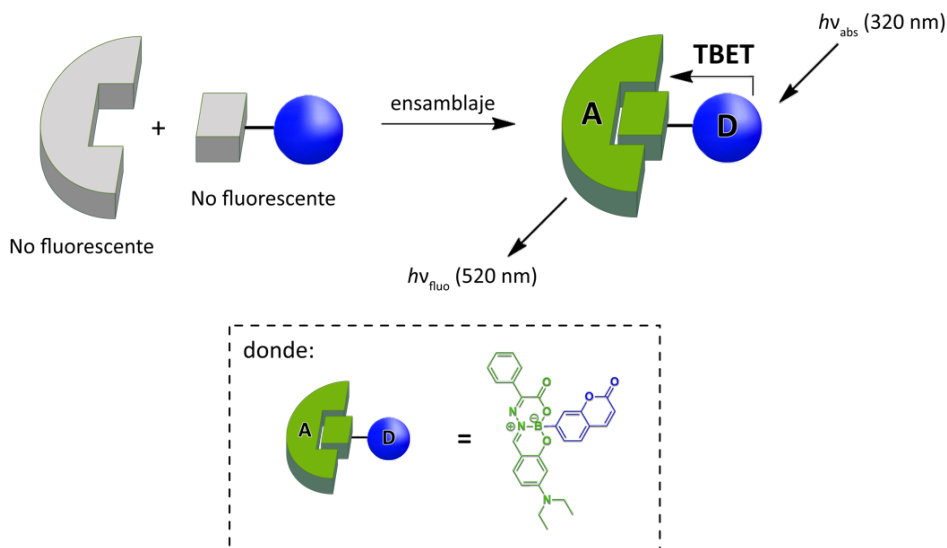


Figura 5.9. Ilustración de la idea del montaje estructural de un ETC con **BC-1**.

Como se puede observar en la anterior Tabla 5.1, se prefiere utilizar como disolvente cloroformo en vez de tolueno para las medidas experimentales fotofísicas de **BC-1**, con la intención de mejorar la transparencia óptica por debajo de los 300 nm. El espectro de absorción UV/vis del colorante **BC-1** presenta bandas características del cromóforo cumarina con máximos a 282 nm y 320 nm, así como la típica banda de absorción del cromóforo BASHY con un máximo a 479 nm. Como se observa en la Figura 5.10, el espectro de emisión representado como una línea discontinua de color rojo es menos intenso debido probablemente a la menor absorción de luz a 320 nm en comparación con 470 nm. Mientras que el espectro representado como una línea azul corresponde al espectro de excitación corregido que representa la emisión de BASHY a 550 nm.

BASHY-BODIPIY

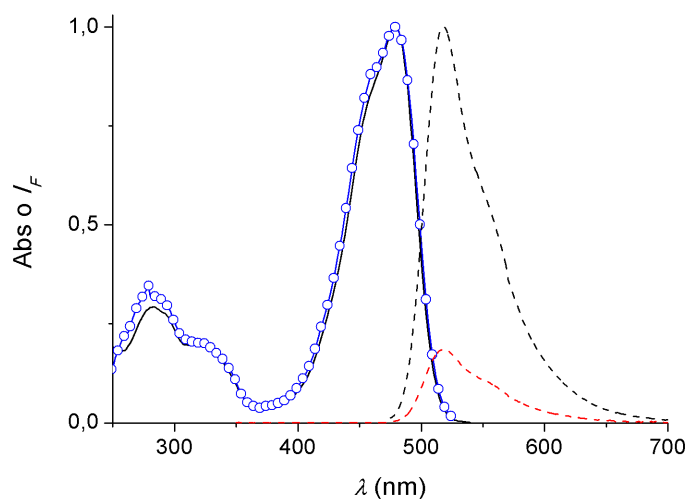


Figura 5.10. Espectros de absorción UV/vis (línea continua negra) y emisión de fluorescencia excitando a 320 nm (línea discontinua roja) y a 479 nm (línea discontinua negra) del colorante **BC-1** en cloroformo.

Al excitar selectivamente en la banda de absorción del BASHY (479 nm) se detecta una fluorescencia intensa de color verde ($\lambda_{\text{fluo,max}} = 519$ nm en cloroformo) típica de este cromóforo contenido en **BC-1**. Asimismo, al excitar en la banda de absorción de la cumarina a 320 nm se observa la misma emisión de fluorescencia de BASHY, sin observar ninguna emisión de fluorescencia de la cumarina, siendo este proceso de transferencia energética altamente eficiente. La prueba definitiva para corroborar el comportamiento según este tipo de procesos de transferencia de energía prácticamente cuantitativa ($\Phi_{\text{ET}} > 0.95$) proviene de la superposición del espectro de excitación correspondiente, es decir, la monitorización de la fluorescencia BASHY (línea color azul) y el espectro de absorción del colorante **BC-1** (línea color negra), como se puede observar en la Figura 5.10³⁹. Además, se puede apreciar claramente que las características de absorción de la cumarina se encuentran en la región de 270 y 340 nm, las cuales coinciden completamente con el espectro de excitación a 550 nm, representado de color azul en la anterior figura.

El hecho de contener el fragmento estructural cumarina en **BC-1** conduce a un aumento del pseudo-desplazamiento de Stokes de aproximadamente 200 nm frente a los 50 nm al excitar directamente en la banda de absorción del cromóforo BASHY (en términos de energía absoluta, una diferencia de 11 980 cm^{-1} frente a 1 870 cm^{-1} , respectivamente). Hay que recordar que la parte de cumarina en el colorante **BC-1**, es decir el precursor ácido cumarinilborónico para la formación de este colorante, no es fluorescente. Esta situación sería contraproducente si se pretende que se desarrolle una FRET⁴⁷. No obstante, la unión de ambas estructuras cromóforas en **BC-1** desencadena un *umpolung* (inversión de la polaridad) del ácido borónico B(OH)_2 que pasa a aceptar los electrones donados por el fragmento BO_2N^- , lo que posiblemente active la fluorescencia de la cumarina.

Al no existir características de emisión fluorescente en la cumarina inicial no es posible calcular ni el radio integral ni el crítico para el proceso de una FRET. No obstante, al no poder verificarse la FRET en este caso, es lógico suponer que exista un proceso TBET en nuestro colorante **BC-1**. Esto es debido a la unión compacta de ambos cromóforos, existiendo una distancia mínima entre ellos, pues están conectados a través de un enlace sencillo. Por tanto, se sospecha que este mecanismo de TBET no requiera una superposición espectral^{22,28}, hecho que puede ser corroborado a través de cálculos de densidad teórica funcional (DFT) que serán discutidos en el próximo apartado de este capítulo.

5.5. CÁLCULOS DE DENSIDAD TEÓRICA FUNCIONAL PARA BB-3 Y BC-1

Se pudieron llevar a cabo los cálculos teóricos de densidad funcional (DFT) y los teóricos de densidad dependientes del tiempo (TD-DFT) con el fin de obtener información adicional sobre las características fotofísicas de los colorantes que

BASHY-BODIPY

se estudian en este capítulo. Se utiliza tolueno como disolvente mediante la aplicación del modelo de polarización continua (PCM)⁴⁸.

Como se muestra en la anterior Figura 5.8 (correspondiente al colorante **BB-3**) los orbitales frontera que están implicados en las dos primeras transiciones son $S_0 \rightarrow S_1$ y $S_0 \rightarrow S_2$. Por una parte, la excitación de energía más baja ($S_0 \rightarrow S_1$) involucra principalmente a la transición HOMO \rightarrow LUMO con los orbitales fronteras ubicados exclusivamente en el cromóforo BODIPY. Por otra parte, la excitación $S_0 \rightarrow S_2$ que es energéticamente más grande implica la transición HOMO-1 \rightarrow LUMO+1, estando en este caso los orbitales localizados en el fragmento BASHY de la estructura. Para ambas subunidades cromóforas presentes en **BB-3**, los orbitales más ocupados (HOMO y HOMO-1) incluyen un grupo funcional donador de electrones: el *p*-MeO-fenilo en el BODIPY y el Et₂N-fenilo para el BASHY. Los orbitales desocupados más bajos se alejan espacialmente de los grupos donadores de electrones y se ubican en el heterociclo de BODIPY (LUMO) o se mueven a lo largo de la estructura del ligando de boro salicilidenhidrazona (LUMO+1). Estas observaciones realizadas enfatizan el carácter *push-pull* de ambas unidades cromóforas.

Otra evidencia a tener en cuenta es la separación electrónica existente en **BB-3** entre los cromóforos BASHY y BODIPY, debido a la disposición perpendicular del conector fenileno con respecto a ambos cromóforos. Este giro inducido estéricamente dificulta la comunicación electrónica π conjugada entre ellos. Por este motivo se puede definir el compuesto **BB-3** como una estructura tipo casete. En la bibliografía se puede encontrar casos similares de ETC, algunos de ellos conteniendo cromóforos con fragmentos tipo BODIPY^{22,23,25,32,33,44}.

Para el colorante **BC-1**, se efectúa un estudio similar aplicando los mismos cálculos que aquellos sobre el colorante **BB-3** y obteniéndose un comportamiento similar a éste.

5.6. USO DEL COLORANTE BB-3 EN BIOIMAGEN

Los colorantes que actúan como casetes de transferencia de energía (ETC) a menudo son utilizados en bioimagen^{29,30,49}. Se decide preparar nanopartículas poliméricas biocompatibles de PLGA/PVA cargadas con el colorante **BB-3**. Concretamente se trata de nanopartículas de un copolímetro de ácido poliláctico y ácido poliglicólico con polivinilalcohol con un tamaño medio de 219 ± 4 nm, un índice de poli-dispersidad de 0.112 ± 0.005 y un potencial zeta de -0.88 ± 0.15 , utilizando una doble emulsión (agua en aceite-en-agua: w/o/w) y evaporando el disolvente del medio⁵⁰. La justificación del uso de este método de preparación radica en sus múltiples ventajas y que, además, ha sido publicado recientemente¹⁷. Se espera que los cromóforos tipo BASHY encapsulados sean más estables contra la degradación hidrolítica, y que el entorno no polar creado por las nanopartículas haga que los cromóforos BASHY sean sustancialmente más fluorescentes, siendo esto una mejora para su cometido en los ETC.

Las nanopartículas cargadas con nuestro colorante **BB-3** se incubaron con células dendríticas de médula ósea inmaduras de murinos (subfamilia de roedores como son los ratones; exactamente se utiliza el BMDC, JAW SII, ATCC®CRL-11904™) durante 1, 3 y 18 horas para evaluar la penetración de estas nanopartículas y el impacto en la viabilidad celular por citometría de flujo. Los niveles de internalización en BMDC (98–100 % de células positivas) obtenidos con el colorante libre **BB-3** fueron similares a los observados para las nanopartículas cargadas con dicho colorante con unas 18 horas después de la incubación (ver el diagrama de barras de color violeta en la Figura 5.11a). Para los tiempos de incubación más cortos (1 y 3 horas) se obtuvieron porcentajes de niveles de internalización para las nanopartículas cargadas de colorante más bajos (63 y 88 % respectivamente) que los observados para el colorante libre **BB-3** (ver diagramas de barras naranja y celeste en la Figura 5.11a).

BASHY-BODIPIY

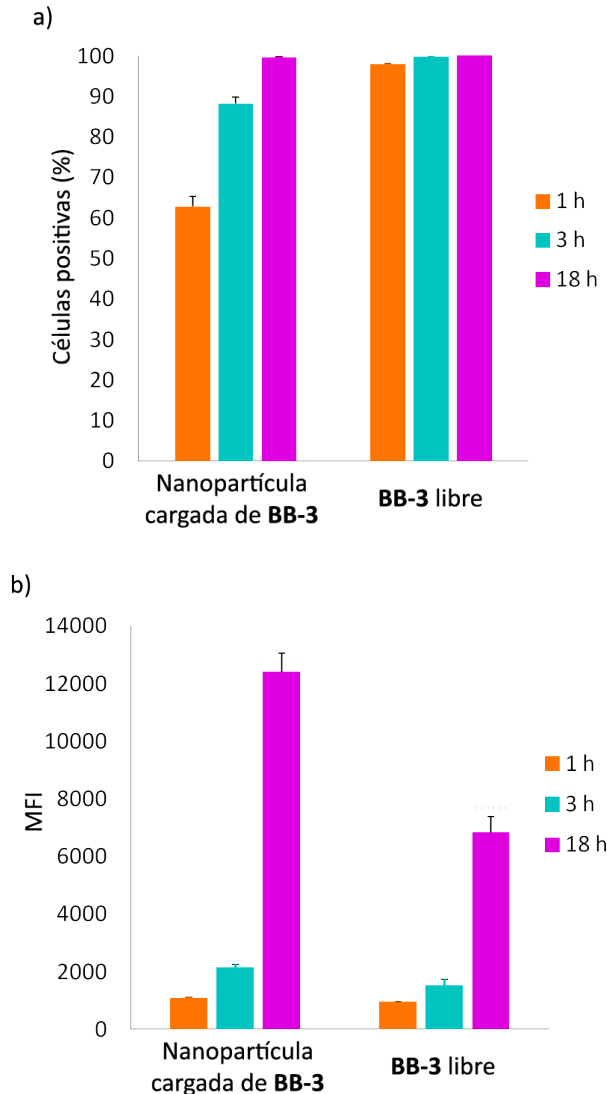


Figura 5.11. Internalización del colorante libre **BB-3** y las nanopartículas cargadas por BMDC (JAW SII, ATCC®CRL-11904™) después de 1, 3 y 18 horas de incubación, expresado en a) porcentajes y b) intensidad media de fluorescencia (MFI) de células positivas en la población clasificadas por citometría de flujo.

Se esperaba que este nivel de penetración fuera dependiente del tiempo para las nanopartículas, teniendo en cuenta la naturaleza de este vehículo típicamente usado frente a la estructura molecular del colorante libre de este estudio. No obstante, en la Figura 5.11b se observan los valores de intensidad

media de fluorescencia (MFI) que presentan tanto las nanopartículas cargadas con el colorante, como los del colorante libre **BB-3**. Se concluye que las nanopartículas cargadas penetraron en mayor medida en comparación con el colorante libre.

Otro experimento como es el ensayo con yoduro de propidio (PI) muestra el porcentaje de células muertas después de horas de la incubación; en este caso se realizó después de las 18 horas. Se logra observar que, para ambas incubaciones, tanto la de las nanopartículas cargadas como la del colorante libre, no tienen un impacto negativo en la viabilidad de BMDC.

El análisis de microscopía de fluorescencia confocal confirma la internalización de las nanopartículas cargadas con el colorante **BB-3** en BMDC con éxito después de 2, 4 y 10 horas de incubación, como se puede apreciar en la Figura 5.12. Además, al excitar estas nanopartículas selectivamente a 488 nm (láser de iones de argón) se detecta una señal de fluorescencia intensa a 580 nm. En la misma figura, se observan los núcleos y la membrana plasmática, que se tiñeron con Hoechst 33342 (color azul) y WGA-Alexa Fluor 633 (color rojo), respectivamente.

BASHY-BODIPY

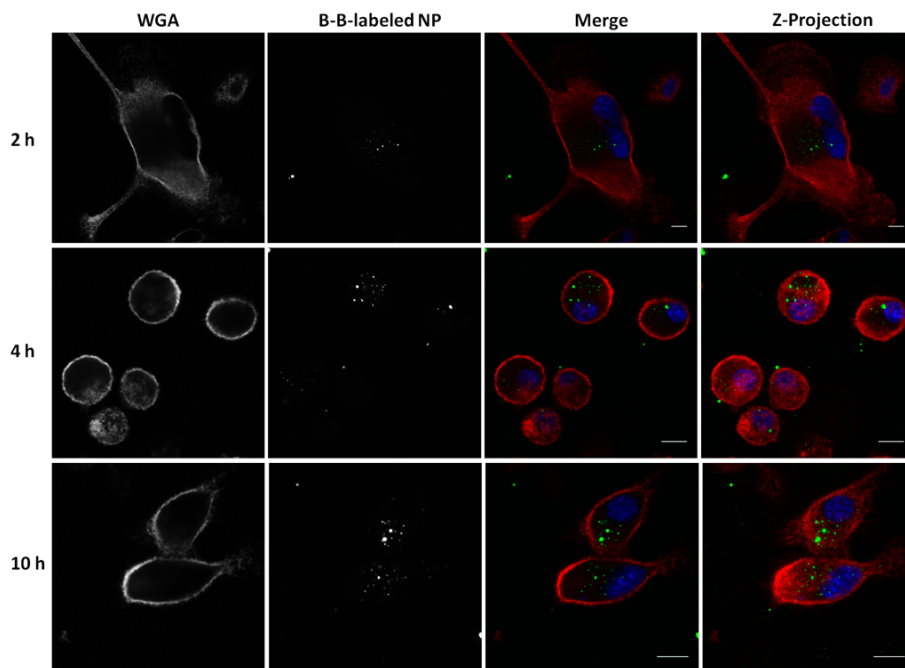


Figura 5.12. Imágenes de la microscopía confocal obtenida después de la incubación de BMDC (JAW SII, ATCC®CRL-11904™) con las nanopartículas cargadas durante 2, 4 y 10 horas.

5.7. CONCLUSIONES

Se han diseñado y sintetizado unos colorantes organoboro, los cuales contienen cromóforos tipo BASHY como característica estructural principal y, además, muestran una significativa capacidad de transferir energía de manera eficiente. La construcción de estas estructuras foto-funcionales fue posible gracias al concepto de reacción multicomponente, en nuestro caso entre un ácido borónico y un ligando de salicilidenedihidrazona.

Se ha demostrado la versatilidad del cromóforo BASHY ya que se comporta como aceptor de energía en el colorante **BC-1** por un lado, y como donador de energía en el colorante **BB-3**, resultando ambos compuestos unos eficientes casetes de transferencia de energía (ETC). Además, se confirma que estos son

los primeros ejemplos para la integración de los cromóforos tipo BASHY en ETC a través de enlaces directos. Estos cromóforos actúan electrónicamente independientemente uno del otro.

Todas estas evidencias hacen pensar que sería de alto interés ampliar los ejemplos que se han presentado en este capítulo. Esto se podría implementar mediante un ajuste electrónico de las propiedades de transferencia de carga de la estructura BASHY o, simplemente, la variación del segundo cromóforo. Toda esta flexibilidad estructural junto a la bio-conjugabilidad selectiva, hace que la plataforma BASHY sea bastante interesante para aplicaciones biotecnológicas como es la bioimagen.

Finalmente, destacar que los colorantes tipo BASHY pueden diseñarse con una alta modularidad funcional. Esto ofrece unas propiedades fotofísicas tales como altos coeficientes de absorción molar de aproximadamente $60\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, y altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, valores comprendidos entre 0.5 y 0.6^{17,19}. Por todo ello, hace que estos cromóforos sean muy interesantes como ETC, como lo es nuestro colorante **BB-3** presentado en este estudio y especialmente la nanopartícula cargada de este colorante. Con respecto al colorante **BB-3** libre, su acumulación y comportamiento lumínico por parte de la estructura BASHY en las subestructuras celulares lipídicas hace que sea un colorante idóneo para la utilización de ETC como sondas selectivas en bioimagen¹⁷.

5.8. ANEXO EXPERIMENTAL

Tanto los reactivos como los disolventes que se utilizaron en la síntesis de los colorantes y las nanopartículas poliméricas son comerciales y se compraron con la más alta calidad disponible.

BASHY-BODIPLY

Las medidas realizadas de absorción UV/vis y fluorescencia se realizaron en cloroformo. Las concentraciones utilizadas de los compuestos fueron aproximadamente de 10 μM , usando cubetas rectangulares de cuarzo de 1.0 cm de camino óptico. Los espectros de absorción UV/vis se registraron con un espectrómetro UVPC-1603 (Shimadzu). Mientras que los espectros de fluorescencia de estado estacionario se obtuvieron con un fluorímetro estándar (Varian Cary Eclipse) con una lámpara de xenón pulsada. Los espectros de excitación y emisión fueron corregidos dependiendo de la sensibilidad del fotomultiplicador. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los compuestos de este capítulo se determinaron con rodamina B ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.95$ en etanol) y 4-amino-*N*-propil-1,8-naftalimina ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.48$ en acetonitrilo) como estándares de referencia y fueron corregidos con las diferencias entre los índices refractivos de los disolventes de las muestras y la referencia. El tiempo de vida media de la fluorescencia en nanosegundos es medida por el recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente, con un error del 5 %. Se aplicó un ajuste biexponencial para todos los compuestos en todos los medios estudiados, sólo mostrando el componente del decaimiento principal. Se utilizó un láser de diodo pulsado de picosegundos empleado como fuente de excitación (EPL-445, $\lambda_{\text{exc}} = 442.2$ nm, ancho de pulso 78.3 ps) y el ajuste de las trazas de decaimiento cinético se realizó por desconvolución de la función de respuesta del instrumento. Se realizó en un Edinburgh Instruments con equipo fluorescente FS920.

En cuanto a todos los cálculos de densidad teórica funcional dependientes del tiempo se llevaron a cabo usando el programa Gaussian09⁵¹. Las estructuras del estado fundamental se optimizaron geoméricamente usando la teoría de la densidad funcional (DFT) con la funcionalidad CAM-B3LYP⁵², con un conjunto de 6-31G** bases y el modelo de polarización continua (PCM) para considerar el disolvente (tolueno)⁴⁸.

Las nanopartículas de PLGA-PVA fluorescentes utilizadas en este capítulo se prepararon con una doble emulsión (agua en aceite-en-agua: w/o/w) y posteriormente evaporando el disolvente del medio. El copolímetro de ácido poliláctico y el ácido poliglicólico fueron obtenidos en Aldrich. Estos polímeros al 50:50 junto a 10 µg de **BB-3** se disolvieron en diclorometano. Posteriormente, se añadió una solución acuosa del 8 % (p/v) de polivinilalcohol (PVA, también obtenido en Aldrich), se emulsionó junto con la fase orgánica bajo sonicación continua. Se formó una segunda emulsión cuando ésta sin emulsión estaba dispersada en una solución acuosa de PVA al 2.5 % (p/v) bajo las mismas condiciones. La emulsión se vertió gota a gota en una solución acuosa de PVA al 0.25 % (p/v) y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las nanopartículas se lavaron con agua ultrapura, se recogieron centrifugándolas a 17 500 rpm, 4 °C durante 40 minutos. Posteriormente, se vuelven a suspender con una solución salina tamponada con fosfato (0.01 M y pH 7.4).

El tamaño medio de las nanopartículas (Z-Average) y el índice de polidispersidad (Pdl) se determinaron por dispersión dinámica de la luz (DLS, Malvern Instruments). La carga superficial de las nanopartículas (potencial zeta, ZP) se midió mediante electroforesis láser Doppler (LDE) en combinación con dispersión de luz para análisis de fase (PALS) a 258 °C con el mismo equipo. La suspensión de las nanopartículas (10 mg/mL) fue diluida en disolución acuosa de KCl 10 mM hasta una concentración final de 0.6 mg/mL. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Para el estudio de la internalización y la evaluación de las células muertas en estos estudios se utilizaron células dendríticas de médula ósea inmaduras de murinas (BMDX, JAW SII, ATCC®CRL-11904™, ATCC, Manassas, VA, USA). Se sembraron $3.5 \cdot 10^4$ células/ 190 µL/ pocillos, en placas de 96 pocillos y se incubaron durante toda la noche en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂ a 37 °C, permitiendo que las células se adhieran. A las células se les

BASHY-BODIPY

añadieron las nanopartículas fluorescentes PLGA cargadas con **BB-3** (0.5 mg/mL) durante 1, 3 y 18 horas. Luego se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato estéril (0.01 M, a pH 7.4). Se marcaron con yoduro de propidio (PI) para evaluar la población de células muertas. El medio de cultivo y 0.05 % (v/v) de Triton X-100 se usaron como controles negativos y positivos, respectivamente. La fluorescencia de 10000 células se analizó mediante citometría de flujo (citómetro LSR Fortessa, BD Biosciences) y los datos se trataron con el software FlowJo versión 7.6.5 para Microsoft (TreeStar, San Carlos, CA, USA).

5.9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.*, **2014**, *9*, 855-866.
- [2] Levi, L.; Müller, T. J. J. *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, *45*, 2825-2846.
- [3] Levi, L.; Müller, T. J. J. *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, 2907-2918.
- [4] de Moliner, F.; Kielland, N.; Lavilla, R.; Vendrell, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2017**, *56*, 3758-3769.
- [5] Zhu, J.; Bienaymé, H. *Multicomponent Reactions*. Wiley-VCH, **2005**.
- [6] Dömling, A.; Wang, W.; Wang, K. *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 3083-3135.
- [7] Brauch, S.; van Berkel, S. S.; Westermann, B. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 4948-4962.
- [8] Allais, C.; Grassot, J.-M.; Rodriguez, J.; Constantieux, T. *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 10829-10868.
- [9] Estévez, V.; Villacampa, M.; Menéndez, J. C. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 4633-4657.

- [10] Burchak, O. N.; Mughferli, L.; Ostuni, M.; Lacapère, J. J.; Balakirev, M. Y. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 10058-10061.
- [11] Martorana, A.; Pace, A.; Buscemi, S.; Palumbo Piccionello, A. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 3240-3243.
- [12] Brauch, S.; Henze, M.; Osswald, B.; Naumann, K.; Wessjohann, L. A.; van Berkel, S. S.; Westermann, B. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 958-965.
- [13] Vázquez-Romero, A.; Kielland, N.; Arévalo, M. J.; Preciado, S.; Mellanby, R. J.; Feng, Y.; Lavilla, R.; Vendrell, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 16018-16021.
- [14] Moni, L.; Gers-Panther, C. F.; Anselmo, M.; Müller, T. J. J.; Riva, R. *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 2020-2031.
- [15] Passos, S. T. A.; Correa, J. R.; Soares, S. L. M.; da Silva, W. A.; Neto, B. A. D. *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 2646-2651.
- [16] Ramírez-Ornelas, D. E.; Alvarado-Martínez, E.; Bañuelos, J.; López-Arbeloa, I.; Arbeloa, T.; Mora-Montes, H. M.; Pérez-García, L. A.; Peña-Cabrera, E. *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 2888-2898.
- [17] Santos, F. M. F.; Rosa, J. N.; Candeias, N. R.; Parente Carvalho, C.; Matos, A. I.; Ventura, A. E.; Florindo, H. F.; Silva, L. C.; Pischel, U.; Gois, P. M. P. *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 1631-1637.
- [18] Laurent, A. D.; Guennic, B. L.; Jacquemin, D. *Theor. Chem. Acc.*, **2016**, *135*, 173.
- [19] Alcaide, M. M.; Santos, F. M. F.; Pais, V. F.; Carvalho, J. I.; Collado, D.; Pérez-Inestrosa, E.; Arteaga, J. F.; Boscá, F.; Gois, P. M. P.; Pischel, U. *J. Org. Chem.*, **2017**, *82*, 7151-7158.

BASHY-BODIPY

[20] Cal, P. M. S. D.; Sieglitz, F.; Santos, F. M. F.; Parente Carvalho, C.; Guerreiro, A.; Bertoldo, J. B.; Pischel, U.; Gois, P. M. P.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Comm.*, **2017**, 53, 368-371.

[21] Zhang, B.; Feng, G.; Wang, S.; Zhang, X. *Dyes Pigm.*, **2017**, 149, 356-362.

[22] Wan, C.-W.; Burghart, A.; Chen, J.; Bergström, F.; Johansson, L. B.-Å.; Wolford, M. F.; Kim, T. G.; Topp, M. R.; Hochstrasser, R. M.; Burgess, K. *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 4430-4441.

[23] Ziessel, R.; Goze, C.; Ulrich, G.; Césarío, M.; Retailleau, P.; Harriman, A.; Rostron, J. P. *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 7366-7378.

[24] Harriman, A.; Izzet, G.; Ziessel, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 10868-10875.

[25] Bozdemir, O. A.; Cakmak, Y.; Sozmen, F.; Ozdemir, T.; Siemiarczuk, A.; Akkaya, E. U. *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 6346-6351.

[26] Qu, X.; Liu, Q.; Ji, X.; Chen, H.; Zhou, Z.; Shen, Z. *Chem. Comm.*, **2012**, 48, 4600-4602.

[27] Fan, J.; Hu, M.; Zhan, P.; Peng, X. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 29-43.

[28] Jiao, G.-S.; Thoresen, L. H.; Kim, T. G.; Haaland, W. C.; Gao, F.; Topp, M. R.; Hochstrasser, R. M.; Metzker, M. L.; Burgess, K. *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 7816-7826.

[29] Han, J.; Loudet, A.; Barhoumi, R.; Burghardt, R. C.; Burgess, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 1642-1643.

[30] Wu, L.; Loudet, A.; Barhoumi, R.; Burghardt, R. C.; Burgess, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 9156-9157.

[31] Collado, D.; Remón, P.; Vida, Y.; Nájera, F.; Sen, P.; Pischel, U.; Pérez-Inestrosa, E. *Chem. Asian J.*, **2014**, 9, 797-804.

- [32] Xiao, Y.; Zhang, D.; Qian, X.; Costela, A.; García-Moreno, I.; Martín, V.; Pérez-Ojeda, M. E.; Bañuelos, J.; Gartzia, L.; López Arbeloa, I. *Chem. Comm.*, **2011**, *47*, 11513-11515.
- [33] Esnal, I.; Duran-Sampedro, G.; Agarrabeitia, A. R.; Bañuelos, J.; García-Moreno, I.; Macías, M. A.; Peña-Cabrera, E.; López-Arbeloa, I.; de la Moya, S.; Ortiz, M. J. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2015**, *17*, 8239-8247.
- [34] Zhang, X.; Xiao, Y.; He, L.; Zhang, Y. *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 6315-6320.
- [35] Erbas-Cakmak, S.; Akkaya, E. U. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2013**, *52*, 11364-11368.
- [36] Erbas-Cakmak, S.; Bozdemir, O. A.; Cakmak, Y.; Akkaya, E. U. *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 858-862.
- [37] Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4891-4932.
- [38] Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 1184-1201.
- [39] Mugnier, J.; Pouget, J.; Bourson, J.; Valeur, B. *J. Lumin.*, **1985**, *33*, 273-300.
- [40] Dexter, D. L. *J. Chem. Phys.*, **1953**, *21*, 836-850.
- [41] Speiser, S. *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 1953-1976.
- [42] Ziessel, R.; Harriman, A. *Chem. Comm.*, **2011**, *47*, 611-631.
- [43] Förster, T. *Ann. Phys. (Leipzig)* **1948**, *2*, 55-75.
- [44] Zhao, Y.; Zhang, Y.; Lv, X.; Liu, Y.; Chen, M.; Wang, P.; Liu, J.; Guo, W. *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 13168-13171.
- [45] Lin, W.; Yuan, L.; Cao, Z.; Feng, Y.; Song, J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 375-379.

BASHY-BODIPY

- [46] Goel, R.; Luxami, V.; Paul, K. *RSC Advances*, **2016**, *6*, 37664-37671.
- [47] Zielonka, J.; Sikora, A.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 14210-14216.
- [48] Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 2999-3094.
- [49] Jose, J.; Loudet, A.; Ueno, Y.; Wu, L.; Chen, H.-Y.; Son, D. H.; Barhoumi, R.; Burghardt, R.; Burgess, K. *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 3871-3877.
- [50] Florindo, H. F.; Pandit, S.; Gonçalves, L. M. D.; Videira, M.; Alpar, O.; Almeida, A. J. *Biomaterials*, **2009**, *30*, 5161-5169.
- [51] Gaussian 09, Revision D.01. Frisch, M. J. et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2013**.
- [52] Yanai, T.; Tew, D. P.; Handy, N. C. *Chem. Phys. Lett.*, **2004**, *393*, 51-57.



6

CY-BASHY. COLORANTES ORGANOBORO CON APLICACIÓN EN BIOIMAGEN

6

Cy-BASHY.**Colorantes organoboro con aplicación en bioimagen.****6.1. SINOPSIS**

Al igual que en el capítulo anterior (Capítulo 5), aquí se muestran nuevos colorantes organoboro *N,O*-tetracoordinados que poseen las propiedades necesarias para ser utilizados en el campo de la bioimagen. Estos compuestos poseen una estructura principal de ácido borónico con un sistema de ligando de salicilidenedihidrazona (BASHY). Además, esta estructura BASHY viene integrada con otro de los colorantes orgánicos ya mencionados en el primer capítulo introductorio de esta memoria. Se trata de las cianinas, exactamente de la subfamilia de los colorantes llamados «Cy». Los compuestos presentados en este capítulo, se diseñaron principalmente para producir fluoróforos eficientes y, además, emisores en la región espectral del rojo. Estas características son propicias para que puedan usarse como marcadores de astrocitos, es decir, marcadores específicos de células del tejido nervioso, donde actúan realizando funciones auxiliares y complementarias a las neuronas. Los colorantes Cy-BASHY aquí diseñados (ver en la Figura 6.1 su estructura general) son químicamente estables y no sufren fotodescomposición. Al igual que otros compuestos presentados en esta Memoria, sus propiedades fotofísicas pueden ajustarse electrónicamente y amoldarse a situaciones y requisitos totalmente diferentes para potenciar así la imagen celular.

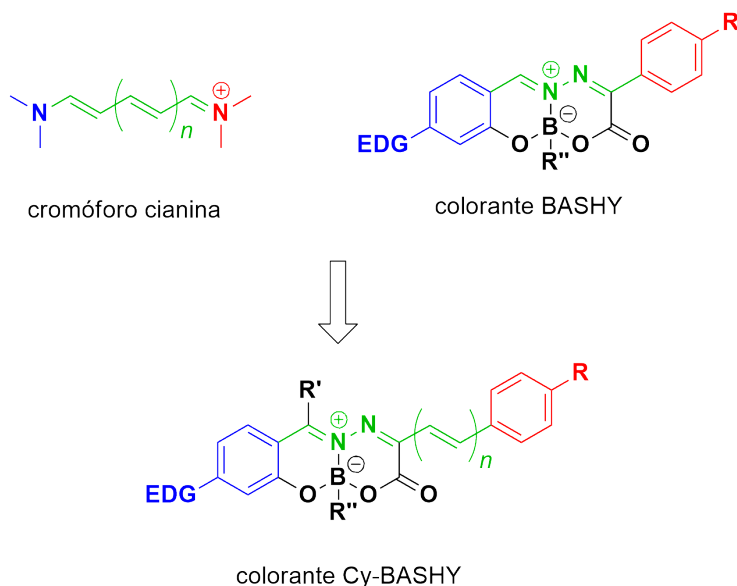


Figura 6.1. Representación de la estructura general del colorante Cy-BASHY.

6.2. INTRODUCCIÓN

Como se ha avanzado en el anterior capítulo, los colorantes organoboro fluorescentes y más en concreto la familia estructural tipo BASHY poseen un esqueleto muy modular. Por ello, estos compuestos se caracterizan por poderse adaptar fácilmente a las diversas aplicaciones funcionales que pueden desempeñar. Entre estas aplicaciones se encuentra la utilización en experimentos de bioimágenes y detección¹⁻⁹.

Por otra parte, los colorantes con esqueleto cianina son uno de los fluoróforos orgánicos típicos por excelencia, y contienen un grupo donador y otro aceptor relacionados entre sí mediante la unión de una cadena polimetínica (cadenas de dobles enlaces conjugados)^{10,11}. Normalmente sus bandas de emisión se sitúan desde la región espectral del rojo hasta el infrarrojo cercano. Las cianinas se encuentran entre los colorantes más utilizados para ser aplicados en el campo de la bioimagen¹²⁻¹⁹. Esto se debe a que presentan propiedades fotofísicas

interesantes y, sobre todo, la capacidad de poder ajustarlas variando el grupo aceptor o donador, y/o la longitud de su cadena π conjugada. Por ello, es importante la investigación encaminada a diseñar y mejorar los métodos sintéticos hacia la formación de nuevas cianinas con el fin de ser utilizadas como materiales funcionales o componentes para imagen celular.

Significativamente, los colorantes mixtos tipo Cy-BASHY pueden resultar aún más interesantes ya que los de tipo BASHY son moléculas que presentan propiedades de transferencia de carga²⁰. El ensamblaje de estos dos tipos de estructuras conduce a espectros de absorción UV/vis y de emisión de fluorescencia más desplazados hacia la zona del rojo, y también produce una mejora de la fotoestabilidad de los compuestos Cy-BASHY resultantes^{21,22}.

En el anterior capítulo (Capítulo 5) ya se menciona que las reacciones multicomponente surgieron como una estrategia eficaz para generar cromóforos estructuralmente diversos. Esto permite la construcción directa de plataformas modulares flexibles de colorantes funcionales que se utilizaron como, por ejemplo, en la tinción de orgánulos intracelulares^{23,24} y el etiquetado de proteínas específicas²⁵.

6.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este apartado, se describirán brevemente los aspectos relacionados con el enfoque experimental del proyecto de este capítulo.

Inicialmente, se diseñaron y sintetizaron con éxito una serie de compuestos organoboro tipo Cy-BASHY (**CyB-X**, X = 1–15), que contienen diferentes radicales alifáticos, aromáticos o heterocíclicos en las posiciones EDG (ver más adelante significado del acrónimo), R, R' y/o R'' (ver Figura 6.2). Así, la principal diferencia estructural de los derivados **CyB** es:

CY-BASHY

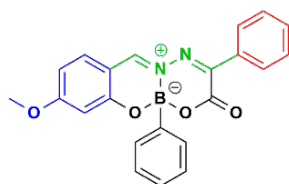
- i. La distinta longitud de cadena π conjugada hasta la posición R (indicada de color verde y rojo en las estructuras mostradas).
- ii. La distinta sustitución en la posición R'' (pudiendo ser un grupo fenilo o un heterociclo aromático).
- iii. Y, finalmente, el distinto EDG (indicado de color azul).

La primera serie de **CyB** sintetizada tiene como característica principal la presencia de un grupo metoxi (MeO) en la posición EDG que actúa como grupo donador de electrones (por eso el acrónimo EDG). Con esta serie de compuestos (**CyB-1 – 4**) se realiza un estudio sobre la estabilidad hidrolítica del esqueleto BASHY. Además, este tipo de hidrólisis es debido a un ataque nucleofílico de la molécula de agua sobre el carbono de la imina (donde está localizado el fragmento R', ver en la Figura 6.1)²³. Por esta razón, se decide incorporar en el carbono de la imina un resto alquilo, reduciendo así su carácter electrofílico. Esto, además, proporciona un impedimento estérico y carácter hidrofóbico frente al posible ataque de la molécula de agua, ralentizando así la hidrólisis.

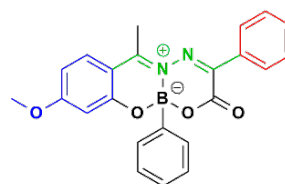
Por otra parte, la segunda serie de Cy-BASHY (**CyB-10 – 15**) incluye tanto la mejora estructural para evitar la posible hidrólisis como, además, la presencia de un grupo NEt_2 como EDG, puesto que es más fuerte como donador que el grupo MeO mejorando así sus propiedades fotofísicas.



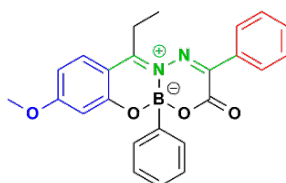
estructura principal Cy-BASHY



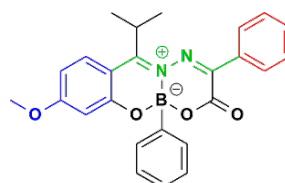
CyB-1



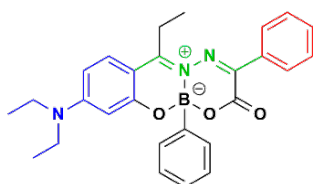
CyB-2



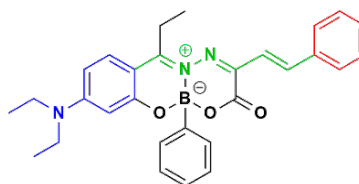
CyB-3



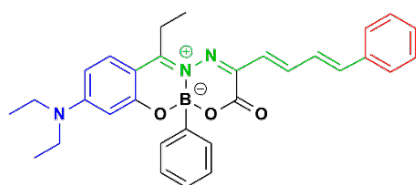
CyB-4



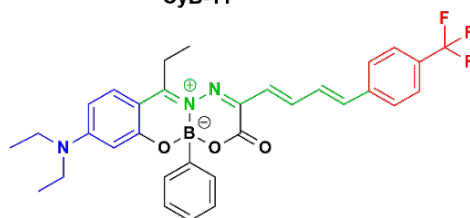
CyB-10



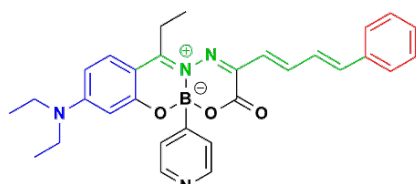
CyB-11



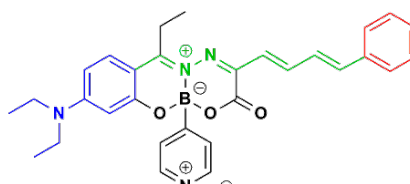
CyB-12



CyB-13



CyB-14



CyB-15

Figura 6.2. Estructuras de los colorantes Cy-BASHY de este estudio.

6.4. SÍNTESIS Y PROPIEDADES FOTOFÍSICAS

Los derivados tipo Cy-BASHY presentados en este capítulo fueron sintetizados en colaboración con el Instituto de Investigación para medicinas (iMed.UlIsboa) de la Universidad de Lisboa. A continuación, se describe brevemente la síntesis de los compuestos aquí diseñados como además sus propiedades fotofísicas. Inicialmente se busca un ajuste estructural para la mejora de este tipo de esqueletos, fundamentalmente tratando de evitar su hidrólisis.

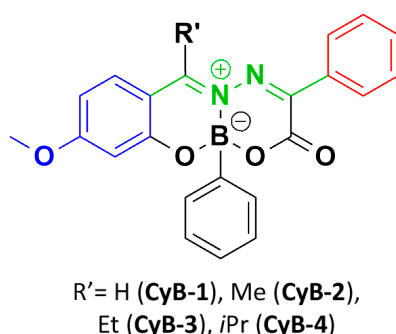
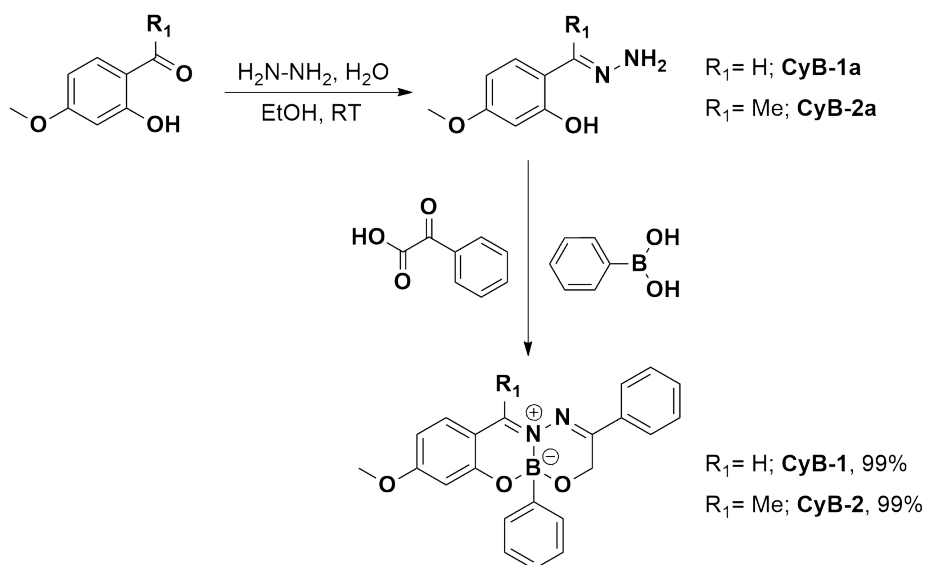


Figura 6.3. Estructura modelo de Cy-BASHY (**CyB**) usada para el estudio hidrolítico.

En primer lugar, se utiliza la estructura modelo BASHY que contiene un grupo MeO como grupo donador de electrones que se presenta en la Figura 6.3 (ver conjuntamente con la Figura 6.1, indica dicha posición en color azul), como modelo para sintetizar varios derivados con diferentes sustituyentes alquílicos en la posición R'. Sobre este conjunto se realiza el estudio hidrolítico anteriormente indicado, principalmente tratando de elucidar cómo influye dicho sustituyente alquílico en el ataque de la molécula de agua al átomo de C de la imina. Este estudio hidrolítico permite conocer que en el caso con el sustituyente isopropílico (**CyB-4**) se crea una estabilización bastante notoria. Sin embargo, y desafortunadamente, esto produce una disminución no deseada en los rendimientos cuánticos de fluorescencia (valores de $\Phi_{\text{fluo}} \leq 0.05$ frente a los obtenidos para **CyB-1** y **CyB-2**, de 0.16–0.17) y menores rendimientos químicos

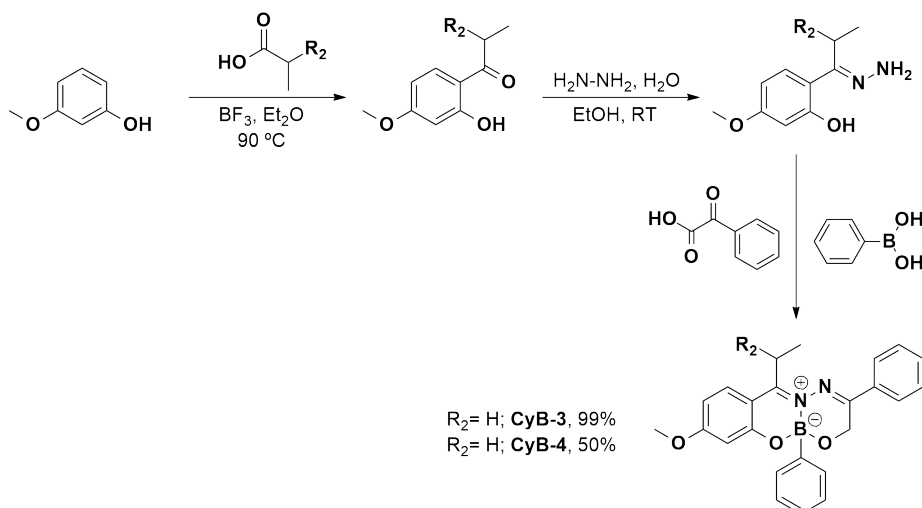
en su síntesis ($\leq 50\%$). El fragmento etilo como sustituyente R' (**CyB-3**) parece ser una buena alternativa a este problema, proporcionando al esqueleto BASHY una estabilidad aproximadamente 20 veces mayor en comparación con el derivado no sustituido ($R' = H$, **CyB-1**). Además, se obtienen rendimientos sintéticos globales de casi un 99 % en este caso (**CyB-3**), así como rendimientos cuánticos de fluorescencia del 0.13 para este modelo mejorado.

Los compuestos Cy-BASHY con el grupo MeO como EDG característico, han sido sinterizados como se muestra en los siguientes Esquemas 6.1 y 6.2^{23,26}. Al igual que los compuestos organoboro tipo BASHY del Capítulo 5, los **CyB-1 – 4** se preparan mediante una reacción multicomponente (MCR, concretamente de tres componentes) para formar un esqueleto tipo BASHY. Los distintos precursores que conducen a los diferentes derivados Cy-BASHY se modifican mediante síntesis clásica antes de la MCR, consiguiendo introducir así la modificación estructural deseada en cada caso.



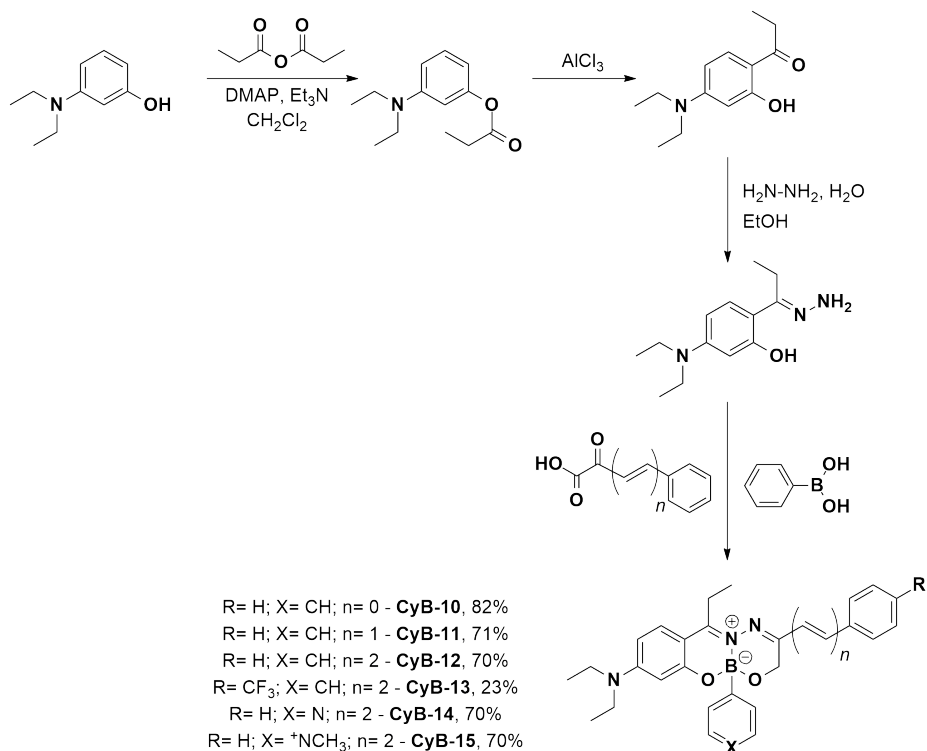
Esquema 6.1. Esquema de reacción de los **CyB-1** y **CyB-2**.

CY-BASHY



Esquema 6.2. Esquema de reacción de los **CyB-3** y **CyB-4**.

Al observar que estas estructuras tipo BASHY con el grupo MeO (**CyB-1 – 4**) producen rendimientos cuánticos de fluorescencia pequeños, se estudió la influencia del cambio del grupo donador de electrones (EDG). Como ya se adelanta en el apartado anterior, se prepararon nuevos colorantes Cy-BASHY conteniendo el grupo NEt_2 y sustituido en todos los casos con un resto etilo en R' (Figura 6.2). Esta nueva serie mejorada de colorantes (**CyB-10 – 15**) se prepara también mediante una reacción de tres componentes (MCR), concretamente entre una la hidrazona, los respectivos derivados α -cetoácidos y el correspondiente ácido arilborónico (el Esquema 6.3 muestra la síntesis de la hidrazona precursora y su posterior MCR)^{23,27}.



Esquema 6.3. Esquema de reacción de los **CyB-10 – 15**.

El motivo de utilizar el sustituyente NEt_2 como fuerte donador de electrones se justifica en base a que puede aumentar el carácter de transferencia de carga interna del esqueleto BASHY. Esta característica conlleva la aparición de una emisión de fluorescencia desplazada batocrómicamente²³. Los estudios hidrolíticos sobre los colorantes **CyB-10 – 13** se efectuaron en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7. Estos experimentos muestran sólo pequeñas variaciones en las intensidades de sus espectros de absorción UV/vis en un intervalo de tiempo de 3 horas, es decir, sólo una degradación de aproximadamente un 2–5 % para **CyB-11 – 13**. Sin embargo, el colorante **CyB-10** es más propenso a la degradación hidrolítica, aproximadamente un 40 % de degradación (decrecimiento de la intensidad de absorbancia) en 3 horas, aunque comparativamente es más estable que cualquiera de los colorantes **CyB-1 – 4** anteriores (ver la Tabla 6.1).

CY-BASHY

Tabla 6.1. Estabilidad hidrolítica y fotoestabilidad de **CyB-10 – 13**.

	Estabilidad hidrolítica en 10 mM tampón PBS a pH 7 (1.5 % acetonitrilo como co- disolvente), después de 3 h	Estabilidad en acetonitrilo, después de 2 h de irradiación a > 455 nm (filtro de corte)
	Decrecimiento de la absorbancia en su λ_{\max}	
CyB-10	40 %	< 1 %
CyB-11	5 %	< 1 %
CyB-12	5 %	Incremento de la absorbancia
CyB-13	2 %	5 %

Las propiedades fotofísicas de los colorantes Cy-BASHY en el disolvente DMSO se recogen en la Tabla 6.2 (el apartado 6.7 Anexo recoge las tablas con los datos en los diferentes disolventes de estudio). Estas propiedades colocan a estos compuestos como unos candidatos potenciales para aplicaciones en bioimagen. Los datos recogidos en las tablas permiten confirmar que, en este tipo de colorantes orgánicos, a medida que se adiciona una unidad de metina, se produce un cambio batocromático en el máximo de absorción de aproximadamente 15–25 nm (observar los espectros de absorción UV/vis en la Figura 6.4). Los datos indicados de la $\lambda_{\text{abs,max}}$ en el disolvente DMSO son: para **CyB-10** 480 nm, para **CyB-11** 507 nm y para **CyB-12** y **CyB-13** de 525 nm.

Tabla 6.2. Propiedades fotofísicas de **CyB-10 – 15** en DMSO.

	$\lambda_{\text{abs, max}} \text{ (nm)}^{[a]}$ [$\epsilon \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1})$]	$\lambda_{\text{fluo, max}} \text{ (nm)}^{[b]}$	$\Phi_{\text{fluo}}^{[c]}$	$\tau \text{ (ns)}^{[d]}$
CyB-10	480 [49 000]	567	0.13	0.80
CyB-11	507 [53 000]	589	0.19	1.27
CyB-12	525 [55 000]	599	0.24	1.45
CyB-13	526 [57 000]	607	0.29	1.40
CyB-14	522 [47 000]	599	0.32	1.41
CyB-15	527 [70 000]	602	0.26	1.05

[a] Máximo de absorción UV/vis, entre corchetes se muestra el coeficiente de absorción molar ϵ en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. [b] Máximo de emisión de fluorescencia. [c] Rendimiento cuántico de fluorescencia, con un error del 15 %. Se midió con 4-amino-*N*-propil-1,8-naftalimida ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.48$ en acetonitrilo) o rodamina B ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.95$ en etanol) como referencia y corregido para las diferencias entre los índices de refracción de los disolventes usados, respectivamente. [d] Tiempo de vida media de la fluorescencia en nanosegundos medida por recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente, con un error del 5 %. Se aplicó un ajuste biexponencial para todos los compuestos sintetizados en todos los medios estudiados. Sólo está mostrado el componente del decaimiento principal.

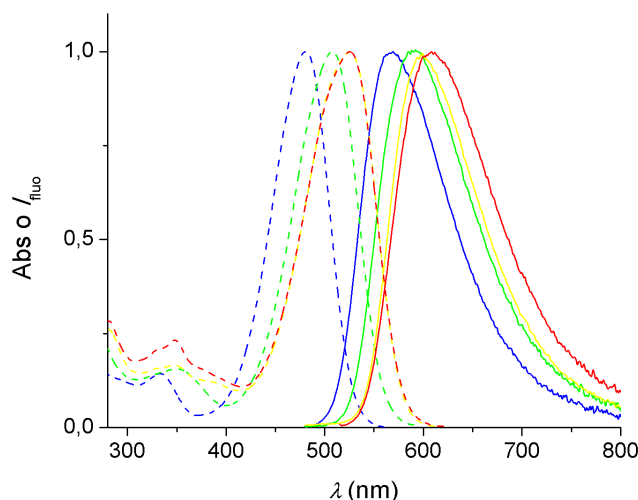


Figura 6.4. Espectros de absorción UV/vis (línea discontinua) y de fluorescencia (línea continua) de los colorantes **CyB-10** (azul), **CyB-11** (verde), **CyB-12** (amarillo) y **CyB-13** (rojo).

En los espectros de emisión de la fluorescencia se observan tendencias similares (ver Figura 6.5) a las de los espectros de absorción UV/vis. El compuesto **CyB-12** presenta máximos cercanos a 600 nm en disolventes polares. Por otro lado, en la emisión del **CyB-13** se produce un desplazamiento batocrómico (hacia el rojo) al aumentar el carácter *push-pull* del colorante, puesto que éste contiene un aceptor de electrones más fuerte (ver Tabla 6.2). Como ya se ha mencionado en el capítulo anterior, estas afirmaciones concuerdan con las propiedades generales de las estructuras tipo BASHY, produciéndose la emisión de fluorescencia en un estado de transferencia de carga interna (ICT)^{23,28}. Se observan claramente efectos solvatofluorocrómicos en los compuestos **CyB-10** – **13**. Para **CyB-13**, por ejemplo, se origina un desplazamiento de aproximadamente 80 nm en la banda de emisión de fluorescencia al cambiar el disolvente no polar (*n*-hexano) a uno polar (DMSO) (Figura 6.5). Además, cabe destacar la información obtenida sobre los desplazamientos de Stokes, de hasta

80 nm en disolventes polares, siendo esto prueba clave para su potencial aplicación en microscopía de fluorescencia.

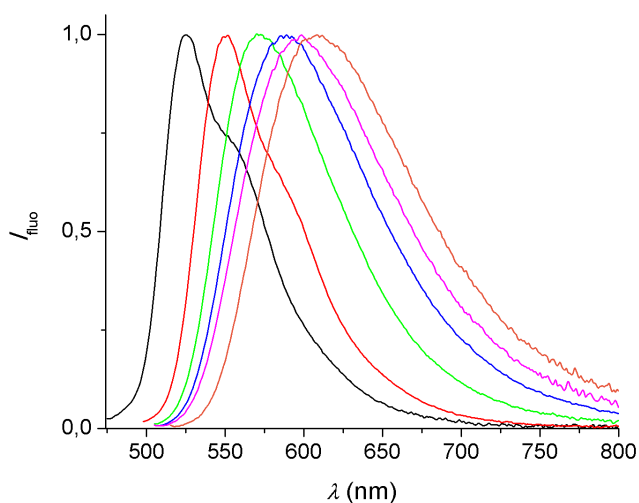


Figura 6.5. Espectros de emisión de fluorescencia de **CyB-13** en *n*-hexano (línea de color negra), tolueno (rojo), THF (verde), acetona (azul), acetonitrilo (rosa) y DMSO (naranja).

En general, los colorantes tipo BASHY presentan rendimientos cuánticos de fluorescencia notablemente altos, fundamentalmente en medios no polares. Esto los convierte en adecuadas sondas fluorescentes para aplicarlos en bioimagen como «gotas» de lípidos^{23,29}. Nuestros colorantes Cy-BASHY no son una excepción, así **CyB-10** y **CyB-11** muestran valores en sus Φ_{fluo} alrededor de 0.6–0.7 en THF o tolueno (ver Tabla 6.5 y 6.6 en el apartado de Anexo de este capítulo). Sin embargo, los colorantes **CyB-12** y **CyB-13** muestran rendimientos cuánticos de fluorescencia ligeramente más bajos, con valores entre 0.3–0.5 en estos disolventes. Esto podría deberse a una emisión más desplazada hacia el rojo y una desactivación no radiante más rápida como consecuencia de la *energy-gap law*. No obstante, en cuanto a los valores obtenidos en disolventes polares se consigue unos rendimientos cuánticos de aproximadamente 0.2–0.3

CY-BASHY

para los **CyB-11 – 13** en acetonitrilo o DMSO, a pesar de alcanzar el rango espectral rojo (ver Tabla 6.2 para DMSO y Tabla 6.3 para acetonitrilo).

Por otro lado, se consiguen colorantes con alto brillo ($\epsilon \times \Phi_{\text{fluo}}$ en el rango de unos 10 000 a 40 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, dependiendo del disolvente y la estructura electrónica del colorante), junto a unos coeficientes de absorción molar altos (aprox. 55 000 – 60 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) y una emisión en el rango espectral del rojo.

Con respecto a la fotoestabilidad de los compuestos aquí estudiados, se estudia irradiando con una lámpara de xenón de 150 W (con filtro de corte de $> 455 \text{ nm}$ durante 2 horas de irradiación). Los resultados demuestran una alta estabilidad en dichas condiciones, mostrando sólo una baja descomposición de $< 5 \%$ (ver Tabla 6.1).

6.5. USO DE LOS COLORANTES CY-BASHY EN BIOIMAGEN

En el apartado anterior, se han descrito las propiedades fotofísicas de los **CyB** y, además, se ha demostrado lo beneficioso que ha sido unir la estructura del cromóforo tipo BASHY a una extensión de cianina. Por ello, los compuestos aquí presentados son ideales a ser utilizados para aplicaciones en bioimagen.

En estudios recientes se ha demostrado que los fluoróforos catiónicos pueden ser usados para teñir los astrocitos³⁰. Esta estupenda funcionalidad para ser transportadores de cationes orgánicos (OCT) permite el tránsito de neurotransmisores en el cerebro. Por tanto, se ha querido hacer una comprobación de esta propiedad con nuestro derivado catiónico **CyB-15** junto con el precursor no catiónico **CyB-14** (ver estructuras en la Figura 6.2). Estos derivados muestran propiedades de emisión de fluorescencia muy similares al **CyB-12**, puesto que tienen estructuralmente en común la cadena π -conjugada. Además, estas propiedades están relacionadas exclusivamente con su esqueleto

tipo cianina como se demuestra en un reciente estudio publicado²⁸ (observar coincidencias en la emisión de fluorescencia de los derivados mencionados en Tabla 6.2).

Para evaluar la efectividad como marcadores de astrocitos de nuestra serie de derivados Cy-BASHY, se han utilizado cultivos de corte de cerebelo organotípicos junto a los colorantes **CyB-12**, **CyB-14** y **CyB-15**. Mediante microscopía de fluorescencia confocal, se observa que el **CyB-15** exhibe una emisión de fluorescencia más intensa en comparación con los demás colorantes. Por otro lado, al teñir conjuntamente con el marcador fluorescente de ADN llamado DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) se revela que nuestros compuestos no penetran en el núcleo celular (ver Figura 6.6a). Se emplea la técnica de inmunotinción en las rodajas de cerebelo para determinar la aplicabilidad de nuestros colorantes como marcadores de astrocitos. Para ello, inicialmente se incuban junto a nuestros derivados y la proteína GFAP (proteína fibrilar ácida de la glía) específica de astrocitos. Los cultivos de corte de cerebelo organotípico (OCSC) se dejan crecer durante 7 días *in-vitro* con 5 μ M de cada uno de los colorantes (**CyB-12**, **CyB-14** o **CyB-15**), incubándolos durante 20 minutos a 37° C. Después de la incubación, las rodajas se fijan en *p*-formaldehído al 4 % y se tiñen solo para los núcleos con DAPI o se inmunotiñen con GFAP (ver Figura 6.6b).

Como se muestra en la Figura 6.6, el colorante **CyB-15** se localiza principalmente en los astrocitos. Esto se manifiesta en que su área de co-localización es mucho mayor en comparación con el **CyB-12** (aproximadamente 2 veces mayor), mientras que en el **CyB-14** aproximadamente 5 veces (ver diagrama de barras en la Figura 6.6c). En general estos resultados de la microscopía de fluorescencia confocal sugieren que el colorante **CyB-15** es absorbido de manera más eficiente por los astrocitos. Por tanto, este derivado sirve como marcador específico para estos orgánulos, los cuales están implicados en los procesos neuroquímicos de los seres vivos.

CY-BASHY

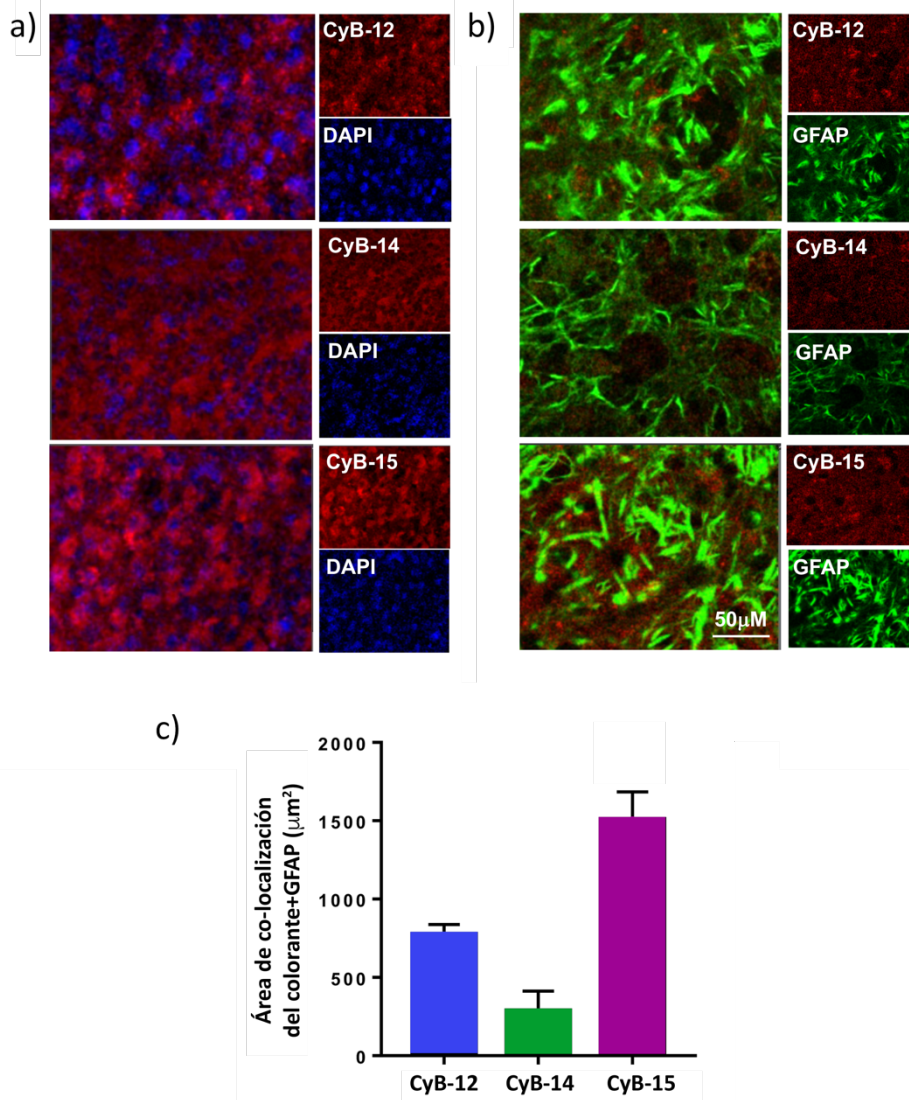


Figura 6.6. a) Imágenes representativas de cortes teñidos con colorantes Cy-BASHY (rojo) y DAPI (azul) muestran una localización celular más intensa del colorante **CyB-15**. b) Imágenes representativas de cortes teñidos con colorantes Cy-BASHY (rojo) e inmunotinción para GFAP (verde) muestra una mayor ubicación conjunta del colorante **CyB-12** con astrocitos. c) Las barras gráficas representan el área de co-localización de los tintes Cy-BASHY con tinción GFAP.

6.6. CONCLUSIONES

Se han diseñado y sintetizado con éxito una serie de colorantes organoboro *N,O*-tetracoordinados cuya característica estructural principal es la presencia de cromóforos tipo BASHY y tipo cianina. Al igual que en el capítulo anterior, la construcción de estas estructuras funcionales se efectuó empleando el concepto de reacciones multicomponentes entre un ácido borónico, derivados α -cetoácidos y un ligando de salicilidenhidrazona convenientemente funcionalizado.

Estos compuestos Cy-BASHY han resultado ser fotoestables y poseen una emisión de fluorescencia en el rango espectral del rojo con un alto brillo, así como una resistencia hidrolítica significativamente mejorada gracias a la protección del carbono de la imina. Estos colorantes pueden diseñarse modulando sus propiedades fotofísicas para ser utilizados como marcadores fluorescentes específicos. Por ello, los Cy-BASHY mostrados en este capítulo hacen que sean unos compuestos ideales para su utilización en bioimagen, en concreto, marcando astrocitos.

6.7. ANEXOS

A continuación, se mostrarán todas las tablas que recogen las propiedades fotofísicas de todos los colorantes aquí estudiados en los distintos disolventes.

CY-BASHY

Tabla 6.3. Propiedades fotofísicas de CyB-10 – 15 en acetonitrilo.

	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm) [ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)]	$\lambda_{\text{fluo, max}}$ (nm)	Φ_{fluo}	τ (ns)
CyB-10	472 [52 000]	552	0.16	1.01
CyB-11	497 [58 000]	577	0.26	1.72
CyB-12	513 [62 000]	585	0.25	1.57
CyB-13	513 [60 000]	597	0.31	1.41
CyB-14	510 [49 000]	589	0.35	1.41
CyB-15	515 [61 000]	592	0.21	0.92

Tabla 6.4. Propiedades fotofísicas de **CyB-10 – 15** en acetona.

	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm) [ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)]	$\lambda_{\text{fluo, max}}$ (nm)	Φ_{fluo}	τ (ns)
CyB-10	472 [52 000]	540	0.27	1.51
CyB-11	497 [57 000]	563	0.41	2.39
CyB-12	513 [67 000]	575	0.29	1.66
CyB-13	514 [61 000]	588	0.40	1.64
CyB-14	511 [48 000]	583	0.29	1.24
CyB-15	516 [57 000]	584	0.32	1.21

Tabla 6.5. Propiedades fotofísicas de **CyB-10 – 15** en THF.

	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm) [ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)]	$\lambda_{\text{fluo, max}}$ (nm)	Φ_{fluo}	τ (ns)
CyB-10	472 [53 000]	526	0.62	2.77
CyB-11	497 [57 000]	547	0.62	2.78
CyB-12	514 [67 000]	560	0.32	1.47
CyB-13	515 [60 000]	572	0.49	1.59
CyB-14	513 [47 000]	562	0.46	1.47
CyB-15	519 [43 000]	575	0.32	1.47

Tabla 6.6. Propiedades fotofísicas de **CyB-10 – 15** en tolueno.

	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm) [ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)]	$\lambda_{\text{fluo, max}}$ (nm)	Φ_{fluo}	τ (ns)
CyB-10	472 [49 000]	509	0.72	2.52
CyB-11	497 [58 000]	531	0.58	2.12
CyB-12	513 [60 000]	548	0.32	1.18
CyB-13	515 [60 000]	550	0.44	1.09
CyB-14	514 [40 000]	550	0.53	1.37
CyB-15	529 [n.d.]	570	0.14	1.54

[n.d.] No se ha podido determinar el coeficiente de absorción molar.

6.8. ANEXO EXPERIMENTAL

Todos los reactivos utilizados para la síntesis en este capítulo se compraron con la mayor calidad posible en Sigma-Aldrich, Fluorochem y Alfa Aesar. Los disolventes acetonitrilo, etanol y metanol se usaron sin ninguna purificación, mientras que el diclorometano y THF se secaron con hidruro de calcio y sodio metálico, respectivamente, bajo atmósfera de nitrógeno. Además, todos los disolventes orgánicos usados en los experimentos fotofísicos son de calidad espectroscópica y adquiridos en Scharlab.

Las medidas realizadas de absorción UV/vis y fluorescencia se realizaron en DMSO, acetonitrilo, acetona, THF y tolueno. Las concentraciones utilizadas de los compuestos fueron aproximadamente de 10 μM , usando cubetas rectangulares de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Los espectros de absorción UV/vis se registraron con un espectrómetro Cary 50 (Varian). Mientras que los espectros de fluorescencia de estado estacionario se obtuvieron con un fluorímetro estándar (Varian Cary Eclipse) con una lámpara de xenón pulsada. Los espectros de excitación y emisión fueron corregidos dependiendo de la sensibilidad del fotomultiplicador. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los compuestos de este capítulo se determinaron con rodamina B ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.95$ en etanol) y 4-amino-*N*-propil-1,8-naftalimina ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.48$ en acetonitrilo) como estándares de referencia y fueron corregidos con las diferencias entre los índices refractivos de los disolventes de las muestras y la referencia. La fotoestabilidad se obtuvo de irradiaciones con una lámpara xenón de 150 W, usando un filtro de corte a >455 nm. El tiempo de vida media de la fluorescencia en nanosegundos es medida por el recuento de fotones individuales correlacionados temporalmente, con un error del 5 %. Se aplicó un ajuste biexponencial para todos los compuestos en todos los medios estudiados, sólo mostrando el componente del decaimiento principal. Se utilizó un láser de diodo pulsado de picosegundos empleado como fuente de excitación (EPL-445, $\lambda_{\text{exc}} =$

442.2 nm, ancho de pulso 78.3 ps) y el ajuste de las trazas de decaimiento cinético se realizó por desconvolución de la función de respuesta del instrumento. Se realizó en un Edinburgh Instruments con equipo fluorescente FS920.

Para los experimentos de tinción de astrocitos se han utilizado cultivos organotípicos de rodajas de cerebelo (OCSC) que mantienen la arquitectura natural y las poblaciones celulares del tejido del cerebelo. Las rodajas de 400 μm se seccionaron con un cortador de tejido McIlwain. Se utilizó cuatro rodajas de diferentes cerebelos en placas de cultivo de membrana (BD Falcon, Lincoln Park, NJ, EEUU). Estas placas contienen 6 pocillos en una interfaz aire-líquido a 37 °C y atmósfera con el 5 % de CO_2 y manteniendo el cultivo hasta 7 días *in vitro*. Posteriormente, las rodajas se incubaron con 5 μM de cada uno de los colorantes durante 20 minutos a 37 °C. Después de la incubación, las rodajas se fijaron en *p*-formaldehído al 4 % y se procesaron para poder realizar las medidas de fluorescencia e inmunohistoquímica. Para determinar si los colorantes teñían las células, se trataron algunas rodajas con el marcador DAPI (1:1000, aproximadamente 5 minutos). Luego se incubaron con tampón PBS durante 1 hora y se añadió el anticuerpo primario (anti-GFAP de ratón, NovoCastra, 1:100) diluido en tampón durante aproximadamente 48 horas a 4 °C. Después de la incubación, las rodajas se lavan tres veces durante 10 minutos con PBS y se añade con el anticuerpo de fluorescencia secundario apropiado (Alexa488, Invitrogen, 1:500) durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. Las rodajas teñidas se visualizaron por microscopía confocal usando un microscopio invertido Leica DMi8-CS con el software Leica LAS X.

6.9. BIBLIOGRAFÍA

[1] Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.*, **2014**, *9*, 855-866.

CY-BASHY

- [2] Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4891-4932.
- [3] Ulrich, G.; Ziesel, R.; Harriman, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2008**, *47*, 1184-1201.
- [4] Beija, M.; Afonso, C. A. M.; Martinho, J. M. G. *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 2410-2433.
- [5] Vendrell, M.; Zhai, D.; Er, J. C.; Chang, Y. T. *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 4391-4420.
- [6] Frath, D.; Massue, J.; Ulrich, G.; Ziesel, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2014**, *53*, 2290-2310.
- [7] Pais, V. F.; Alcaide, M. M.; López-Rodríguez, R.; Collado, D.; Nájera, F.; Pérez-Inestrosa, E.; Álvarez, E.; Lassaletta, J. M.; Fernández, R.; Ros, A.; Pischel, U. *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 15369-15376.
- [8] Bachollet, S. P. J. T.; Volz, D.; Fiser, B.; Münch, S.; Röncke, F.; Carrillo, J.; Adams, H.; Schepers, U.; Gómez-Bengoña, E.; Bräse, S.; Harrity, J. P. A. *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 12430-12438.
- [9] Griesbeck, S.; Zhang, Z.; Gutmann, M.; Lühmann, T.; Edkins, R. M.; Clermont, G.; Lazar, A. N.; Haehnel, M.; Edkins, K.; Eichhorn, A.; Blanchard-Desce, M.; Meinel, L.; Marder, T. B. *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 14701-14706.
- [10] Doya, M. Q. *Chem. Rev.*, **1932**, *11*, 273-321.
- [11] Mishra, A.; Behera, R. K.; Behera, P. K.; Mishra, B. K.; Behera, G. B. *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 1973-2011.
- [12] Sun, W.; Guo, S.; Hu, C.; Fan, J.; Peng, X. *Chem. Rev.*, **2016**, *116*, 7768-7817.
- [13] Lin, Y.; Weissleder, R.; Tung, C. H. *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *13*, 605-610.
- [14] Li, X.; Gao, X.; Shi, W.; Ma, H. *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 590-659.

- [15] Stennett, E. M. S.; Ciuba, M. A.; Levitus, M. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 1057-1075.
- [16] Xu, W.; Zeng, Z.; Jiang, J. H.; Chang, Y. T.; Yuan, L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2016**, *55*, 13658-13699.
- [17] König, S. G.; Krämer, R. *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 9306-9312.
- [18] Gorka, A. P.; Nani, R. R.; Schnermann, M. J. *ACS*, **2018**, *51*, 3226-3235.
- [19] Usama, S. M.; Thompson, T.; Burgess, K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2019**, *58*, 8974-8976.
- [20] Laurent, A. D.; Guennic, B. L.; Jacquemin, D. *Theor. Chem. Acc.*, **2016**, *135*, 173.
- [21] Renikuntla, B. R.; Rose, H. C.; Eldo, J.; Waggoner, A. S.; Armitage, B. A. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 909-912.
- [22] Samanta, A.; Vendrell, M.; Das, R.; Chang, Y. T. *Chem. Comm.*, **2010**, *46*, 7406-7408.
- [23] Santos, F. M. F.; Rosa, J. N.; Candeias, N. R.; Parente Carvalho, C.; Matos, A. I.; Ventura, A. E.; Florindo, H. F.; Silva, L. C.; Pischel, U.; Gois, P. M. P. *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 1631-1637.
- [24] Zhang, B.; Feng, G.; Wang, S.; Zhang, X. *Dyes Pigm.*, **2017**, *149*, 356-362.
- [25] Cal, P. M. S. D.; Sieglitz, F.; Santos, F. M. F.; Parente Carvalho, C.; Guerreiro, A.; Bertoldo, J. B.; Pischel, U.; Gois, P. M. P.; Bernardes, G. J. L. *Chem. Comm.*, **2017**, *53*, 368-371.
- [26] Kim, S. H.; Lee, Y. H.; Jung, S. Y.; Kim, H. J.; Jin, C.; Lee, Y. S. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, *46*, 1721-1728.

CY-BASHY

[27] Mohammed, S.; Vishwakarma, R. A.; Bharate, S. B. *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 6915-6921.

[28] Alcaide, M. M.; Santos, F. M. F.; Pais, V. F.; Carvalho, J. I.; Collado, D.; Pérez-Inestrosa, E.; Arteaga, J. F.; Boscá, F.; Gois, P. M. P.; Pischel, U. *J. Org. Chem.*, **2017**, *82*, 7151-7158.

[29] Collot, M.; Fam, T. K.; Ashokkumar, P.; Faklaris, O.; Galli, T.; Danglot, L.; Klymchenko, A. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 5401-5411.

[30] Preston, A. N.; Farr, J. D.; O'Neill, B. K.; Thompson, K. K.; Tsirka, S. E.; Laughlin, S. T. *ACS Chem. Biol.*, **2018**, *13*, 1493-1498.



7

CONCLUSIONES.

7

Conclusiones.

Todos los capítulos descritos en esta Memoria de Tesis se han centrado principalmente en el diseño y caracterización de moléculas fluorescentes, en concreto, de colorantes de tipo organoboro. Estos compuestos fluorescentes se han utilizado en diversas aplicaciones funcionales. Uno de los principales campos de aplicación es el de la biotecnología (bioimagen).

En el **Capítulo 1** se presenta una revisión concisa sobre los colorantes orgánicos: sus características, propiedades fotofísicas y las aplicaciones más relevantes de estos compuestos. Además, se describen procesos y fenómenos fotofísicos que se mencionan y utilizan a lo largo de toda la Memoria.

El **Capítulo 2** recoge resumidamente los objetivos de esta Tesis Doctoral, tanto los objetivos generales como los específicos que se han conseguido alcanzar durante estos años de formación.

En los **Capítulos 3 y 4** se ha llevado a cabo el diseño y la síntesis de compuestos orgánicos de tipo organoboro *N,C*-tetracoordinados. Además, se ha podido demostrar con éxito que estos colorantes exhiben un carácter flexible en cuanto a transferencia de carga, y que se rigen por la sustitución del grupo donador de electrones (EDG) que contengan en su estructura. En concreto, en el **Capítulo 3**, los compuestos que se han desarrollado presentan particularmente dicroísmo circular y una intensa emisión de luz circularmente polarizada (CPL) con interesantes valores en los factores de disimetría *g*. En el **Capítulo 4**, además de haber podido corroborar dicho carácter modular dependiente de la sustitución del EDG en los compuestos diseñados, se ha conseguido que manifiesten un

CONCLUSIONES

carácter de transferencia de carga interna (ICT) en el estado excitado. El alcance electrónico de este tipo de estructura principal BAI se ha conseguido ampliar al insertar estructuras π -extendidas y de carácter cromóforo, siguiendo el formato donador-aceptor.

Se ha conseguido abordar satisfactoriamente otros compuestos organoboro con estructura principal tipo BASHY (ácido borónico con un sistema de ligando de salicilidenedihidrazona) en los **Capítulos 5 y 6**. Gracias a la aplicación de las reacciones multicomponente se ha podido llevar a cabo la síntesis de estos colorantes fotoestables. Por un lado, en el **Capítulo 5** se ha desarrollado estos nuevos compuestos organoboro con estructura BASHY junto a otros colorantes orgánicos típicos como son las plataformas estructurales BODIPY y Cumarina. Aquí se ha podido demostrar claramente el carácter flexible que exhiben, puesto que el cromóforo BASHY puede actuar como donador de energía junto al BODIPY, y como aceptor de energía al estar unido a la Cumarina. Por otro lado, en el **Capítulo 6** se ha conseguido diseñar y sintetizar la estructura principal BASHY junto a otros de los colorantes orgánicos frecuentes en la bibliografía, como son las cianinas. Al igual que para otros compuestos presentados en esta Memoria, se ha podido demostrar que sus propiedades fotofísicas pueden ser ajustadas electrónicamente y amoldarse a situaciones y requisitos totalmente diferentes. Como consecuencia de todo ello se consigue el funcionamiento óptimo de estos colorantes en aplicaciones funcionales como la bioimagen, proporcionando buenas imágenes celulares representativas de orgánulos específicos en cada capítulo.

La combinación de todos los resultados de esta Memoria de Tesis cumple con el objetivo principal de haber podido diseñar, sintetizar y caracterizar fotofísicamente nuevos compuestos de tipo organoboro con la finalidad fundamental de su utilización en el campo de la bioimagen.



8

ANEXOS.

CURRICULUM VITAE



Fecha del CV 01/02/2020

Información personal

Apellidos, Nombre	DOMÍNGUEZ HIDALGO, ZOE
Dirección	Fenicios 7, 5B. Huelva 21007
Correo electrónico	zoe.dominguez@diq.uhu.es
Nacionalidad	Española
DNI	48953931H
Fecha nacimiento	21/09/1988

Educación y formación

Fecha	2004 / 2006
Titulación obtenida	Bachiller Modalidad Ciencias Colegio Diocesano Sagrado Corazón de Jesús
Fecha	2006 / 2012
Titulación obtenida	Licenciada en Química Universidad de Huelva
Fecha	2012 / 2013
Titulación obtenida	Máster Universitario en Ciencia y Tecnología Química Universidad de Huelva
Fecha	2018 / 2019
Titulación obtenida	Máster Oficial en Formación del Profesorado de Educación Secundaria y Bachillerato, Formación Profesional y Enseñanza de Idiomas. Especialidad Física y Química Universidad de Huelva

	Prácticas externas realizadas en el Colegio Diocesano Sagrado Corazón de Jesús
Fecha Cursando	2013 / 2020 Doctoranda en Química Línea de investigación: "Catálisis Homogénea y Fotoquímica Orgánica". Universidad de Huelva

Idiomas

Inglés	Nivel B2 APTIS a través de British Council Spain
--------	--

Méritos de formación complementaria

Fecha	2011 / 2012
Tipo de formación	Beca de Colaboración - Ministerio de Educación
Proyecto	Diseño y preparación de diadas con poliaminas y fluoróforos como etiquetas para marcación de nanocapsulas. Universidad de Huelva
Fecha	2012
Tipo de formación	Investigadora – Investigación y Transferencia Transfronteriza España-Portugal (I2TEP).
Proyecto	Encapsulación Supramolecular de Moléculas Bioactivas en Cucurbituriles (Suprabioencaps). Universidad de Huelva
Fecha	2015 / 2019
Tipo de formación	Ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores – Ministerio de Economía y Competitividad

Actividad docente universitaria

Fecha	2015 / 2016
Titulación	Grado en Química – Universidad de Huelva
Asignatura	Introducción al Laboratorio Químico II Curso 1 - Cuatrimestre 2

Créditos	6
Fecha	2016 / 2017
Titulación	Grado en Química – Universidad de Huelva
Asignatura	Laboratorio de Química Orgánica Curso 3 - Cuatrimestre 1
Créditos	2.68
Titulación	Grado en Química – Universidad de Huelva
Asignatura	Química Orgánica Curso 2 - Cuatrimestre 2
Créditos	3.28
Fecha	2018 / 2019
Titulación	Grado en Química – Universidad de Huelva
Asignatura	Introducción al Laboratorio Químico II Curso 1 - Cuatrimestre 2
Créditos	1.72
Titulación	Grado en Química – Universidad de Huelva
Asignatura	Química Orgánica Curso 2 - Cuatrimestre 2
Créditos	2.28
Titulación	Grado en Ingeniería Química Industrial – Universidad de Huelva
Asignatura	Química II Curso 1 - Cuatrimestre 2
Créditos	2.00

Actividad docente secundaria

Fecha	2019
Prácticas en formación	Prácticas externas – Colegio Diocesano Sagrado Corazón de Jesús
Asignaturas	Matemáticas (1º a 4º E.S.O.) y Química (2º Bachillerato)
Fecha	2019 / 2020
Curso	3º E.S.O.
Asignatura	Matemáticas Aplicadas
Asignatura	Física y Química Flexible

Centro | Colegio Diocesano Sagrado Corazón de Jesús

Otros méritos de actividad investigadora

Artículos científicos

- Título **A supramolecular keypad lock**
 Revista *Chemical Communications* **2015**, *51*, 2698-2701.
- Título **Five-Component self-assembly of cucurbituril-based hetero-pseudorotaxanes**
 Revista *ChemistryOpen* **2017**, *6*, 288-294
- Título **Precise Supramolecular Control of Surface Coverage Densities on Polymer micro- and nanoparticles**
 Revista *Chem. Sci.*, **2018**, *9*, 8575-8581
- Título **Azabore[5]helicene Charge-Transfer Dyes Show Efficient and Spectrally Variable Circularly Polarized Luminescence**
 Revista *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 12660–12668
- Título **Highly Efficient Energy Transfer Cassettes by Assembly of Boronic Acid Derived Salicylidenehydrazone Complexes**
 Revista *ChemPhotoChem*, **2018**, *2*, 1038–1045
- Título **π -Extended Four-Coordinated Organoboron N,C-Chelates as Two-Photon Absorbing Chromophores**
 Revista *The Journal of Organic Chemistry*, **2019**, *84*, 13384-13393.
- Título **Cyanine-like Boronic Acid Derived Salicylidenehydrazone Complexes (Cy-BASHY) for Bioimaging Applications**
 Revista Pendiente de publicación

Divulgación científica	
Libro	Visualización de la Actividad Científica Femenina en la Eurorregión Algarve-Andalucía
Entidad	Servicio de Publicaciones. Universidad de Huelva
I.S.B.N.	978-84-943471-6-0
Estancias cortas	
Objetivo	Realización experimentos con microscopía bifotónica
Lugar y Fecha	BIONAND, Málaga, 10-14 septiembre, 2017
Congresos y Jornadas	
Congreso	VII Mediterranean Organic Chemistry Meeting (REQOMED)
Lugar y Fecha	Málaga, 10-12 junio, 2015
Tipo de comunicación	Comunicación Póster
Congreso	I Jornadas de doctorandos CyTIA
Lugar y Fecha	Huelva, 29-30 octubre, 2015
Tipo de comunicación	Comunicación Oral
Congreso	XXVI Reunión Bienal de Química Orgánica)
Lugar y Fecha	Punta Umbria, Huelva, 14-17 junio, 2016
Tipo de comunicación	Comunicación Póster
Congreso	V Spanish-Portuguese Conference Photochemistry
Lugar y Fecha	Toledo, 7-10 septiembre, 2016
Tipo de comunicación	Comunicación Póster
Congreso	II Jornadas de doctorandos CyTIA
Lugar y Fecha	Huelva, 27-28 octubre, 2016

CURRICULUM VITAE

Tipo de comunicación	Comunicación Oral
Congreso	I Workshop del Instituto Universitario de Química Básica y Aplicada (INQUBA)
Lugar y Fecha	Huelva, 28 noviembre, 2017
Tipo de comunicación	Comunicación Póster
Congreso	XXVII Reunión Bienal de Química Orgánica
Lugar y Fecha	Santiago de Compostela, 20-22 junio, 2018
Tipo de comunicación	Comunicación Póster
Congreso	24th IUPAC International Conference on Physical Organic Chemistry
Lugar y Fecha	Faro (Portugal), 01-06 julio, 2018
Tipo de comunicación	Comunicación Póster

Competencias técnicas

Fecha	2005
Curso	Técnico en Salvamento Acuático (Socorrista)
Organización	Delegación Onubense de Salvamento y Socorrismo
Fecha	2011
Curso	Formación y Aplicaciones de los Aceites Industriales
Organización	Cepsa
Fecha	2014
Curso	Fuentes de información para alumnos de doctorado
Organización	Universidad de Huelva
Fecha	2015
Curso	Buenas prácticas en la selección y uso de equipos de protección individual en laboratorios
Organización	Fremap

Fecha	2015
Curso	Nivel avanzado de Scopus
Organización	Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT).
Fecha	2017
Curso	Introducción a los métodos de estructura electrónica
Organización	Red Española de Simulación Molecular
Fecha	2018
Curso	Sistemas de comunicación web: Adobe Connect y otras soluciones
Organización	Universidad de Huelva

Competencias informáticas

Nivel alto de:
 Sistema operativo Windows y Mac OS
 Paquete Office de Windows (Word, Excel, PowerPoint, etc.)
 Adobe Photoshop
 Adobe Illustrator
 Adobe Premiere
 ChemDraw
 Origin
 Matlab

Competencias artísticas

Creatividad en el diseño de portadas, esquemas o montajes gráficos

Diseños gráficos publicados

Fecha 2016 – 8/05
 Revista Asian Journal of Organic Chemistry (Wiley-VCH)

CURRICULUM VITAE

Tipo de publicación	Portada - Cover Picture: Ti-Mediated Efficient Reductive Dehalogenation of Carbon–Halogen Bonds
Enlace web	https://doi.org/10.1002/ajoc.201600315
Fecha	2016 – 22/43
Revista	Chemistry A European Journal (Wiley-VCH)
Tipo de publicación	Portada Interior - Inside Back Cover: Drug Delivery by Controlling a Supramolecular Host–Guest Assembly with a Reversible Photoswitch
Enlace web	https://doi.org/10.1002/chem.201604435
Fecha	2018/1
Revista	ChemPhotoChem
Tipo de publicación	Portada - Cover Feature: Excited-State Pathways of Four-Coordinate N,C-Chelate Organoboron Dyes
Enlace web	https://doi.org/10.1002/cptc.201700226
Fecha	2018/10
Revista	Chemical Communications
Tipo de publicación	Contraportada - Light-induced cargo release from a cucurbit[8]uril host by means of a sequential logic operation
Enlace web	https://doi.org/10.1039/C8CC07404F
Fecha	2018 / 2019
Organización	European Photochemistry Association (EPA)
Tipo de publicación	Tríptico
Enlace web	https://www.photochemistry.eu

Permiso de conducir

Carnet B y vehículo propio

Capítulo 8: Anexos

Los artículos publicados, que forman parte del capítulo 8, han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a derechos de autor. En sustitución de los artículos ofrecemos la siguiente información: referencia bibliográfica, enlace a la revista y resumen.

-Domínguez Hidalgo, Z., López Rodríguez, R., Álvarez, E., Abbate, S., Longhi, G., Pischel, U., Ros, A. "Azabona[5]helicene Charge-Transfer Dyes Show Efficient and Spectrally Variable Circularly Polarized Luminescence". *Chemistry – A European Journal*, 2018, 24, 12660-12668. <https://doi.org/10.1002/chem.201801908>

Enlace al texto completo del artículo: <https://doi.org/10.1002/chem.201801908>

RESUMEN:

Three helicenes based on a borylated arylisoquinoline skeleton have been prepared in their enantiopure forms and characterized with respect to their photophysical properties, including the use of chiroptical spectroscopies. The dyes show varying charge-transfer characteristics and efficient emission (quantum yields between 0.13 and 0.30, in toluene), which is governed by the electron-donor substitution (*p*-MeO-phenyl, *p*-Me₂N-phenyl) at the helicene. Marked differences in the emission wavelength and Stokes shift are observed, with the dimethylamino-substituted derivative emitting most red-shifted (maximum at ca. 590 nm) and displaying the highest Stokes shift (ca. 6000 cm⁻¹) in toluene. The helicenes show electronic circular dichroism (ECD) and significant circularly polarized luminescence (CPL) with dissymmetry factors of up to 3.5×10⁻³. The sign of the ECD band corresponding to the first transition and of the CPL spectrum depend sensibly on the electron-donor substitution.

-Domínguez Hidalgo, Z., Pais, V.F., Collado, D., Vázquez Domínguez, P., Nájera Albendín, F., Perez Inestrosa, E., Ros, A., Pischel, U.: "p-Extended Four-Coordinated Organoboron N,C-Chelates as Two-Photon Absorbing Chromophores". *The Journal of Organic Chemistry*, 2019, 84, 13384-13393. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01542>

Enlace al texto completo del artículo: <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01542>

RESUMEN:

Four-coordinate N,C-chelate organoboron dyes with alkynyl spacers were synthesized by Heck alkynylation. These dyes are π -extended analogues of the recently reported class of four-coordinate borylated arylisoquinolines (BAI). Depending on the electron-donor substitution, they feature an intramolecular charge-transfer (ICT) character in the excited state. This translates into pronounced apparent Stokes shifts (up to 8500 cm⁻¹)

and a solvatochromic behavior. In general, the observed emission quantum yields are high in nonpolar media (Φ_F ca. 0.5–0.6). For the dye with the most pronounced ICT rather high emission quantum yields (Φ_F ca. 0.4) are observed for emissions with maxima longer than 600 nm in solvents of moderate polarity. The π -extended dyes show interesting two-photon absorption (TPA) properties, maintaining high cross sections (up to 60 GM) in the near-infrared wavelength window (>900 nm). One of the dyes was designed as dimeric chromophore, integrating the acceptor- π -acceptor (A- π -A) format. This alternative design showed no ICT behavior but led to the observation of high two-photon-absorption (TPA) cross sections (ca. 220 GM at 700 nm). All investigated dyes show pronounced photostability, providing added value to this structural and photofunctional extension of the BAI dye platform.

-Santos, F.M., Domínguez Hidalgo, Z., Alcaide, M.M., Matos, A.I., Florindo, H.F., Candeias, N.R., Gois, P.M.P., Pischel, U.: “Highly Efficient Energy Transfer Cassettes by Assembly of Boronic Acid Derived Salicylidenehydrazone Complexes”. ChemPhotoChem, 2018, 2, 1038-1045. <https://doi.org/10.1002/cptc.201800150>

Enlace al texto completo del artículo: <https://doi.org/10.1002/cptc.201800150>

RESUMEN:

Energy transfer cassettes that build on the platform of boronic acid derived salicylidenehydrazone (BASHY) complexes were prepared. The functional flexibility of the BASHY chromophore was underpinned by its tunable role as energy donor or acceptor, integrated in compact and non-conjugated bichromophoric dyads. The energy transfer is highly efficient ($\Phi_{ET} > 0.95$) and is assumed to proceed mainly via a through-bond mechanism. Both constituent chromophores benefit mutually from their integration in the cassettes: a) The pseudo Stokes shift is increased to 110–200 nm; b) the antenna (donor) chromophore improves the light absorption of the acceptor chromophore; and c) the emission window of the BASHY chromophore is expanded in the BASHY-Bodipy dye without using strategies that compromise the observation of high quantum yields. The application of the cassettes for the formulation of fluorescent polymeric nanoparticles, that can be internalized in cells and observed by fluorescence imaging, was demonstrated using the BASHY-Bodipy dye as an example.

