



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE BODIPYS DERIVADOS DE INDOL
CON POSIBLE APLICACIÓN COMO SONDAS FLUORESCENTES.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
LUIS JAVIER SÁNCHEZ SÁNCHEZ



DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSÉ NORBERTO FARFÁN GARCÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. AÑO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

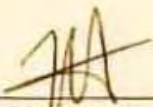
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
VOCAL: Profesor: Q. María de los Ángeles Olvera León
SECRETARIO: Profesor: Dr. José Norberto Farfán García
1er. SUPLENTE: Profesor: Dr. Jacinto Eduardo Mendoza Pérez
2° SUPLENTE: Profesor: M. en C. Elizabeth Reyes López

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. FACULTAD DE QUÍMICA. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA. LABORATORIO 204-F.



ASESOR DEL TEMA: DR. JOSÉ NORBERTO FARFÁN GARCÍA



SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. PABLO LABRA VÁZQUEZ



SUSTENTANTE (S): LUIS JAVIER SÁNCHEZ SÁNCHEZ

Agradecimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado a través de la beca a P. L. -V (337958) y a los programas PAPIIT y PAIP de la Facultad de Química por el apoyo financiero otorgado. Así como al subprograma 127 de la Facultad de Química por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

Índice.

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 Luminiscencia	2
2.1.1. Breve historia de la fluorescencia y fosforescencia.....	3
2.1.2. Transiciones electrónicas.....	6
2.1.3. Fluorescencia.....	7
2.2. Sondas Fluorescentes	8
2.2.1. BODIPYs como sondas fluorescentes	11
2.2.1.1. BODIPYs reactivos con aminas	12
2.2.1.2. BODIPYs reactivos con aldehído/cetona	13
2.2.1.3. BODIPYs reactivos con biotioles.....	14
2.2.1.4. BODIPY como sonda fluorescente selectiva al retículo endoplásmico	15
2.2.1.5. BODIPY como sensor ratiométrico de viscosidad	16
2.2.2. Sondas fluorescentes con grupos indol.....	17
2.2.2.1. Análogos de triptofano.	17
2.2.2.2. Sensores de Mercurio	18
2.2.2.3. Sensores de tiofenoles.....	19
2.3. Dipirrometano.....	20
2.4. BODIPY.....	21
2.4.1. Síntesis de BODIPYs	23
3. Objetivos.....	25
4. Resultados y Discusión.....	26
5. Conclusiones	45
6. Desarrollo experimental	47
7. Bibliografía.....	67

1. Introducción.

Dentro de las células se encuentra un entorno dinámico donde interaccionan gran cantidad de moléculas, niveles anormales de algunas biomoléculas están asociados a diversas enfermedades; por lo que son necesarias técnicas eficientes para su detección y monitoreo dentro del citoplasma. Una alternativa es el uso de sondas fluorescentes donde los derivados del *4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno* (BODIPYs) han recibido gran interés para su uso en bioimagen debido a su estabilidad en pH fisiológico, su alta absorción y emisión de fluorescencia, estabilidad fotoquímica, solidez química y baja toxicidad.

Es de gran interés en nuestro grupo de trabajo desarrollar nuevas moléculas que puedan ser utilizadas como sondas fluorescentes y además sean selectivas y reconocibles por la célula. El desarrollo de sondas fluorescentes selectivas hacia algún organelo es complicado lo cual se refleja en el precio de éstas; un ejemplo de esto es la sonda BODIPY FL, utilizada para marcar aminos en las proteínas, la que tiene un precio de \$240.00 USD por 5 mg de compuesto,^[1] mientras la sonda ER-TrackerTM Red, utilizada para marcar selectivamente el retículo endoplásmico, tiene un precio de \$8,861.11 pesos por 100 µg.^[2] La introducción de un grupo fácilmente reconocible por la célula, como lo es el indol (residuo del triptofano), debe proporcionar un fácil acceso al interior de la célula y posiblemente un ingreso selectivo a algún compartimiento intracelular.

2. Antecedentes.

2.1 Luminiscencia.

La luminiscencia es la emisión de luz por cualquier sustancia y ocurre a partir de estados electrónicamente excitados. El término proviene del latín *lumen*=luz y fue introducido por primera vez como *luminescenz* por el físico e historiador científico alemán Eilhard Wiedemann en 1888, para describir “**todos aquellos fenómenos de luz que no están únicamente condicionados por el aumento de la temperatura**”, a diferencia de la incandescencia.^[3] Cabe recalcar que la definición actual de luminiscencia **es “emisión espontánea de radiación de una especie electrónicamente excitada (o de una especie excitada por vibración) que no está en equilibrio térmico con su entorno”**.^[4]

Los diferentes tipos de luminiscencia son clasificados de acuerdo con el modo de excitación. La fluorescencia y la fosforescencia (Figura 1) son casos particulares de luminiscencia, el modo de excitación es la absorción de un fotón que lleva a la molécula a un estado de excitación electrónica. La emisión de fotones se conoce como fotoluminiscencia y es uno de los efectos físicos de la interacción de la luz con la materia.

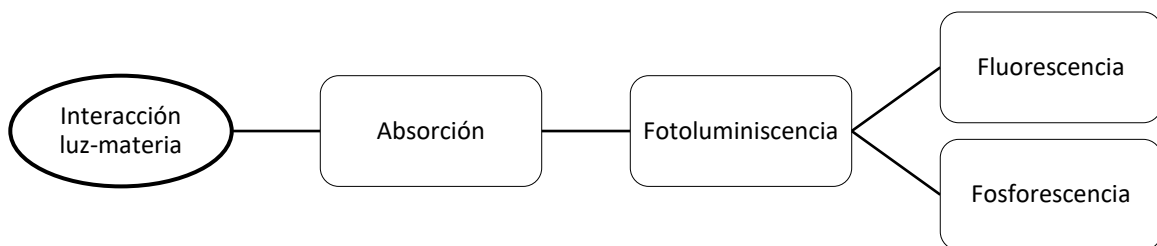


Figura 1. Algunos tipos de interacciones luz-materia.

2.1.1. Breve historia de la fluorescencia y fosforescencia.

En 1565 Nicolás Monardes, un médico y botánico español, informó un peculiar color azul de una infusión de una madera de México usada para tratar enfermedades renales y urinarias.^[5] Esta madera llamada *Lignum nephriticum*, cuyo peculiar efecto de color y propiedades diuréticas ya eran conocidas por los aztecas, era una medicina escasa y costosa. Por lo tanto, era de interés detectar madera falsificada. Monardes escribió al respecto "asegúrese de que la madera hace que el agua se vuelva azulada, de lo contrario, es una falsificación." Este método para la detección de un objeto falsificado se puede considerar como la primera aplicación del fenómeno que luego se llamaría fluorescencia.

La especie química responsable de la intensa fluorescencia azul se llama matlalina (Figura 2). Este compuesto no está presente en la planta, pero es el resultado de una oxidación de los flavonoides del árbol.^[6]

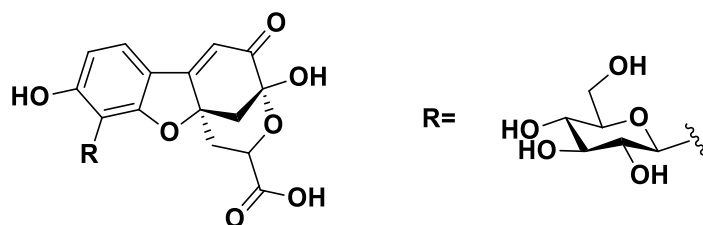


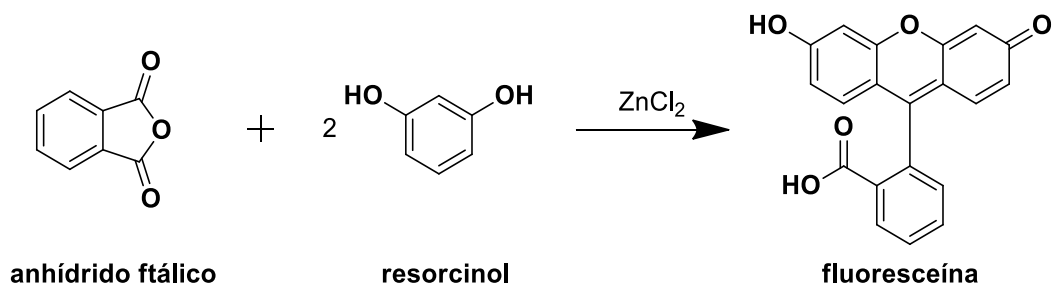
Figura 2. Estructura del tetrahidrometanobenzofuro[2,3-d]oxacino (matlalina)

En 1819, Edward D. Clarke, profesor de mineralogía en la Universidad de Cambridge informó sobre una propiedad peculiar de algunos cristales de fluorita de Weardale, Durham, Inglaterra.^[7] Los cristales más finos, perfectamente transparentes, tenían una naturaleza dicroica. En 1833,

Sir David Brewster, físico escocés,^[8] informa que cuando un haz de luz solar pasa a través de un extracto alcohólico verde de las hojas (principalmente clorofila), éste parece de color rojo. En 1842 el físico francés Edmond Becquerel describió la emisión de luz por sulfuro de calcio cuando se expone a la radiación ultravioleta y fue el primero en declarar que la luz emitida es de mayor longitud de onda que la luz incidente.^[9]

Quizá el evento más importante en la historia de la fotoluminiscencia fue la publicación en 1852 por el físico y profesor de matemáticas en Cambridge **Sir George Gabriel Stokes de su artículo titulado "On the Refrangibility of Light"**, en el cual Stokes identificó, en varias muestras tanto orgánicas (incluida la quinina) como inorgánicas (incluido un cristal de fluorita), claramente un fenómeno común que denominó como reflexión dispersiva: las longitudes de onda de la luz dispersa siempre es más larga que la longitud de onda de la luz original, la misma conclusión a la que llegó Edmond Becquerel. También notó que cuando se irradiaba una solución de quinina con la porción ultravioleta del espectro la solución brillaba con una luz azul, mientras que cuando se irradiaba con la porción visible del espectro la solución permanecía transparente. En 1853 utilizó por primera vez la palabra fluorescencia para describir este fenómeno reemplazando el término de reflexión dispersiva.

En 1871 fue sintetizada la fluoresceína (Esquema 1) por el químico alemán A. von Baeyer a partir de resorcinol y anhídrido ftálico por medio de una reacción de Friedel-Crafts usando cloruro de zinc como catalizador.^[10] Finalmente en 1888 se utiliza el término luminiscencia por el físico alemán Eilhard Wiedemann.^[3]



Esquema 1. Ruta sintética utilizada por A. von Baeyer para obtener la fluoresceína.

Desde mediados del siglo XX, muchos fabricantes de papel comenzaron a incorporar en sus procesos de producción ciertos aditivos ópticos con la finalidad de hacerlo fluorescente y así dificultar su falsificación y evitar fraudes al sistema postal o monetario^[11] (Figura 3).



Figura 3. Billetes que contienen aditivo fluorescente para evitar su falsificación.^[12]

2.1.2. Transiciones electrónicas.

Cuando una molécula absorbe un fotón, ocurre una transición electrónica desde su estado fundamental a uno excitado, resultando en una nueva configuración electrónica. Los electrones pueden acceder a orbitales moleculares desocupados de más alta energía y, de acuerdo con las diferentes configuraciones posibles, pueden formar diversos estados excitados.^[13]

Un orbital molecular σ puede formarse a partir de dos orbitales s , de un orbital p y uno s , o de dos orbitales p que tienen un eje de simetría colineal. Mientras que un orbital molecular π se forma a partir de dos orbitales atómicos p que se traslapan lateralmente.

La absorción de un fotón de energía adecuada puede promover uno de los electrones π a un orbital de antienlace, π^* . Esta transición electrónica se llama $\pi \rightarrow \pi^*$. La energía para la promoción de un electrón σ es mucho más alta, para que esto ocurra se necesita una absorción en la región del ultravioleta lejano.

Una molécula puede poseer electrones de no enlace situados en heteroátomos como oxígeno o nitrógeno, los orbitales correspondientes se denominan orbitales n . Es posible la promoción de un electrón n a un orbital de antienlace y la transición se denomina $n \rightarrow \pi^*$.

La energía de estas transiciones electrónicas generalmente sigue el siguiente orden^[3]:



Otra clasificación de orbitales moleculares que se debe considerar son el orbital molecular de mayor energía llamado HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) y el orbital molecular desocupado de menor energía

denominad LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Ambos orbitales se refieren al estado fundamental de la molécula.

Los procesos que ocurren entre la absorción y emisión de luz se ilustran en el diagrama de Jablonski (Figura 4), estos diagramas llevan el nombre del profesor Alexander Jablonski, considerado el padre de la espectroscopía de fluorescencia. Las transiciones entre estados se representan como líneas verticales. La emisión de fotones acompañados de una relajación $S_1 \rightarrow S_0$ (transición singulete-singulete) se llama fluorescencia. Las moléculas en el estado S_1 también pueden sufrir una conversión de espín al primer estado triplete T_1 , cruce entre sistemas, la emisión de T_1 se denomina fosforescencia.^[14]

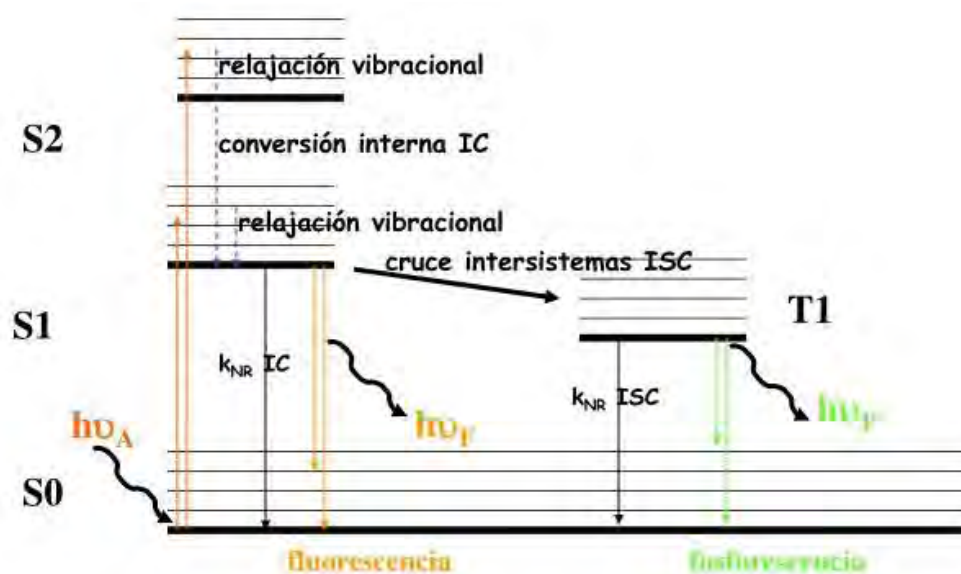


Figura 4. Diagrama típico de Jablonski.^[3]

2.1.3. Fluorescencia.

La fluorescencia es la emisión de un fotón desde un orbital singulete excitado al estado basal (normalmente se denomina S_0 al estado basal y S_1 , S_2 , ..., S_i para los estados excitados), generalmente $S_1 \rightarrow S_0$, las

velocidades de emisión de fluorescencia son típicamente 10^8 s^{-1} y el tiempo de vida es cercano a 10 ns, por lo que para un observador la fluorescencia cesa tan pronto como la fuente de excitación es eliminada. El tiempo de vida (τ) de un fluoróforo es el tiempo medio entre su excitación y el retorno al estado basal. La fosforescencia es la emisión de luz desde un estado triplete excitado al estado basal, las velocidades de emisión son lentas, de 10^3 a 10^0 s^{-1} , y los tiempos de vida están típicamente en el orden de los milisegundos a los segundos.^[14] La eficiencia con que una molécula produce fluorescencia se llama rendimiento cuántico fluorescente y es la relación que existe entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos.^[15]

Actualmente ha habido un crecimiento notable en el uso de la fluorescencia en las ciencias biológicas. La fluorescencia es ahora una metodología dominante utilizada ampliamente en biotecnología, citometría de flujo, diagnóstico médico, secuenciación de ADN y análisis forense y genético, por nombrar algunos. La detección de fluorescencia es altamente sensible, y ya no es necesario el gasto y las dificultades de manejar marcadores radioactivos para la mayoría de las mediciones bioquímicas. Ha habido un crecimiento espectacular en el uso de fluorescencia para imágenes celulares y moleculares. Las imágenes de fluorescencia pueden revelar la localización y las mediciones de moléculas intracelulares, incluso a veces alcanza a detectar una sola molécula.^[14]

2.2. Sondas Fluorescentes.

Dentro del citoplasma de las células se encuentran una gran cantidad de iones, moléculas pequeñas y biomoléculas que interactúan continuamente entre sí en un entorno dinámico. Estas interacciones son

vitales para los organismos vivos y son estrechamente reguladas por las células. Sin embargo, cualquier mala regulación puede desencadenar varios estados de enfermedad. Por tal motivo es muy importante vigilar los procesos celulares a nivel molecular en las células vivas con el fin de comprender los roles biológicos. Con ese fin, las imágenes de fluorescencia son un candidato prometedor para visualizar las células vivas en su entorno, ya que ofrecen alta selectividad y sensibilidad, así como técnicas de imagen en tiempo real, rápidas, fáciles y económicas.^[16]

El desarrollo de la sonda fluorescente molecular ha evolucionado hasta convertirse en un atractivo campo de estudio, principalmente después del estudio de Tsien sobre la detección fluorescente de Ca^{2+} en 1980.^[17] La estrategia común es utilizar interacciones supramoleculares reversibles y no covalentes en el diseño de sondas fluorescentes. En consecuencia, la mayoría de las sondas fluorescentes sintéticas contienen un sitio de unión y un núcleo de señalización, que están vinculados entre sí. La interacción selectiva de una sonda con un analito objetivo a través de un sitio de unión produce cambios ópticos medibles en el núcleo de señalización (en forma de intensidad de emisión o longitud de onda de emisión), que pueden detectarse con varias técnicas espectroscópicas.

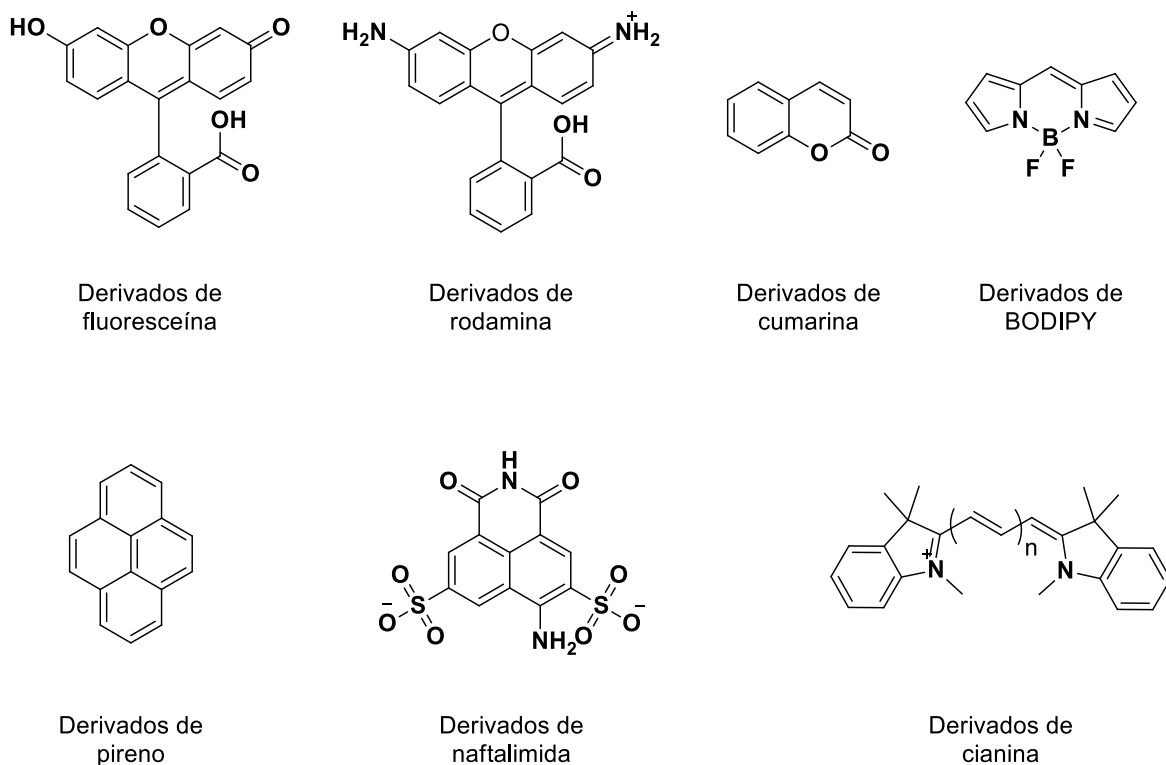
Hay dos enfoques para modular la fluorescencia: respuesta intensométrica, también conocida como ON-OFF, o ratiométrica. En sistemas ON-OFF, el agente de fluorescencia no produce fluorescencia hasta interactuar con el objetivo biológico. En sistemas ratiométricos, el agente de fluorescencia es inicialmente fluorescente y la interacción con el objetivo biológico cambia su espectro de fluorescencia de modo que el cálculo de la relación de intensidades de emisión en dos longitudes de onda distingue a los agentes inactivos y activados. Los sistemas de fluorescencia ratiométrica son importantes en el campo del desarrollo de sistemas de suministro de fármacos, ya que son capaces de distinguir la

activación por fluorescencia en el objetivo, de la acumulación de agentes de fluorescencia inactivos fuera del objetivo.^[18]

Las sondas fluorescentes para aplicaciones de bioimagen deben cumplir requisitos estrictos: una sonda útil debería responder selectivamente a su objetivo previsto en un complejo sistema biológico que contiene una serie de analitos en competencia. La biocompatibilidad es otra consideración crítica, para que una reacción sea un desencadenante adecuado para aplicaciones de detección e imágenes, debe proceder bajo condiciones biológicas de pH, alto contenido de sal y un gran exceso de tioles nucleofílicos reactivos. Finalmente, una sonda ideal debe ser totalmente bioortogénica: no debe interferir con los procesos endógenos celulares y tisulares, y debe generar productos que sean inertes y no tóxicos para los sistemas vivos. El éxito en este enfoque requiere no sólo de un conocimiento práctico de la reactividad orgánica, organometálica e inorgánica fundamental, sino también una comprensión de la reactividad intrínseca del analito objetivo en su entorno biológico.^[19]

La mayoría de los fluoróforos de uso práctico en el etiquetado de biomoléculas contienen un sistema de anillo aromático como generador de fluorescencia. En general, a medida que el sistema de electrones conjugados se hace más grande, la longitud de onda de emisión se desplaza a valores más altos. Además, los rendimientos cuánticos de los sistemas conjugados más grandes típicamente son mayores que los de compuestos aromáticos pequeños. La mayoría de las sondas pueden diseñarse para que contengan un grupo reactivo capaz de acoplarse a los grupos funcionales de biomoléculas.^[20]

Algunas de las sondas fluorescentes más populares son los mostrados en el Esquema 2.^[20]



Esquema 2. Principales sondas fluorescentes utilizadas.

La estabilidad a pH fisiológico, su alta absorción y emisión de fluorescencia, estabilidad fotoquímica, solidez química y baja toxicidad hacen de los BODIPYs una excelente opción en el diseño de sondas fluorescentes para uso en sistemas biológicos. Por lo tanto, han recibido un interés sustancial como fluoróforos en la bioimagen, el etiquetado biológico y los ensayos de fluorescencia.^[21]

2.2.1. BODIPYs como sondas fluorescentes.

Los BODIPYs son moléculas formadas por tres ciclos en una estructura análoga al *s*-indaceno,^[22] debido a esta analogía el BODIPY sigue una numeración similar (Figura 5), con tres heteroátomos, debido

a sus excelente propiedades físicas y químicas han ganado reconocimiento como compuestos muy versátiles.^[23] Se pueden modificar, particularmente en sus posiciones 1, 3, 5, 7 y 8,^[20, 24] para producir nuevos fluoróforos con diferentes características. Las modificaciones causan cambios en las longitudes de onda de excitación y emisión y pueden proporcionar sitios para el acoplamiento químico para etiquetar biomoléculas.

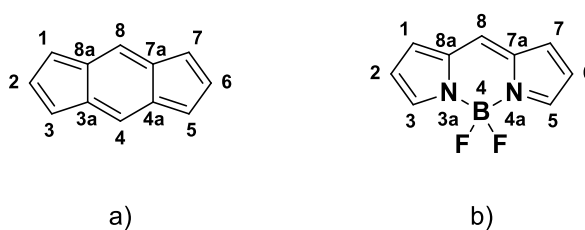
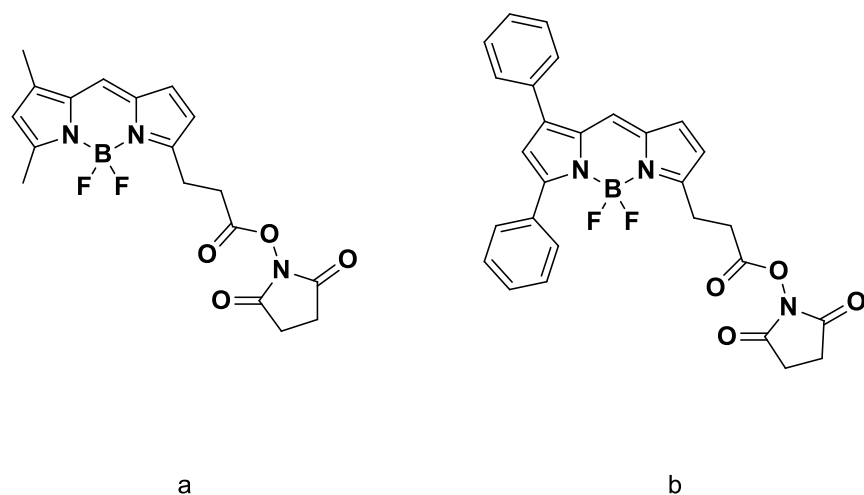


Figura 5. Estructura y numeración del a) s-indaceno y b) BODIPY

2.2.1.1. BODIPYs reactivos con aminas.

Los colorantes BODIPY FL y BODIPY 530/550 C₃-SE (Esquema 3) son los principales colorantes utilizados para marcar aminas.^[2] Contienen un grupo éster NHS (succinimidil éster) que es utilizado para marcar aminas primarias de proteínas, oligonucleótidos modificados con aminas y otras biomoléculas que contienen aminas. Además, tienen propiedades hidrofóbicas ideales para teñir lípidos, membranas y otros compuestos lipofílicos. El BODIPY FL emite fluorescencia de color verde, mientras que el BODIPY 530/550 C₃-SE emite luz de color naranja.^[2, 20]

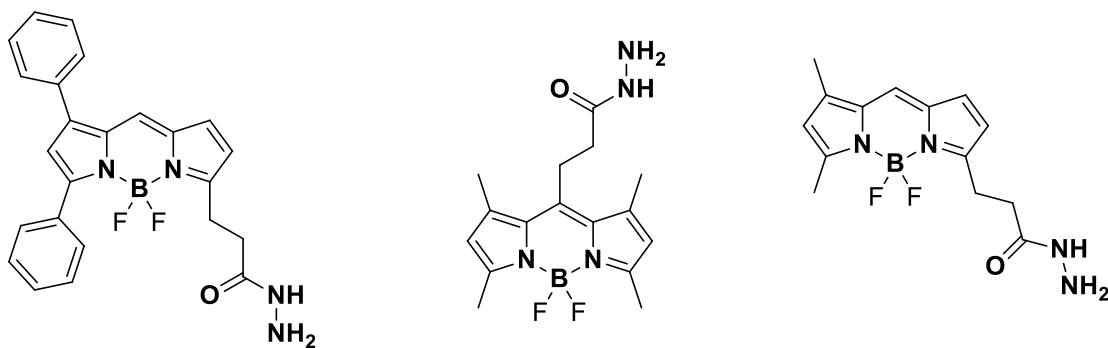


Esquema 3. a) Estructura del BODIPY FL y b) Estructura del BODIPY 530/550 C₃-ES

2.2.1.2. BODIPYs reactivos con aldehído/cetona.

Las biomoléculas, como las proteínas, generalmente no poseen residuos de aldehídos, sin embargo, la carbonilación de las proteínas y aminoácidos (principalmente Lys, Arg, Pro y Thr) es un indicador de estrés oxidativo asociados a diversas enfermedades.^[25] Los grupos hidrazida reaccionan con los grupos aldehído y cetona para formar enlaces hidrazona.^[20, 26]

Las sondas fluorescentes BODIPY 530/550 C₃ Hidrazida, BODIPY 493/503 C₃ Hidrazida y BODIPY FL C₃ Hidrazida (Esquema 4) contienen un grupo hidrazida ideal para identificar proteínas oxidadas.^[2]



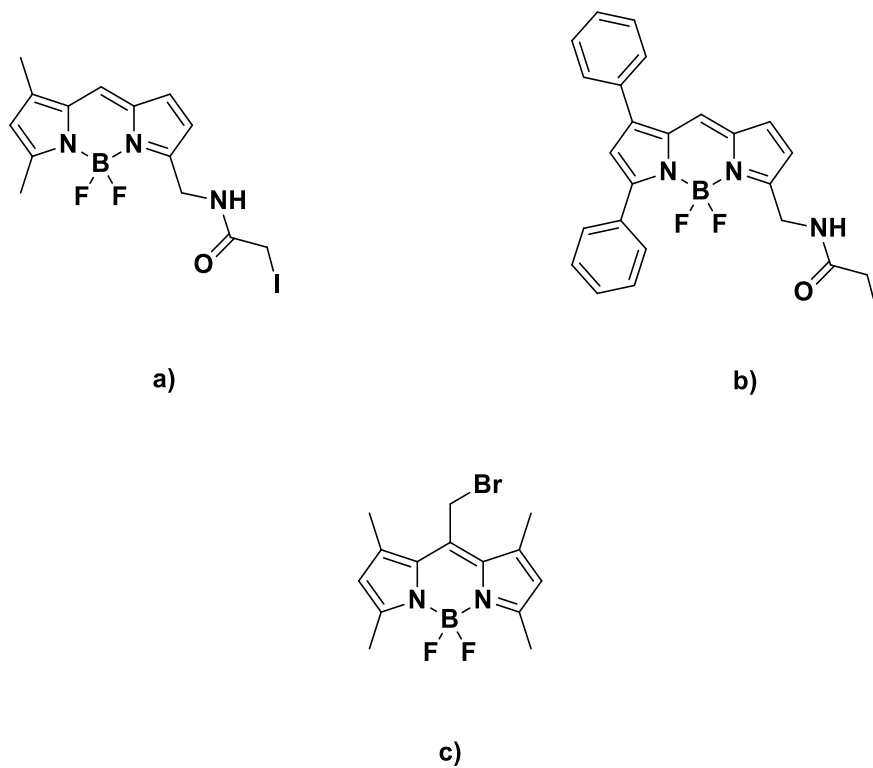
BODIPY 530/550 C₃ Hydrazide **BODIPY 493/503 C₃ Hydrazide** **BODIPY FL C₃ Hydrazide**

Esquema 4. Estructura de las sondas fluorescentes reactivas con aldehídos y cetonas.

2.2.1.3. BODIPYs reactivos con biotioles.

Los tioles biológicos (cisteína, homocisteína y glutatión) son moléculas importantes en la homeostasis redox dentro de la célula. Niveles inusuales de estos tioles están asociados a diversas enfermedades. Por este motivo es necesario monitorear los niveles de estos compuestos dentro de la célula.^[16]

Los BODIPYs FL IA y 530/550 IA^[2] (Esquema 5) contienen un grupo yodoacetamida que reacciona con los grupos sulfidrilo de las proteínas para obtener un enlace tipo tioéster estable. El Br-BODIPY 493/503^[2] (Esquema 5) contiene un grupo bromometilo, el cual reacciona con los grupos -SH para forma un enlace tipo tioéter.^[16, 20]



Esquema 5. Estructura del a) BODIPY FL IA b) BODIPY 530/550 IA y c) Br-BODIPY 493/503.

2.2.1.4. BODIPY como sonda fluorescente selectiva al retículo endoplásmico.

El ER-Tracker™ Red (Figura 6) es altamente selectivo para el retículo endoplásmico. Este BODIPY contiene de glibenclamida que se une a los receptores de sulfonilurea de canales K⁺ sensibles al adenosín trifosfato (ATP) que son prominentes en retículo endoplásmico.^[2]

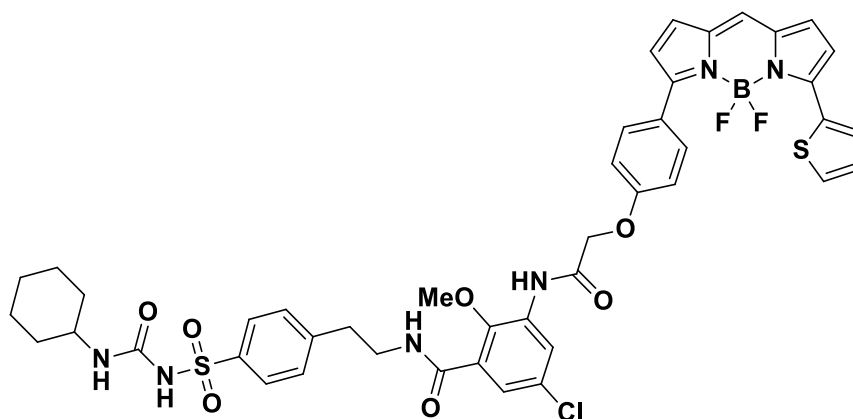
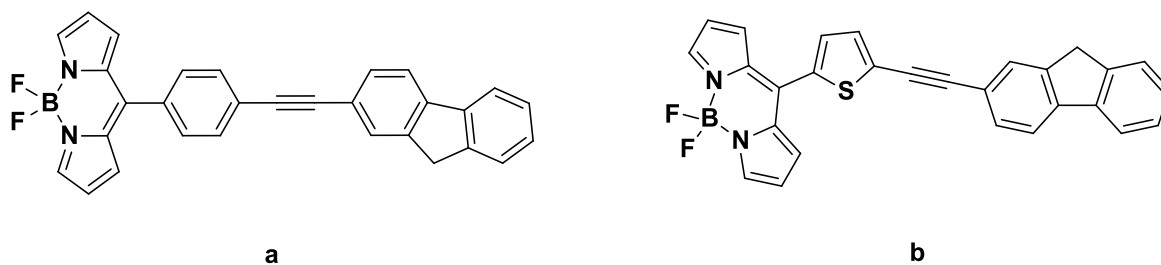


Figura 6. Estructura del ER-Tracker™ Red

2.2.1.5. BODIPY como sensor ratiométrico de viscosidad.

La viscosidad intracelular tiene una influencia importante en el transporte y en la interacción de biomoléculas. Se ha demostrado que los cambios en la viscosidad intracelular están relacionadas con una gran variedad de enfermedades como el Alzheimer, arteriosclerosis y diabetes.^[27] Por este motivo es necesario monitorear la viscosidad dentro de la célula, para ello nuestro grupo ha diseñado varias sondas fluorescentes como las sondas derivadas de etinil-fluoreno (Esquema 6). Ambos compuestos presentan una respuesta ratiométrica fluorescente ante los cambios de viscosidad en el medio.^[28]

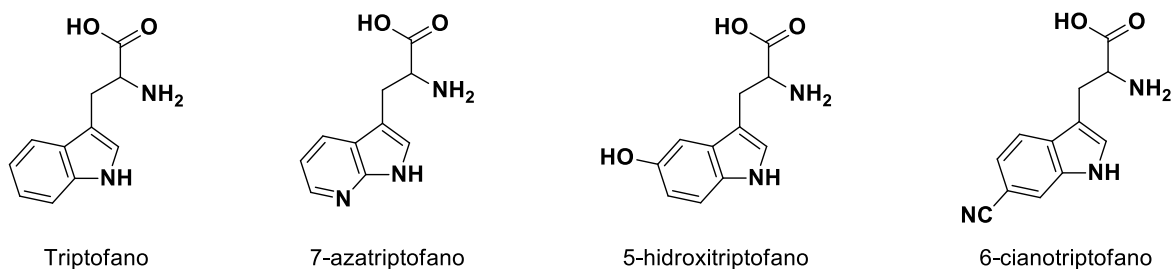


Esquema 6. Estructura de algunos sensores de viscosidad desarrollados por nuestro grupo.^[28]

2.2.2. Sondas fluorescentes con grupos indol.

2.2.2.1. Análogos de triptofano.

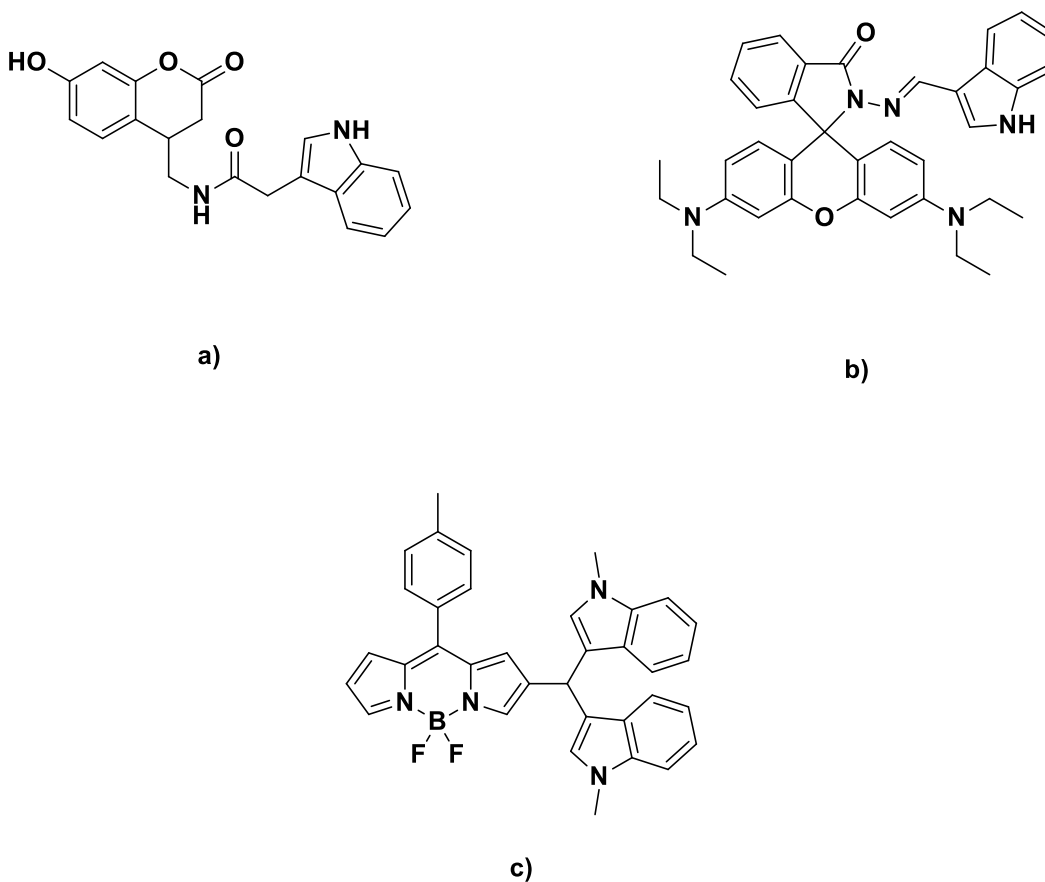
El triptofano es la sonda fluorescente intrínseca más común pues la emisión de este aminoácido generalmente domina la fluorescencia de las proteínas, por lo que ha sido utilizado en el uso de sondas fluorescentes no disruptivas.^[29] Estas sondas fluorescente son importantes cuando se estudian los cambios conformacionales de alguna enzima, por lo que se han empleado análogos del triptofano con el fin de desarrollar fluoróforos más pequeños y sensibles que no perturben la conformación de la proteína. Entre los análogos más ampliamente utilizados se encuentran los azatriptofanos (Esquema 7) que han demostrado ser sustitutos casi ideales para el triptofano en las proteínas celulares.^[30]



Esquema 7. Estructura del triptofano y de algunos de sus análogos.

2.2.2.2. Sensores de mercurio.

El mercurio es un contaminante altamente peligroso, las actividades humanas son las principales causas de contaminación de mercurio en el ambiente; el mercurio atmosférico genera eventualmente metilmercurio principalmente en sistemas acuáticos que posteriormente ingresa al cuerpo humano por ingesta de alimentos. El Hg^{2+} se considera como una de las principales causas de enfermedades neurológicas y daño en el ADN, por lo que es necesario el desarrollo de herramientas efectivas para la detección de este metal.^[31] Algunas sondas de este tipo son la *N*-((7-hidroxi-2-oxo-2H-cromen-4-il)metil)-2-(1H-indol-3-il)acetamida,^[31] derivados de indol-rodamina^[32] y derivados de indol-BODIPY^[33] (Esquema 8) han demostrado buenos resultados para detectar Hg^{2+} a través de la coordinación de múltiples átomos de nitrógeno con el mercurio.^[31-33]



Esquema 8. Estructura de a) *N*-((7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromen-4-*il*)metil)-2-(1*H*-indol-3-*il*)acetamida,^[31] b) Derivado de indol-rodamina^[32] y c) Derivado de indol-BODIPY^[33]

2.2.2.3. Sensores de tiofenoles.

Los tiofenoles, usualmente usados como pesticidas, son muy nocivos para humanos y animales debido a que pueden entrar fácilmente al cuerpo humano por inhalación o absorción de la piel, pueden causar tos, vómito, debilidad muscular, parálisis, coma e incluso la muerte.^[34] Por lo que es necesario el desarrollo de sensores capaces de discriminar entre tioles alifáticos (glutación y cisteína) y tiofenoles. El derivado BODIPY-2 basado en indol como un fluoróforo y un grupo DNBS (2,4-

dinitrobenzenosulfonilo) como unidad de reconocimiento ha dado buenos resultados en la detección de tiofenoles (Figura 7).^[35]

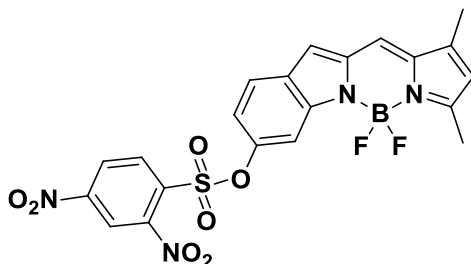


Figura 7. Estructura del Bodipy-2.^[35]

2.3. Dipirrometano.

Los dipirrometanos constituyen importantes bloques de construcción en la síntesis de porfirinas, corroles, clorinas, porfidimetenos, colorantes BODIPY y complejos dipirrinato.^[36] Se caracterizan por contener dos unidades de pirrol unidas por un carbono sp^3 (Figura 8), donde el carbono que une a los pirroles recibe el nombre de posición *meso*.^[37]

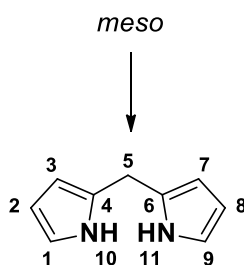
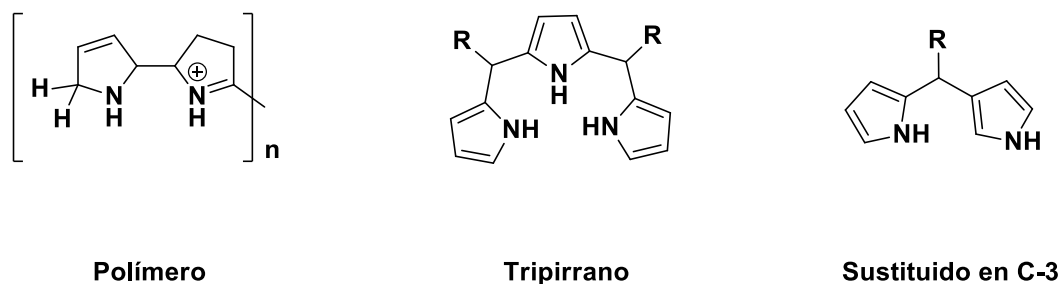


Figura 8. Estructura y numeración del dipirrometano

La síntesis de los dipirrometanos a partir de aldehídos y el pirrol es un poco complicada debido a que resulta en una mezcla de subproductos: el polímero correspondiente, un tripirrano y dipirrometanos sustituidos en C-3 (Esquema 9).^[38]



Esquema 9. Subproductos comunes en la síntesis de dipirrometanos

La ruta sintética más común es la de Lindsey y colaboradores,^[39] que utiliza catálisis ácida (comúnmente ácido trifluoroacético), un aldehído o cetona y un exceso de pirrol (Esquema 10).



Esquema 10. Síntesis de dipirrometano

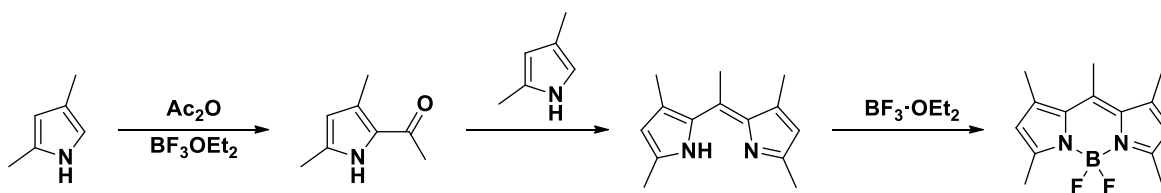
2.4. BODIPYs.

Los 4-4-difluoro-4-borata-3a-azonia-4a-aza-s-indacenos, comúnmente abreviados BODIPYs, han ganado reconocimiento como una

familia de compuestos muy versátil que ha encontrado gran número de aplicaciones entre los químicos, bioquímicos y físicos. Aplicaciones tan diversas como etiquetas de biomoléculas, sondas cromógenas, agentes de administración de fármacos, interruptores fluorescentes, películas electroluminiscentes, tintes láser, recolectores de luz y sensibilizadores para celdas solares.^[23]

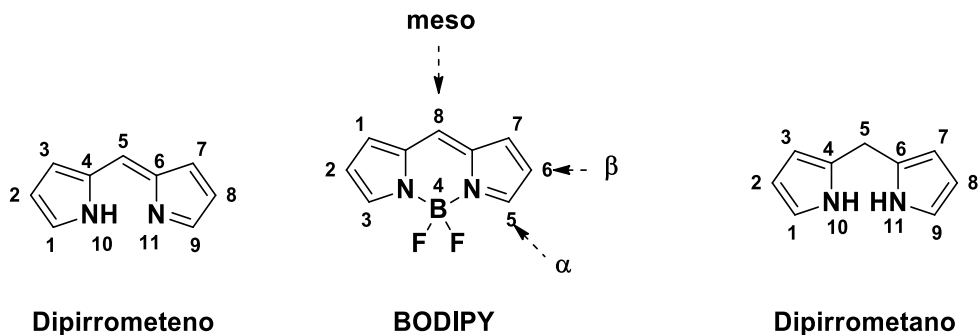
Los BODIPYs han sido reconocidos por sus excelentes propiedades ópticas tales como altos coeficientes de absorción, rendimientos cuánticos de fluorescencia elevados y notable fotoestabilidad.^[24]

El primer BODIPY conocido fue aislado por Tiebs y Kreuzer en 1968, cuando llevaban a cabo la acetilación del 2,4-dimetilpirrol con anhídrido acético utilizando el eterato del trifluoruro de boro ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) como catalizador ácido. Una vez formado el producto deseado, éste se condensó con otra molécula de 2,4-dimetilpirrol para formar un dipirrometano, y posteriormente este análogo del dipirrometano reacciono con el $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ para dar lugar al BODIPY (Esquema 11).^[40]



Esquema 11. Ruta sintética del primer BODIPY reportado.^[40]

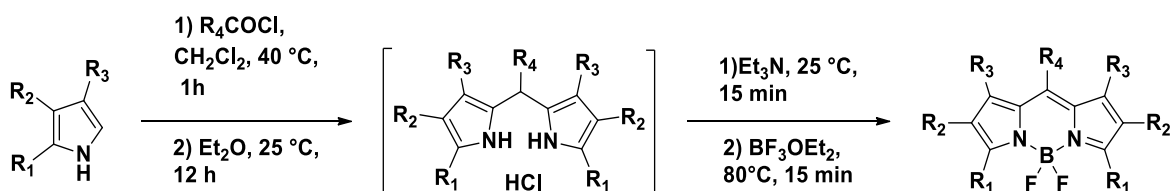
La numeración del núcleo BODIPY (Esquema 12) es distinta a la del dipirrometano y del dipirrometeno por lo que generalmente para nombrar los sustituyentes se denominan α , β y *meso* en los tres compuestos.^[37]



Esquema 12. Estructura y numeración de los núcleos de dipirrometeno, dipirrometano y BODIPY.

2.4.1. Síntesis de BODIPYs.

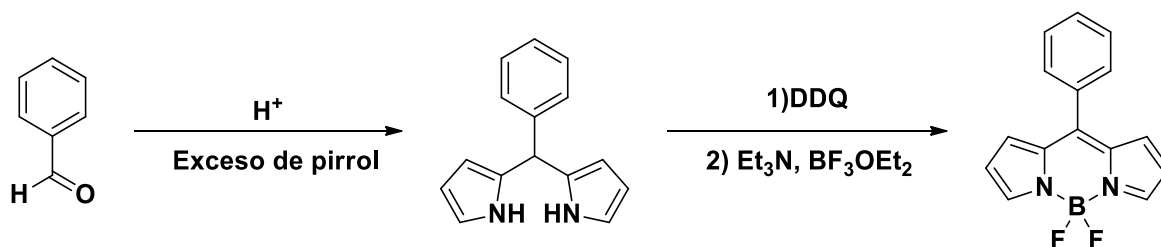
Los BODIPYs *meso* sustituidos se pueden preparar a partir de la condensación de cloruros de acilo con pirrol, generando un intermediario inestable (clorhidrato de dipirrometeno) que generalmente no se aísla (Esquema 13).^[37]



Esquema 13. Síntesis de BODIPYs a partir de la reacción de haluros de acilo con pirrol.

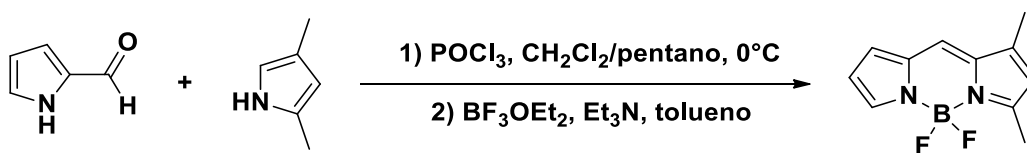
Otra metodología más común es prepararlos a partir de la condensación de pirrol con aldehídos aromáticos en medio ácido, para formar un dipirrometano que es oxidado posteriormente con DDO (2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona) o *p*-cloranil para obtener el dipirrometeno que

finalmente se coordina con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ en presencia de trietilamina para introducir la unidad de difluoruro de boro formando el BODIPY (Esquema 14).^[41]



Esquema 14. Síntesis de BODIPYs a partir de aldehídos aromáticos.

La síntesis de BODIPYs no simétricos se lleva a cabo a partir de pirroles sustituidos con grupos carbonilo los cuales a través de una condensación mediada por ácidos de Lewis, con otro fragmento de pirrol permiten obtener estos compuestos (Esquema 15).^[37]



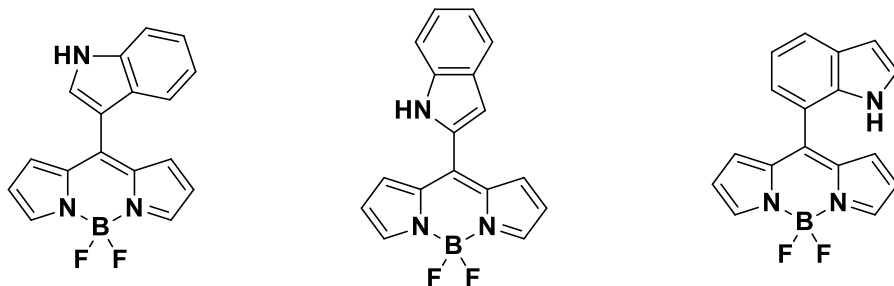
Esquema 15. Síntesis de BODIPYs no simétricos.

3. Objetivos

- Síntesis y caracterización de BODIPYs derivados de indol con posible aplicación como sondas fluorescentes.

Objetivos particulares

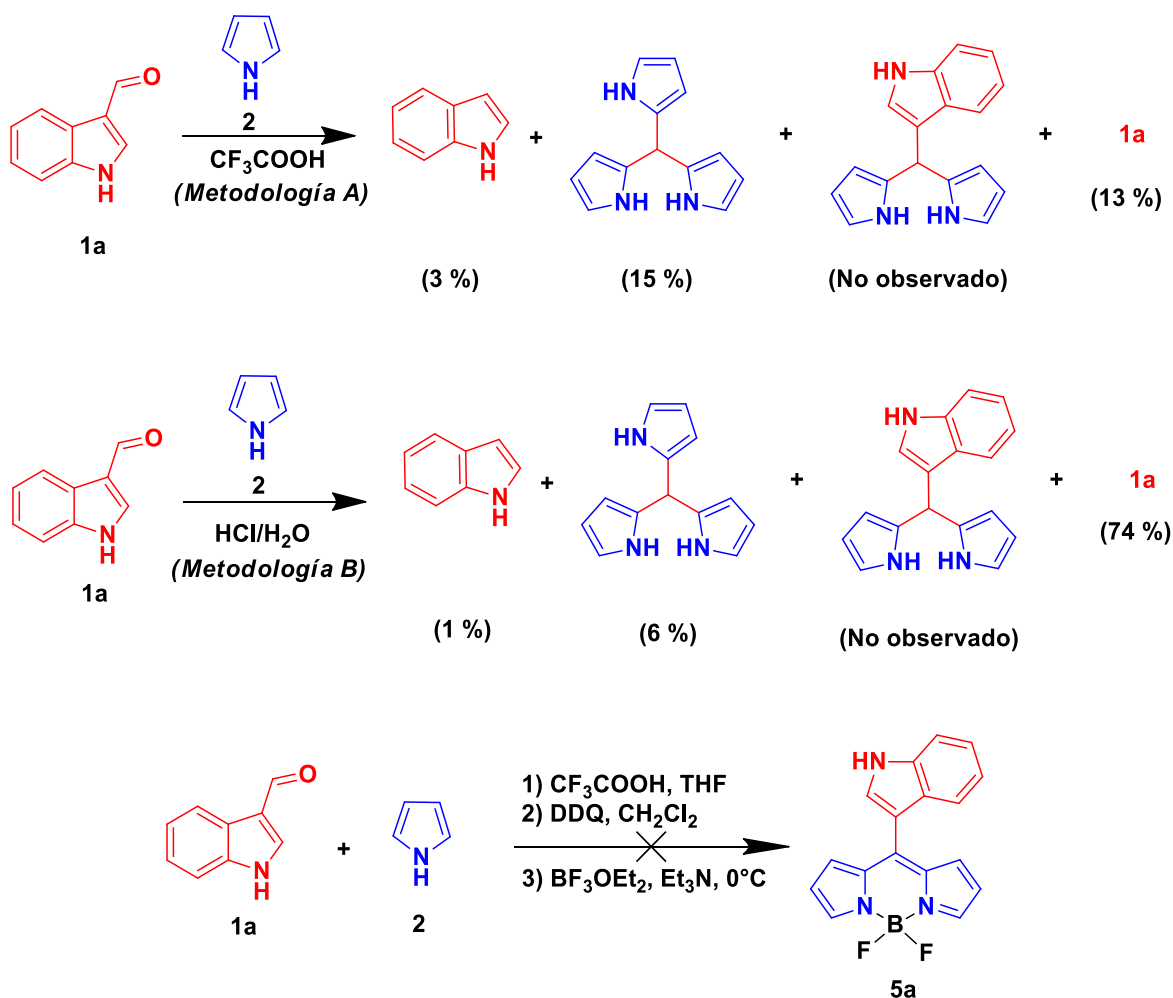
- Exploración de la viabilidad sintética de nuevos pigmentos tipo BODIPY con grupos indol en la posición *meso*.



- Caracterización estructural de los compuestos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas y de espectrometría de masas.
- Determinación de los perfiles de absorción de los compuestos obtenidos mediante espectroscopía UV-Vis.

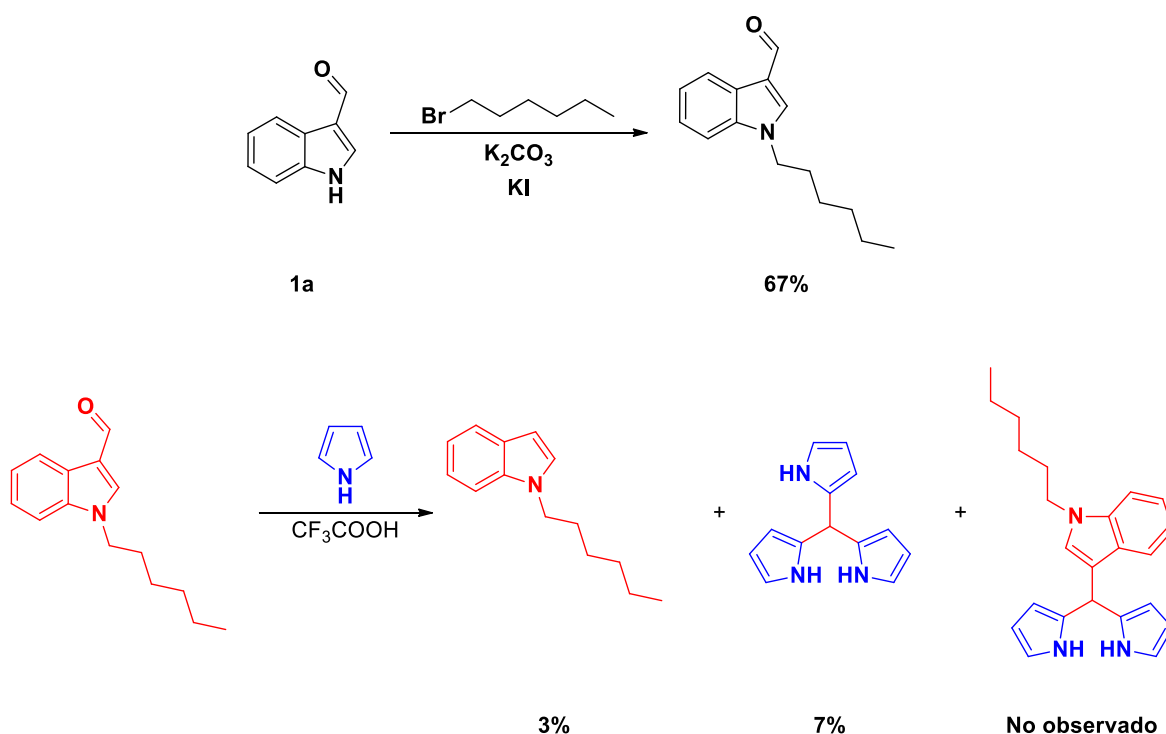
4. Resultados y Discusión

Se probaron diversas metodologías para la síntesis de los BODIPYs objetivo, se encontró que en las condiciones clásicas de reacción se formaban compuestos no esperados que fueron identificados mediante técnicas de RMN, como el producto descarboxilado (1H-indol) y el tris-1H-pirrol-2-il-metano (Esquema 16). Además, se intentó la síntesis *one pot* del BODIPY objetivo, sin embargo, tampoco se obtuvo el producto deseado.



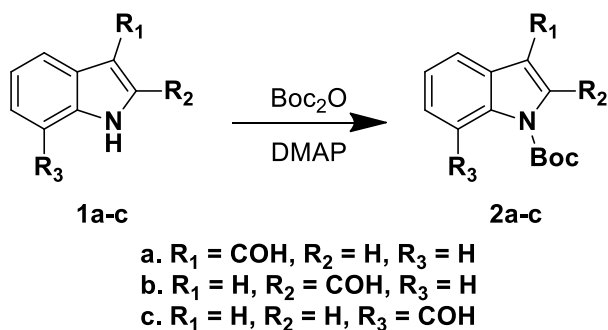
Esquema 16. Diferentes rutas de síntesis empleadas para el compuesto 5a.

Dado los resultados obtenidos con las condiciones clásicas de reacción se optó por primero realizar la reacción de protección de los diferentes indolcarboxaldehídos (1a-c), el primer intento fue la alquilación con n-hexilo, sin embargo, los resultados tampoco fueron los deseados, observándose una vez más el producto de descarboxilación y el tris-1H-pirrol-2-il-metano (Esquema 17).



Esquema 17. Ruta sintética utilizando el grupo n-hexilo como protector.

Finalmente se probó la reacción de protección de los diferentes indolcarboxaldehídos (1a-c) utilizando el grupo protector Boc_2O y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) con lo que se logró obtener los correspondientes aldehídos protegidos en rendimientos moderados (2a-c) (Esquema 18).



Esquema 18. Síntesis y numeración de los aldehídos protegidos 2a-2c.

En los espectros de RMN de ^1H de los aldehídos 2a-2c se observan señales muy parecidas, por lo que se presenta la RMN- ^1H (Figura 9) para 2a para ejemplificar los tres casos. Se observa una señal en $\delta = 10.1$ ppm correspondientes al hidrógeno del aldehído; así como las señales de los cinco hidrógenos aromáticos que aparecen entre $\delta = 6.5$ ppm y $\delta = 8.0$ ppm; finalmente se observa una señal simple en $\delta = 1.71$ ppm que integra para nueve hidrógenos correspondiente a los hidrógenos alifáticos.

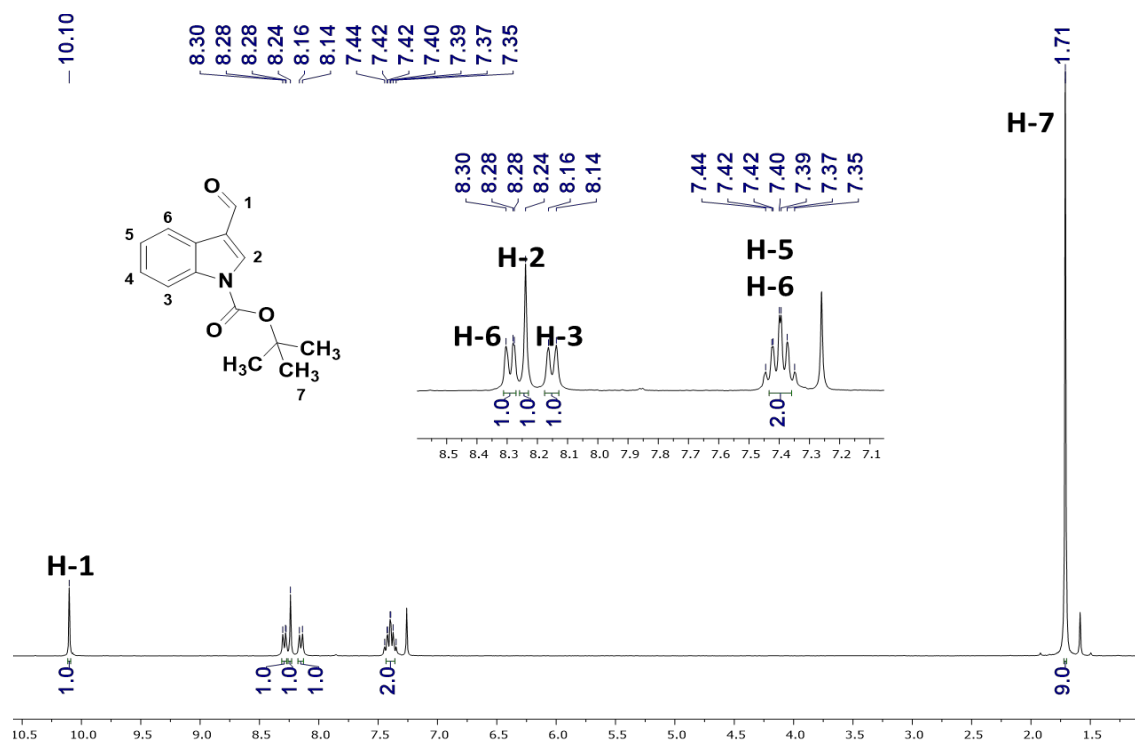
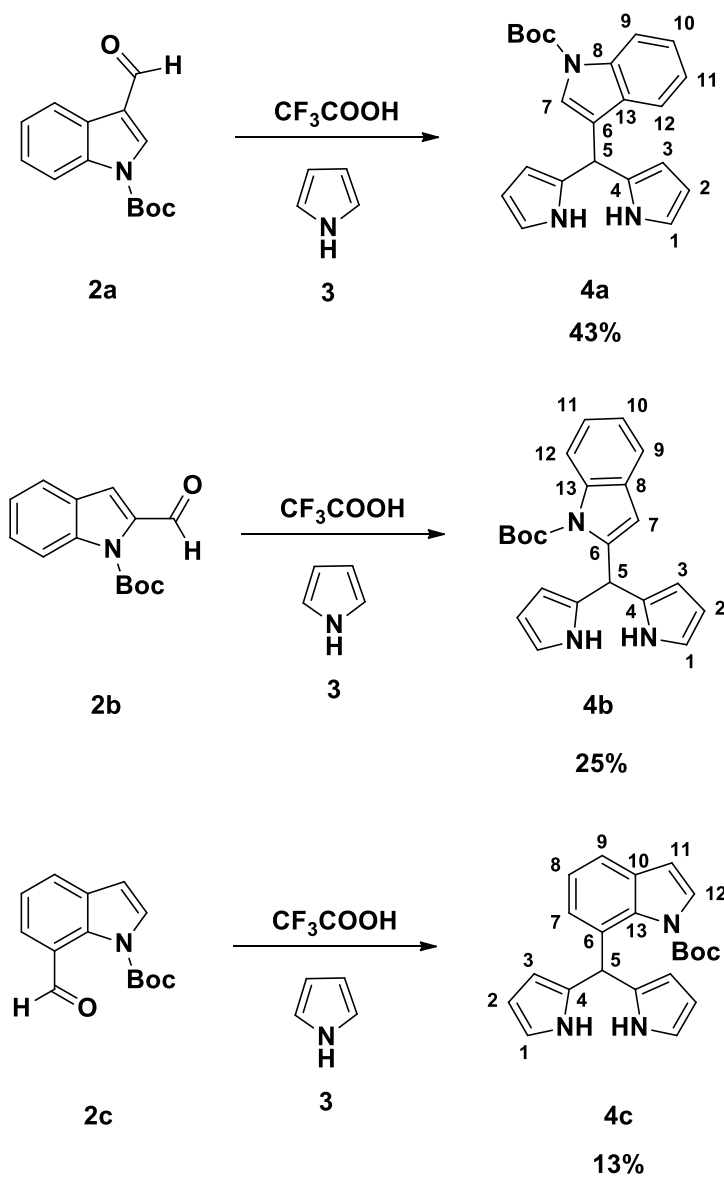


Figura 9. Espectro de RMN- ^1H para 2a (400 MHz, CDCl_3)

La síntesis de los dipirrometanos 4a-c (Esquema 17) se logró mediante la condensación en medio ácido entre un aldehído protegido (2a-c) y dos equivalentes de pirrol (3) a temperatura ambiente. En este caso, afortunadamente, no se observaron los productos de descarboxilación y el tris-1H-pirrol-2-il-metano.



Esquema 17. Síntesis y numeración de los dipirrometanos 4a-c.

Los rendimientos de los productos 3a-c fueron moderados (Tabla 1) debido a la formación de productos secundarios comunes en la síntesis de dipirrometanos.^[38] En todos los casos se observó mediante cromatografía en capa fina que la materia se consumió por completo.

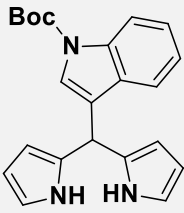
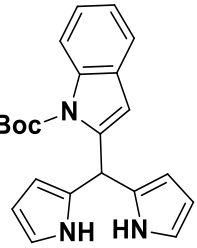
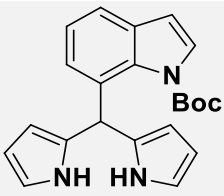
	Apariencia	Punto de fusión (°C)	Rendimiento (%)
 <p>4a</p>	Sólido verde	134-136	43
 <p>4b</p>	Aceite negro	-----	25
 <p>4c</p>	Sólido negro	125-127	13

Tabla 1. Rendimientos de los compuestos 4a-c.

Los espectros de RMN-¹H de los dipirrometanos, se ejemplifica con el espectro del compuesto 4a (Figura 10), se caracterizan por la señal de los hidrógenos de los pirroles, una señal simple que integra para dos hidrógenos, a campo bajo en $\delta = 7.99$ ppm; además de una señal en $\delta = 5.68$ ppm correspondiente al hidrógeno H-5 del núcleo del dipirrometano. Además, se observan las señales de los hidrógenos del indol entre $\delta =$

7.17 ppm y $\delta = 8.16$ ppm; también se pueden observar los hidrógenos del núcleo del dipirrometano entre $\delta = 6.07$ ppm y $\delta = 6.67$ ppm. Finalmente se observa la señal de los hidrógenos alifáticos del grupo protector (H-16) en $\delta = 1.69$ ppm.

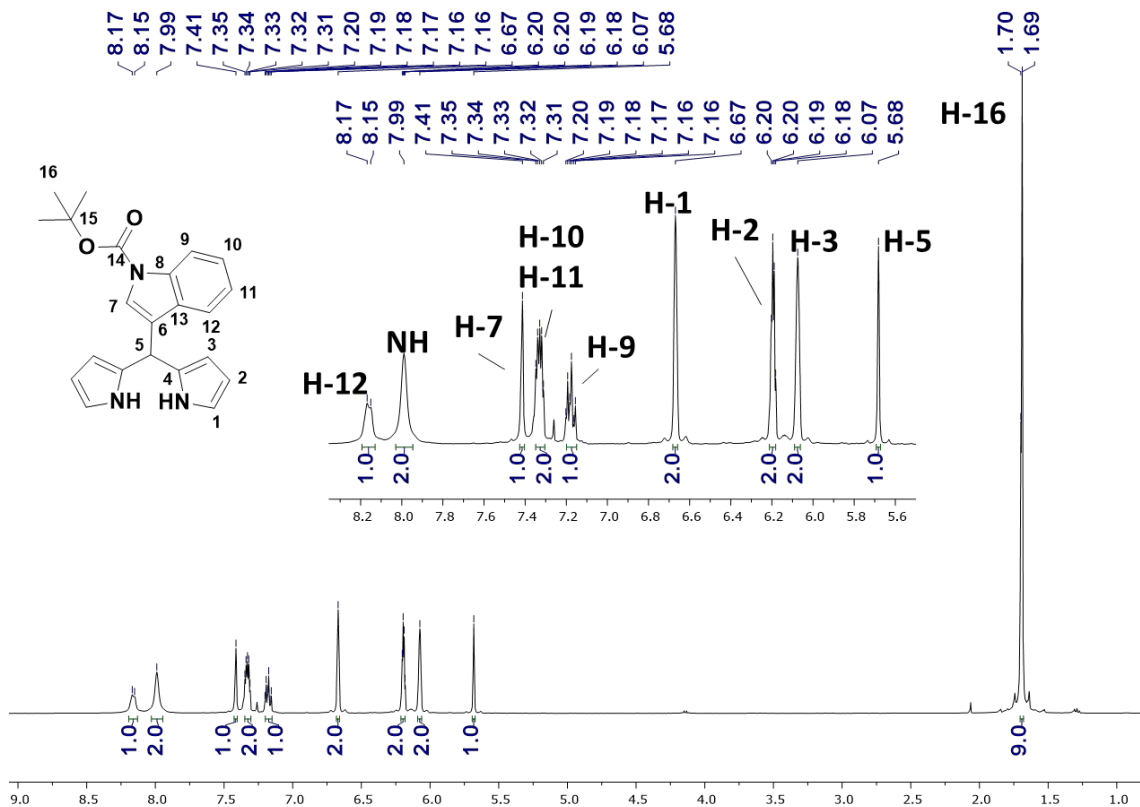


Figura 10. Espectro de RMN- ^1H para 4a (400 MHz, CDCl_3)

La multiplicidad de las señales correspondientes a los hidrógenos del anillo de indol se deben a la presencia de acoplamiento homonucleares a largo alcance, que se pueden observar en los espectros de correlación COSY (^1H - ^1H) y se ejemplifica con el espectro obtenido para 4a (Figura 11).

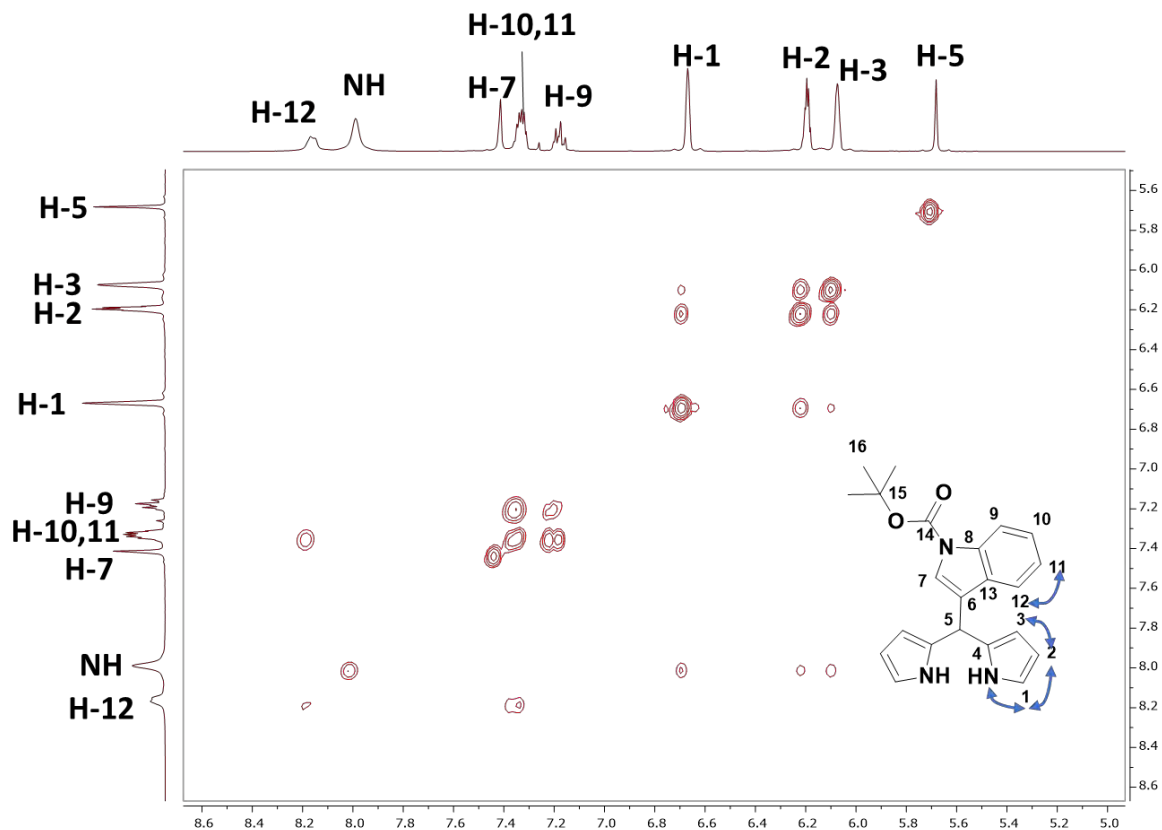


Figura 11. Espectro de correlación homonuclear COSY (^1H - ^1H) para 4a (400 MHz, CDCl_3)

Los espectros de RMN- ^{13}C de los compuestos 4a-c, ejemplificados con el espectro de 4a (Figura 12), se caracterizan por la señal en $\delta = 149.71$ ppm correspondiente a los carbonos C-14 del grupo protector además de una señal en $\delta = 28.13$ ppm del carbono C-16, igualmente, correspondiente al grupo protector; también se observa una señal en $\delta = 83.79$ ppm del carbono en posición *meso* (C-5) del dipirrometano.

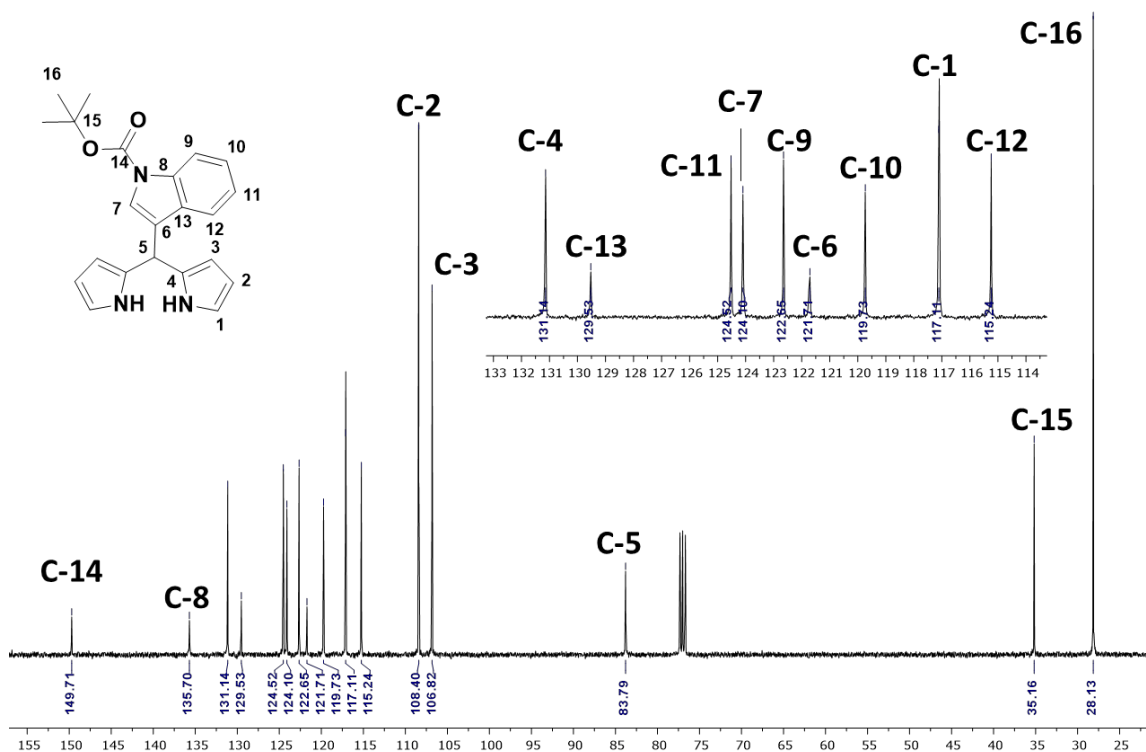


Figura 12. Espectro de RMN-¹³C del compuesto 4a (100 MHz, CDCl₃)

Para realizar una asignación completa de las señales de ¹H y ¹³C de los dipirrometanos 4a-c se emplearon, además del experimento COSY, otros experimentos de RMN bidimensionales, particularmente HSQC (¹H-¹³C) y HMBC (¹H-¹³C). Como ejemplo, se muestran el espectro de correlación heteronuclear HSQC obtenido para el compuesto 3a (Figura 13).

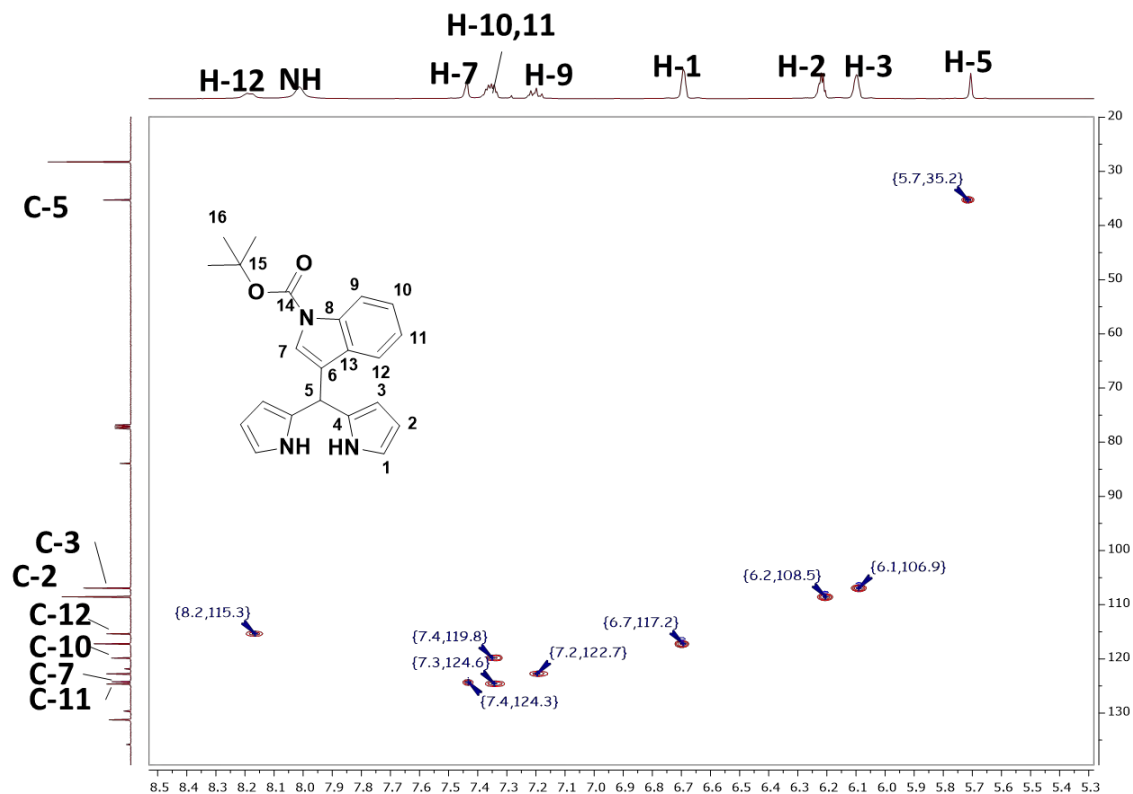
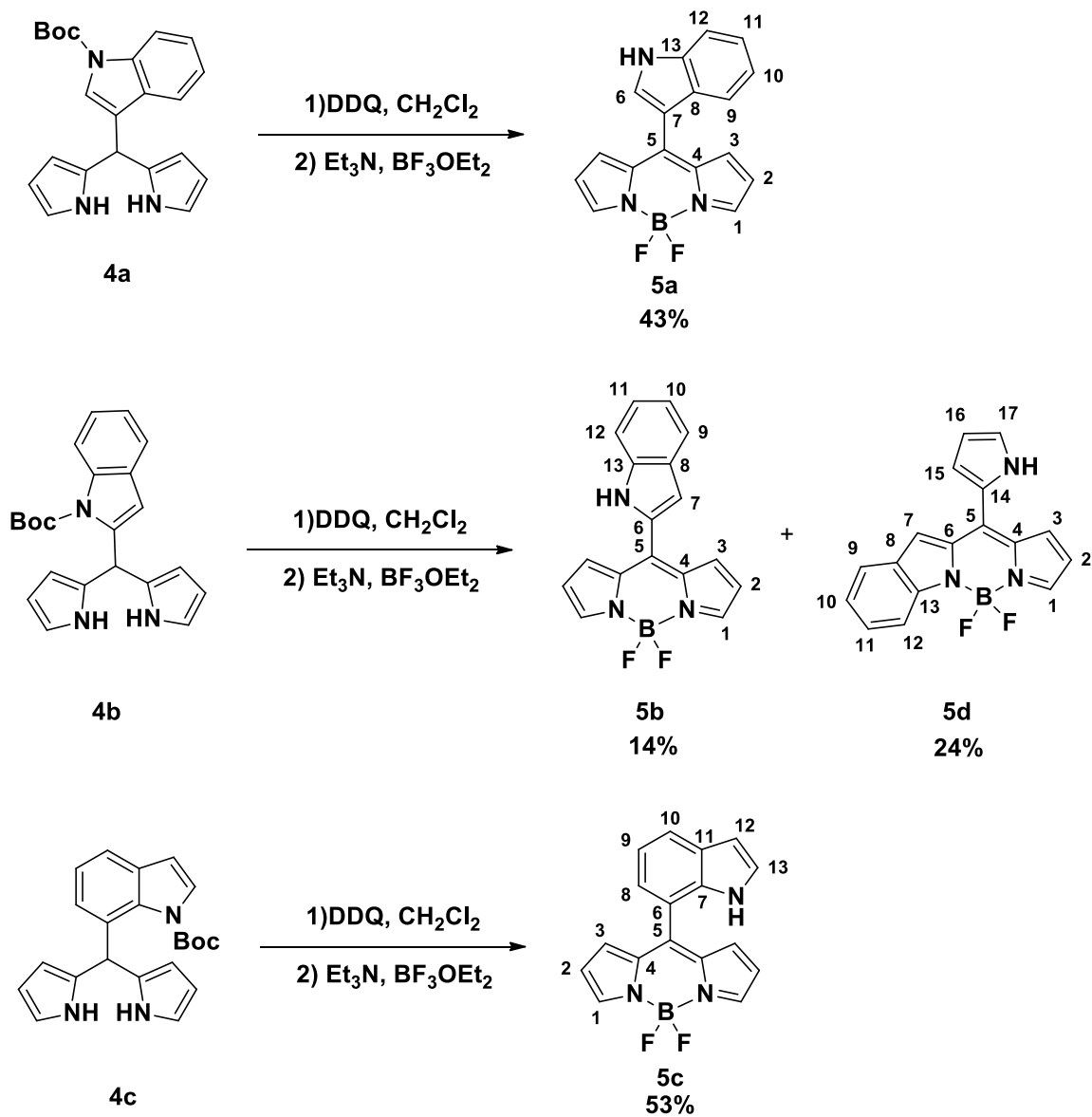


Figura 13. Espectro de correlación heteronuclear HSQC (^1H - ^{13}C) de 4a (400 MHz, CDCl_3)

Posteriormente, los dipirrometanos 4a-c se oxidaron con DDQ para formar el dipirrometeno correspondiente, el cual no fue aislado y se hizo reaccionar con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ en presencia de trietilamina para formar los BODIPYs 5a-d (Esquema 18).



Esquema 18. Síntesis y numeración de los BODIPYs 5a-d.

Es interesante mencionar que el caso del dipirrometano 4b se obtuvieron dos BODIPYs distintos (5b y 5d). Estos dos productos se deben a que en uno de ellos el anillo de indol se coordinó en lugar de uno de los pirroles.

Como ejemplo de la RMN-¹H de los compuestos 5a-c, se presenta el obtenido para 5b (Figura 14), que se caracterizan por la ausencia de las señales características del grupo protector, así como por la presencia de la señal característica del NH del grupo indol en $\delta = 8.87$ ppm por lo en el mismo paso de reacción se obtuvo el BODIPY y se desprotegió el grupo NH. También se observan las señales características de los hidrógenos del núcleo BODIPY; una señal en $\delta = 7.90$ ppm correspondiente los hidrógenos H-1, una señal en $\delta = 7.29$ ppm correspondiente a los hidrógenos H-3 y finalmente una señal a campo alto correspondiente a H-2 que igualmente por simetría integra para dos. Además, se observan las señales de los hidrógenos aromáticos del grupo indol entre $\delta = 7.15$ ppm y $\delta = 7.79$ ppm. También es indicativo la ausencia de los NH del dipirrometano, que se presentaban en $\delta = 7.99$ ppm en el dipirrometano 4a.

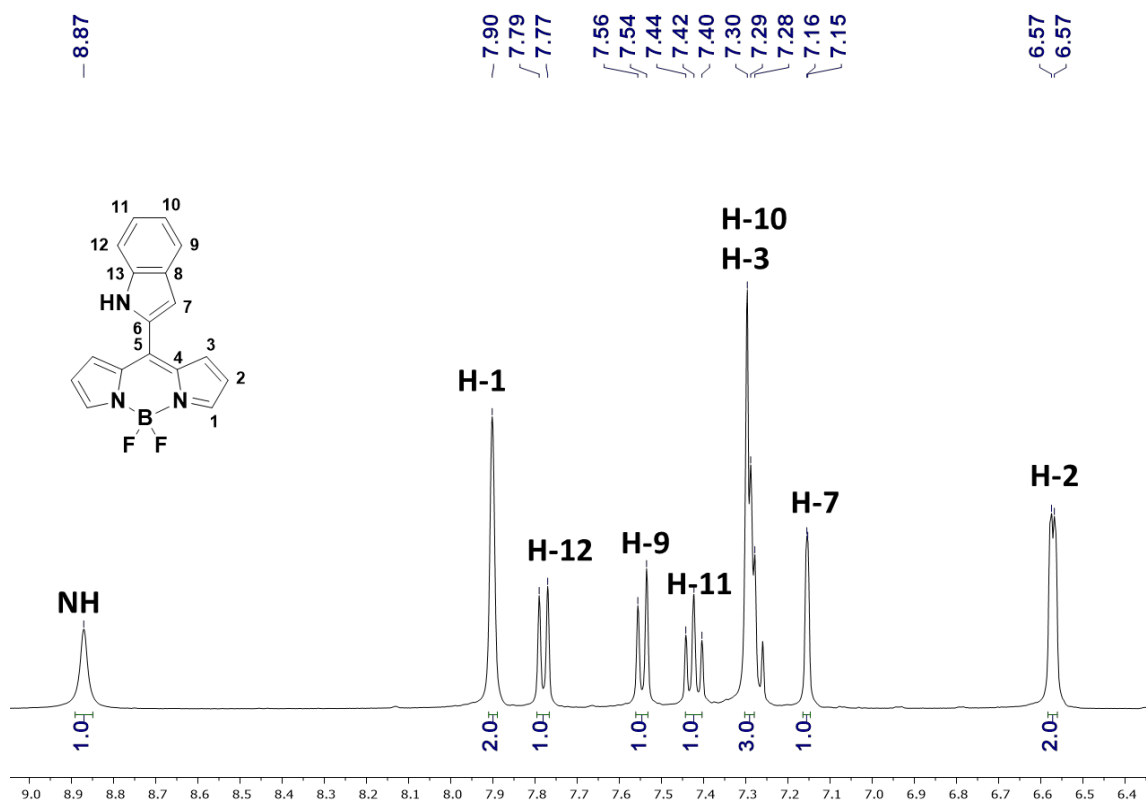


Figura 14. Espectro de RMN-¹H para 5b (400 MHz, CDCl₃)

Mediante experimentos de RMN bidimensional COSY (^1H - ^1H) fue posible diferenciar inequívocamente los diferentes hidrógenos del grupo indol. Además, la multiplicidad de las señales de los hidrógenos del anillo de indol se deben a la presencia de acoplamientos homonucleares a largo alcance y se ejemplifica con el espectro obtenido para 5b (Figura 15).

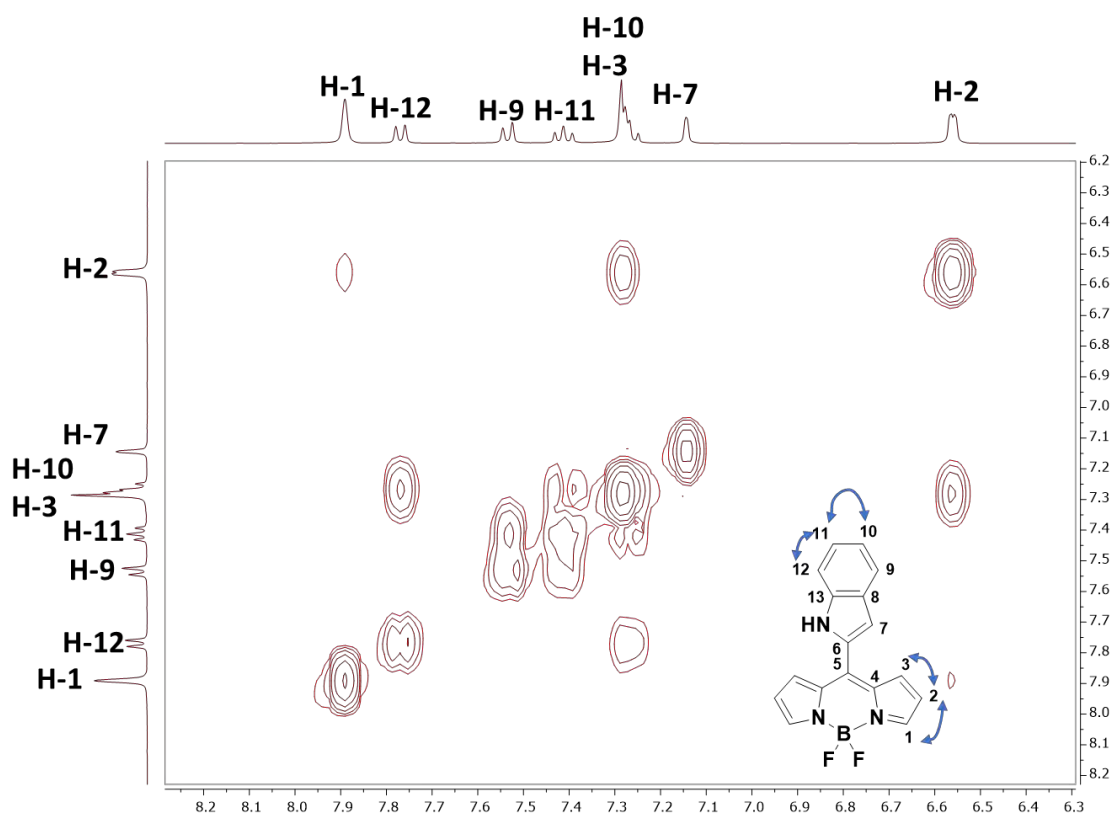


Figura 15. Espectro de correlación homonuclear COSY (^1H - ^1H) de 5b (400 MHz, CDCl_3)

De manera similar, los espectros de RMN- ^{13}C de los compuestos 5a-c se caracterizaron por la presencia de las señales correspondientes a los BODIPYs (Figura 16). Una diferencia sustancial entre el dipirrometano y el BODIPY es el desplazamiento químico del carbono C-5, mientras en el

dipirrometano 4b se presenta en $\delta = 84.03$ ppm en el BODIPY 5b se observa en $\delta = 138.58$ ppm.

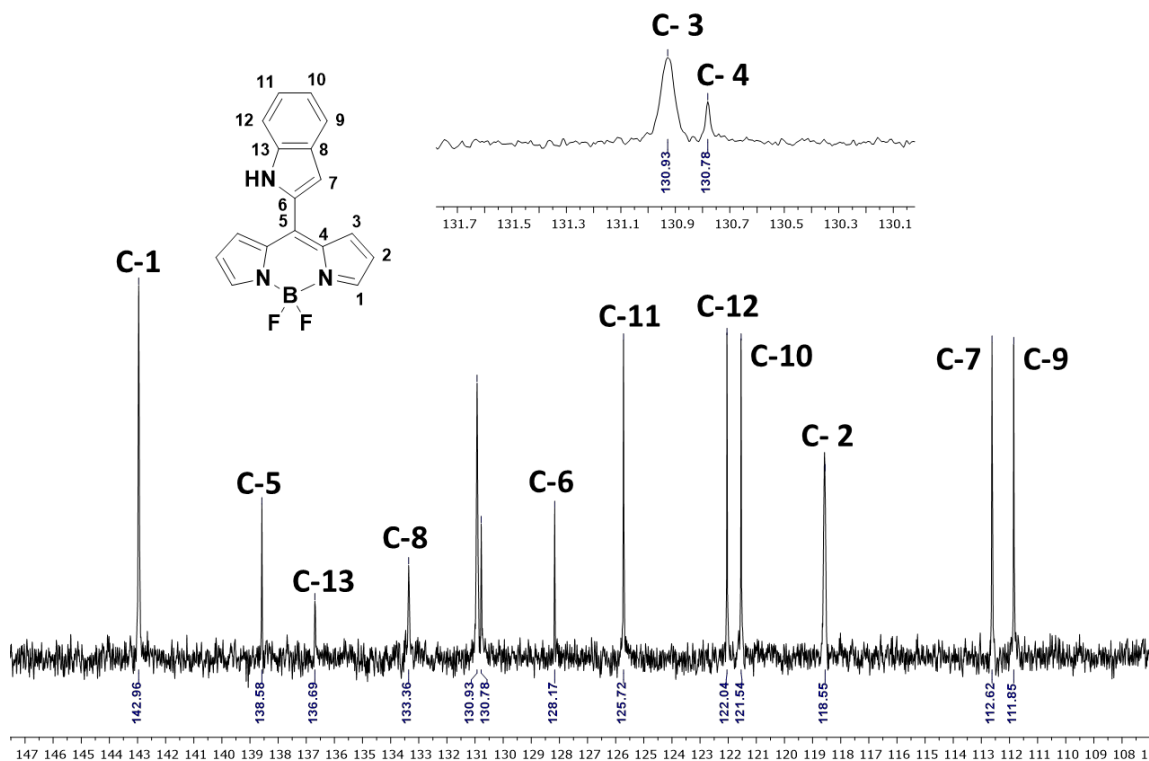


Figura 16. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto 5b (100 MHz, CDCl_3)

Para realizar una asignación completa de las señales de ^1H y ^{13}C de los BODIPYs 5a-c se emplearon otros experimentos de RMN bidimensionales, particularmente HSQC (^1H - ^{13}C) y HMBC (^1H - ^{13}C). Como ejemplo, se muestran el espectro de correlación heteronuclear HSQC obtenido para el compuesto 5b (Figura 17).

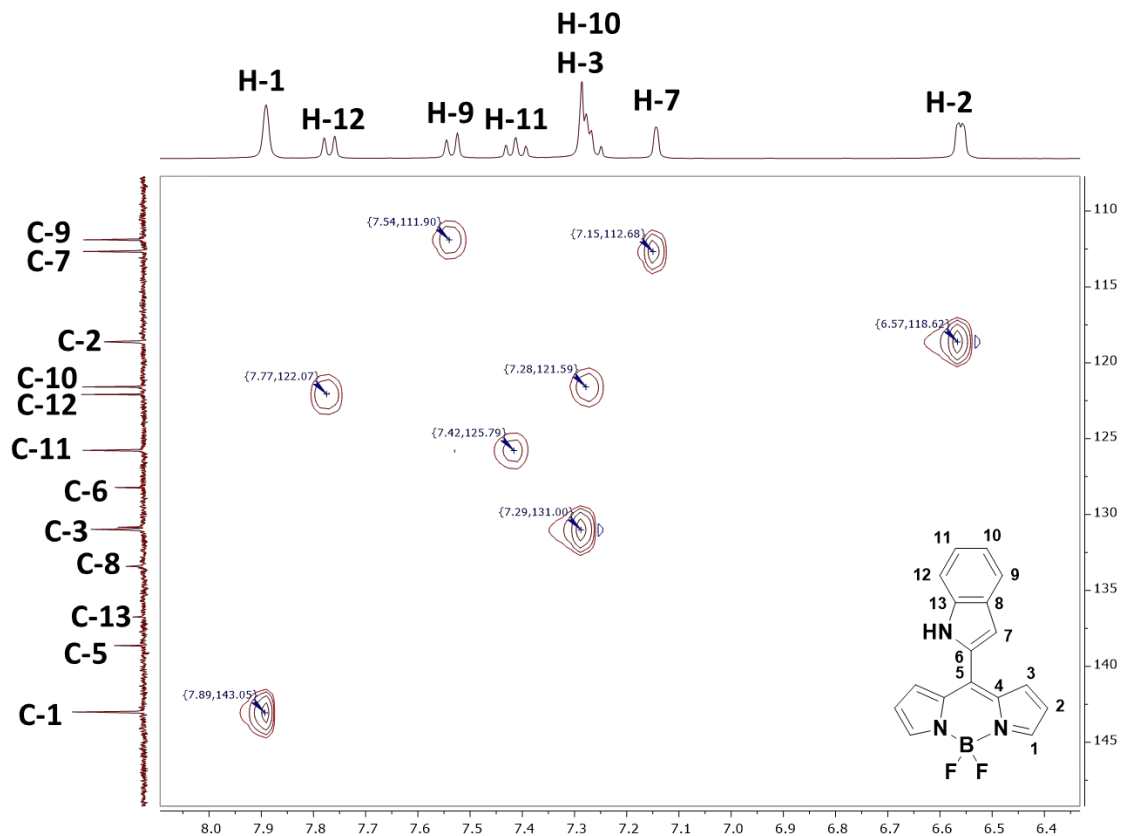


Figura 17. Espectro de correlación heteronuclear HSQC (^1H - ^{13}C) de 5b (400 MHz, CDCl_3)

Para los compuestos 5a-d se obtuvieron también los espectros de RMN de ^{11}B y ^{19}F , ejemplificados con los espectros obtenidos para 5b (Figura 18), en estos espectros se observa una señal triple y una cuádruple respectivamente, dichas señales se deben al acoplamiento B-F. La forma y multiplicidad de las señales es la misma en todos los BODIPYs sintetizados, excepto en el caso del BODIPY 5c que se observa una multiplicidad diferente en la RMN- ^{19}F debido a que los Flúor no son magnéticamente equivalentes (Figura 19).

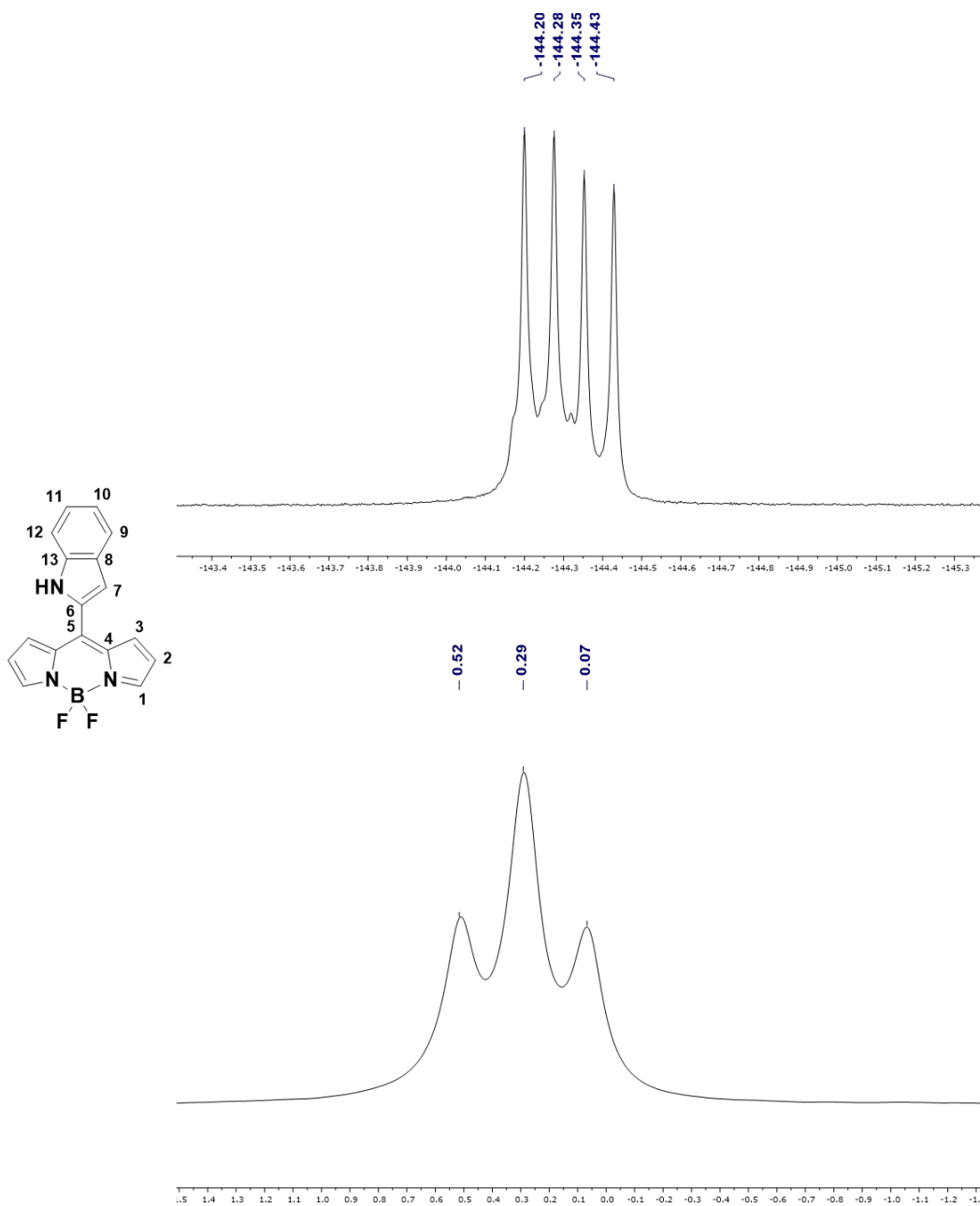


Figura 18. Espectros de RMN de ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) (arriba) y de ^{11}B (128 MHz, CDCl_3) (abajo) del BODIPY 5b.

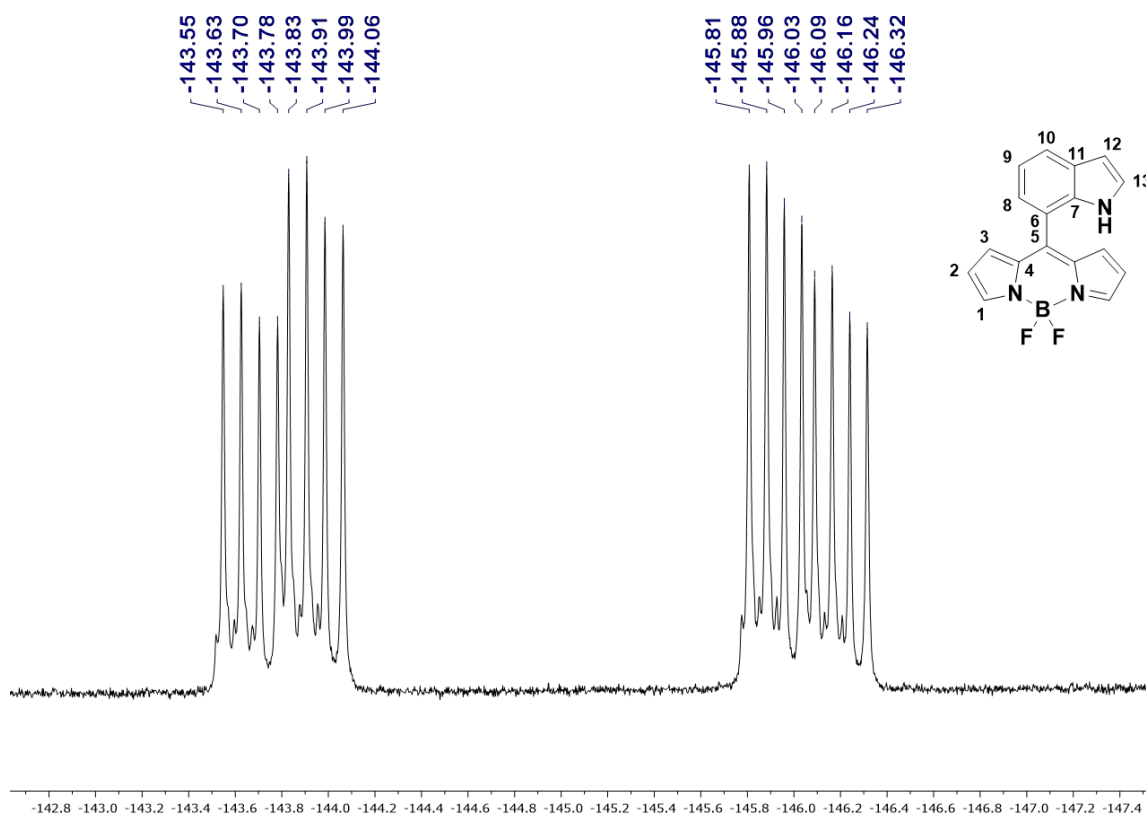


Figura 19. Espectros de RMN- ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) para 5c.

En el caso del BODIPY 5d el espectro de RMN de ^1H cambia con respecto a los otros compuestos debido a que el indol se coordina en lugar de un pirrol el núcleo del BODIPY pierde simetría y no se observa ninguna señal que integre para dos hidrógenos (Figura 20). Pero aún siguen presentes las señales características del núcleo BODIPY una señal en $\delta = 7.35$ ppm correspondiente al hidrógeno H-1, una señal en $\delta = 6.95$ ppm del hidrógeno H-3 y una señal en $\delta = 6.53$ ppm correspondiente al hidrógeno H-2 del núcleo del BODIPY; además se observa una señal en $\delta = 9.39$ ppm correspondiente al NH del pirrol; y finalmente se observan las señales aromáticas del grupo indol.

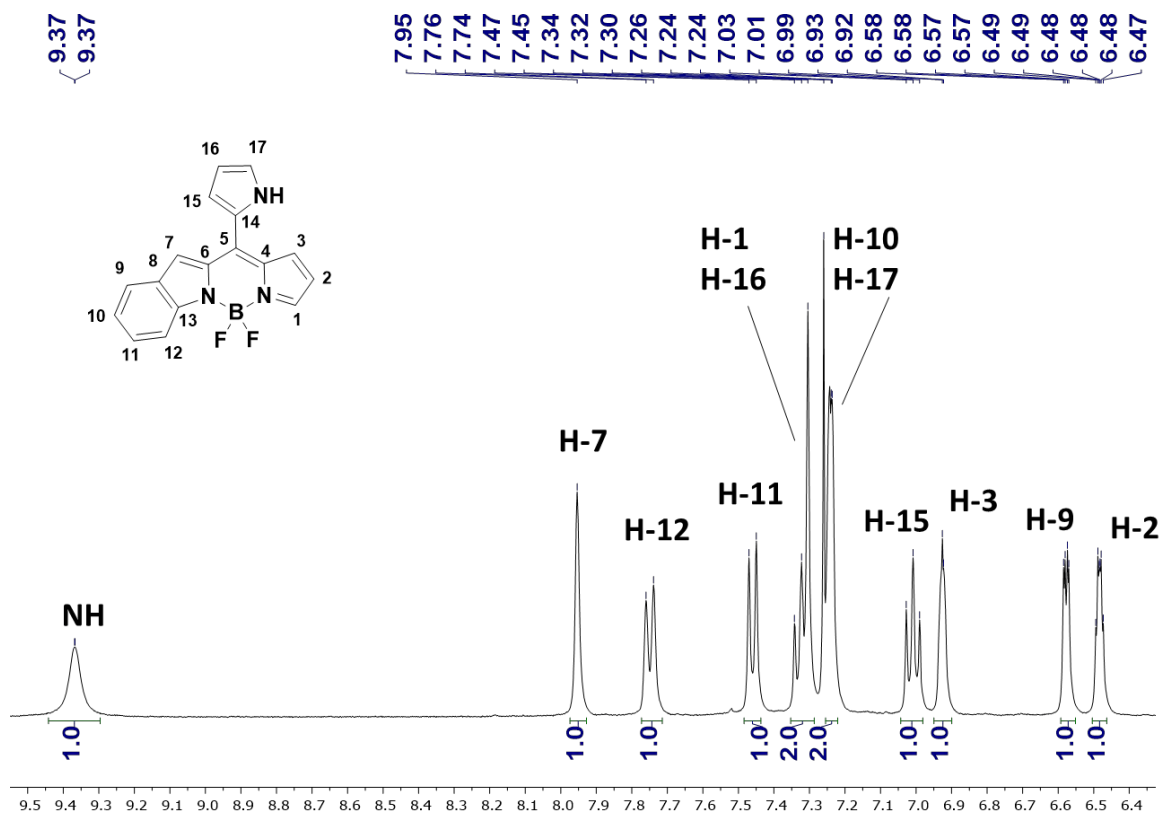


Figura 20. Espectro de RMN-¹H para 5d (400 MHz, CDCl₃)

De igual forma el espectro de RMN-¹³C del producto 5d (Figura 21) cambió haciendo que las señales aromáticas del grupo indol se fueran hacia campos más bajos. Al perder la simetría se observa una mayor cantidad de señales comparado con los espectros de RMN de ¹³C de los productos 5a-c.

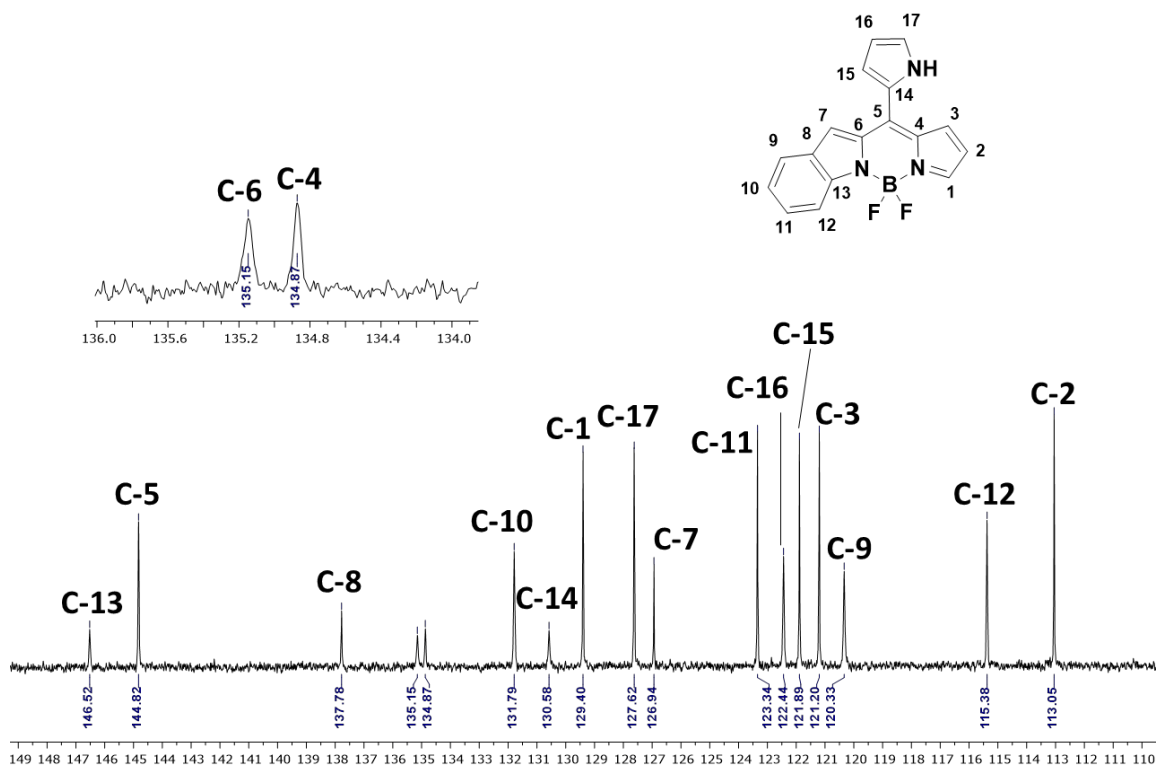


Figura 21. Espectro de RMN- ^{13}C para 5d (100 MHz, CDCl_3)

Se obtuvo el espectro de absorción UV-Vis (Figura 22) para los compuestos 5a ($\lambda_{\text{máx}} = 498.55 \text{ nm}$), 5b ($\lambda_{\text{máx}} = 512.69 \text{ nm}$), 5c ($\lambda_{\text{máx}} = 507.08 \text{ nm}$) y 5d ($\lambda_{\text{máx}} = 524.00 \text{ nm}$) empleando CHCl_3 como disolvente.

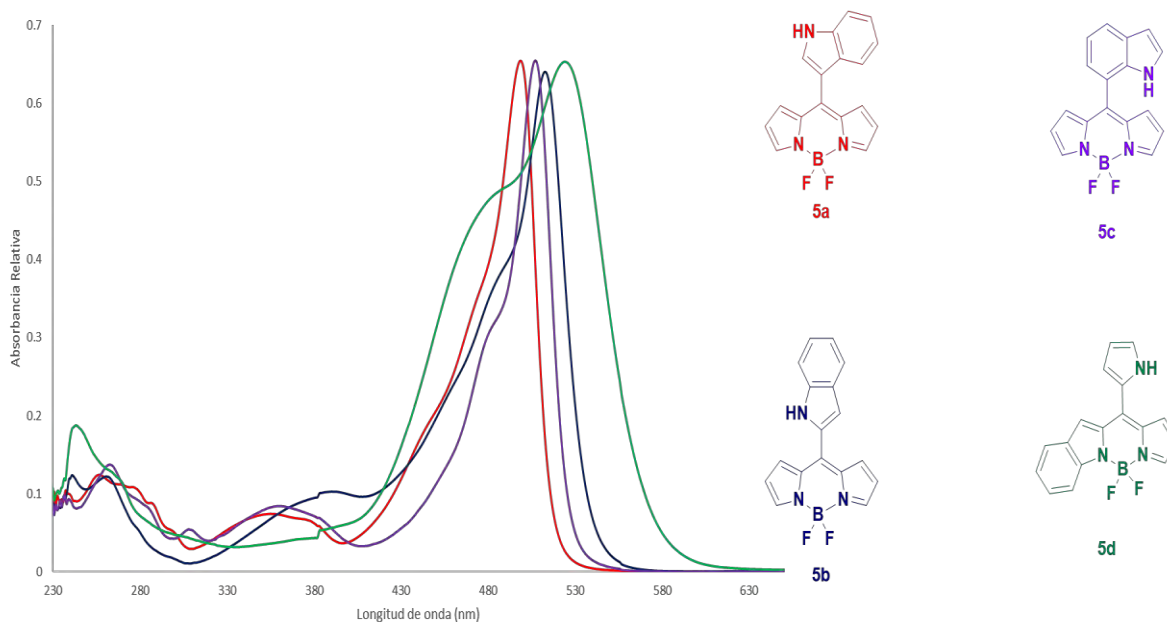


Figura 22. Espectros de UV-Visible de los compuestos 5a-d en CHCl_3 .

Se lograron obtener cristales adecuados de los BODIPYs 5a, 5b y 5d para su difracción de rayos X de monocristal (Figura 23), y así se logró confirmar las estructuras moleculares planteadas con los experimentos de RMN. Además, se observaron distintos ángulos entre el plano formado por el núcleo del BODIPY y el formado por el indol. También en la tabla 2 se muestran las distancias de enlace de importancia.

BODIPY	Longitud de enlace N-B	Longitud de enlace B-F	Ángulo N-B-F
5a	1.53 Å	1.39 Å	109.8 °
5b	1.52 Å	1.38 Å	110.9 °
5d	1.52 Å	1.39 Å	110.8

Tabla 2. Longitudes de enlace y ángulos seleccionados.

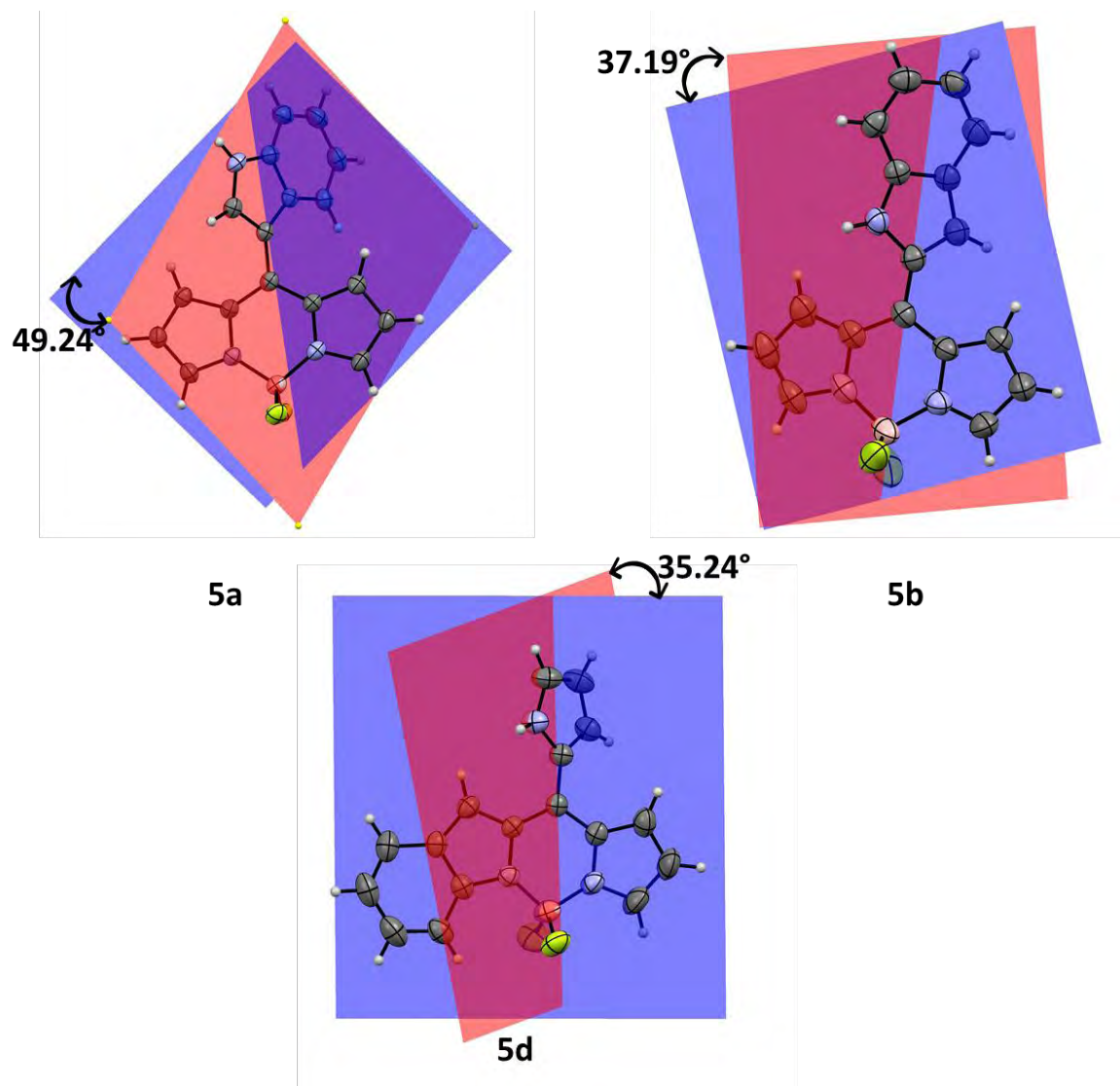
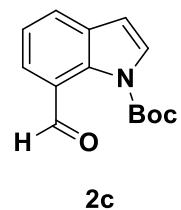
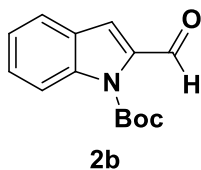
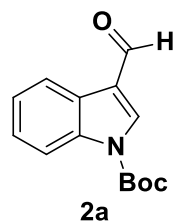


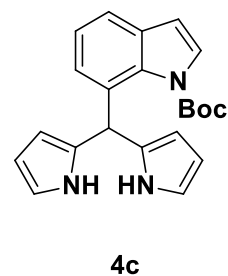
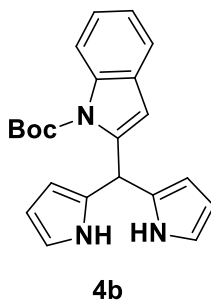
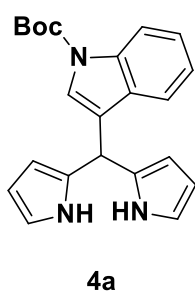
Figura 23. Difracción de rayos X de monocristal de los compuestos 5a, 5b y 5d.

5. Conclusiones.

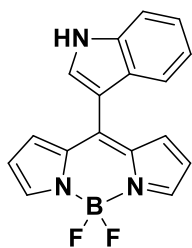
- Se exploró la viabilidad sintética de los compuestos 5a-5c mediante diversas metodologías, dando como resultado que en las condiciones clásicas de reacción se obtienen otros productos.
- Se sintetizaron los compuestos 2a-2c y se identificaron mediante RMN ^1H .



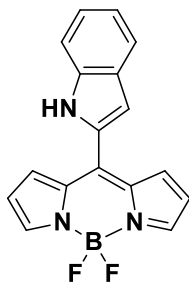
- Se logró la síntesis de los compuestos 4a-c y fueron caracterizados mediante técnicas de RMN en disolución monodimensionales (^1H , ^{13}C , ^{11}B , ^{19}F) y bidimensionales (HSQC, HMBC, COSY, NOESY), así como por espectroscopía IR, UV-Vis y espectrometría de masas de alta resolución.



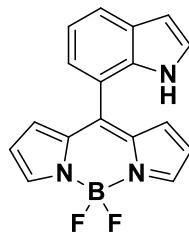
- Se sintetizaron los compuestos 5a-d y fueron caracterizados mediante técnicas de RMN, así como por espectroscopía IR, UV-Vis y espectrometría de masas de alta resolución. Estos compuestos al poseer un residuo de triptofano se espera que la entrada a la célula se vea favorecida y que muestren ingreso selectivo a algún organelo.



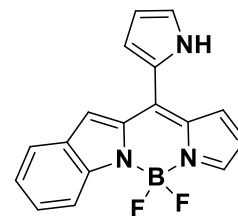
5a



5b



5c



5d

- Se obtuvieron cristales adecuados de los BODIPYs 5a, 5b y 5d para su difracción de rayos X de monocristal.

6. Desarrollo experimental.

6.1 Consideraciones generales.

Todos los reactivos fueron comprados de proveedores comerciales y usados como fueron recibidos. Por otro lado, los disolventes que se emplearon durante la parte experimental fueron grado químicamente puros, y se destilaron antes de su uso.

Las reacciones se siguieron mediante cromatografía en capa fina (CCF) en placas ALUGRAM SIL G/UV254 de MACHEREY-NAGEL; una vez eluídas, las placas fueron reveladas por exposición a una lámpara UV. Los puntos de fusión fueron medidos en un equipo Barnstead Electrothermal 9300 y no están corregidos.

Los experimentos de RMN fueron realizados en espectrómetros Bruker ARX 300, Bruker BioSpin GmbH 400, Varian MR-400 y ECZ500R; los experimentos fueron realizados en cloroformo deuterado (CDCl_3) y acetona deuterada (Acetona- d_6). Los desplazamientos químicos son relativos a las señales del disolvente, fijadas en $\delta = 7.26$ ppm y $\delta = 2.84$

ppm para RMN-¹H, y $\delta = 77.00$ ppm y 29.84 ppm para RMN-¹³C respectivamente.

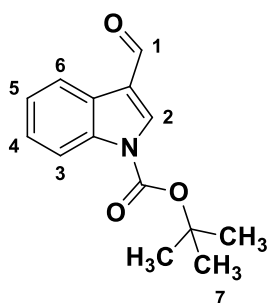
Los experimentos de EMAR se determinaron usando un espectrómetro Agilent Technologies MS-TOF⁺. Los espectros de IR y UV-Vis fueron obtenidos utilizando espectrofotómetros FTIR/FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer y Thermo Scientific Evolution Array respectivamente a 25°C.

6.2. Síntesis de formil-indoles N-Boc protegidos.

Metodología general.

A una disolución en baño de hielo de un aldehído aromático (1a-c) (1 mmol) en acetonitrilo (3 mL) se le agregó ditert-butil dicarbonato (1 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (0.06 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente. Después el acetonitrilo fue evaporado a presión reducida, el crudo de reacción fue disuelto en diclorometano y el residuo orgánico se extrajo con agua y salmuera. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄(anh) y el disolvente residual se evaporó a presión reducida. El crudo se purificó mediante recristalización de un disolvente apropiado.

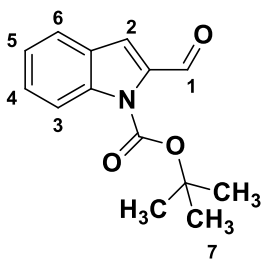
N-Boc-indol-3-carboxaldehído (2a)



Se siguió la metodología general, empleando indol-3-carboxaldehído (1 g, 6.9 mmol) (1a). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y el crudo se recristalizó de hexano, para obtener 1.3341 g (5.44 mmol, 79%) de un sólido color blanco. Punto de fusión: 132 - 135 °C. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ

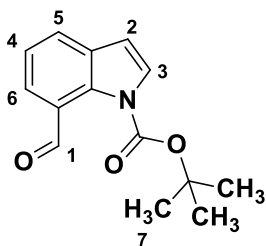
10.10 (s, 1H, H-1), 8.31 – 8.27 (m, 1H, H-6), 8.24 (s, 1H, H-2), 8.15 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-3), 7.46 – 7.34 (m, 2H, H-4, H-5), 1.71 (s, 9H, H-7).

N-Boc-indol-2-carboxaldehído (2b).



Se siguió la metodología general, empleando indol-2-carboxaldehído (400 mg, 2.76 mmol) (1b). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y el crudo se trató con carbón activado y después se recristalizó de hexano, para obtener 489.6 mg (1.99 mmol, 72%) de un sólido color amarillo. Punto de fusión: 74 - 76 °C. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 10.26 (s, 1H, H-1), 8.01 – 7.98 (m, 1H, H-3), 7.50 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6), 7.31 (ddd, $J = 8.9, 7.4, 1.4$ Hz, 1H, H-2), 7.15 – 7.08 (m, 2H, H-4, H-5), 1.54 (s, 9H, H-7).

N-Boc-indol-7-carboxaldehído (2c).



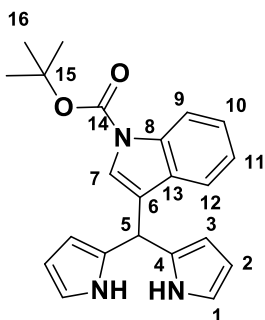
Se siguió la metodología general, empleando indol-7-carboxaldehído (400 mg, 2.76 mmol) (1c). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y el crudo se recristalizó de pentano, para obtener 234.8 mg (1.52 mmol, 55%) de un sólido color café. Punto de fusión: 87 - 90 °C. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 10.58 (s, 1H, H-1), 7.76 (s, 1H, H-6), 7.74 – 7.73 (m, 1H, H-5), 7.62 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-3), 7.35 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-4), 6.66 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-2), 1.63 (s, 9H, H-7).

6.3. Síntesis de meso-indolil dipirrometanos N-Boc protegidos.

Metodología general.

A una solución en agitación de un aldehído N-Boc protegido (2a-c) (1 mmol) en pirrol (8 mmol), previamente burbujeada con nitrógeno por 10 minutos, se le agregó CF_3COOH (0.15 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente, posteriormente el crudo se vertió sobre agua con hielo y bajo agitación vigorosa. Se extrajo la fase orgánica y se lavó con agua. El crudo se purificó mediante cromatografía en columna.

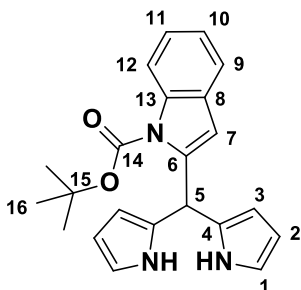
meso-(*N*-Boc-indol-3-il)-dipirrometano (4a).



Se siguió la metodología general, empleando 2a (1.26 g, 5.14 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora, se utilizó una mezcla hexano/acetato de etilo 8/2 como eluyente, para obtener 799.9 mg (2.21 mmol, 43%) de un sólido color verde. Punto de fusión: 134 - 136 °C. FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3351, 2982, 1709, 1608, 1561, 1273, 1262, 713. UV-Vis (CHCl_3) $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) 241. RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-12), 7.99 (s, 2H, NH), 7.41 (s, 1H, H-7), 7.36 - 7.30 (m, 2H, H-10, H-11), 7.18 (td, $J = 7.6, 3.5$ Hz, 1H, H-9), 6.67 (s, 2H, H-1), 6.19 (q, $J = 2.7$ Hz, 2H, H-2), 6.07 (s, 2H, H-3), 5.68 (s, 1H, H-5), 1.69 (d, $J = 4.1$ Hz, 9H, H-16). RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 149.71 (C-14), 135.70 (C-8), 131.14 (C-4), 129.53 (C-13), 124.52 (C-11), 124.10 (C-7), 122.65 (C-9), 121.71 (C-6), 119.73 (C-10), 117.11 (C-1), 115.24 (C-12), 108.40 (C-2), 106.82 (C-3), 83.79 (C-5), 35.16 (C-15), 28.13 (C-16). EMAR

(ESI-TOF⁺) m/z: [M⁺+H]⁺ observado 362.1863, requerido para C₂₂H₂₄N₃O₂: 362.1866 error: 0.24 ppm.

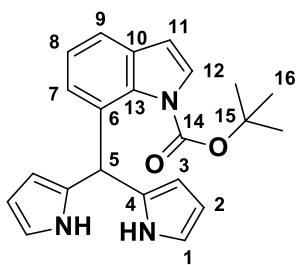
meso-(*N*-Boc-indol-2-il)-dipirrometano (4b).



Se siguió la metodología general, empleando 2b (400 mg, 1.63 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos, se utilizó una mezcla hexano/acetato de etilo 8/2 como eluyente, para obtener 144.3 mg (0.4 mmol, 25%) de un aceite color negro. FTIR- FTIR-ATR (ν , cm⁻¹):

3379, 2978, 1726, 1590, 1561, 1253, 1155, 712. UV-Vis (CHCl₃) $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) 242. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.13 – 8.10 (m, 1H, H-9), 7.95 (s, 2H, NH), 7.45 – 7.42 (m, 1H, H-10), 7.30 (ddd, J = 8.5, 7.5, 1.4 Hz, 1H, H-11), 7.22 (td, J = 7.5, 1.0 Hz, 1H, H-12), 6.66 (td, J = 2.7, 1.6 Hz, 2H, H-1), 6.30 (s, 1H, H-5), 6.19 (q, J = 2.7 Hz, 2H, H-2), 6.12 (s, 1H, H-7), 5.97 (ddt, J = 3.4, 1.8, 0.9 Hz, 2H, H-3), 1.54 (s, 9H, H-16). RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 150.18 (C-14), 141.73 (C-13), 136.90 (C-8), 131.24 (C-4), 128.44 (C-6), 123.83 (C-11), 122.60 (C-12), 120.24 (C-10), 117.09 (C-1), 115.34 (C-9), 109.40 (C-7), 108.26 (C-2), 106.87 (C-3), 84.03 (C-5), 38.09 (C-15), 27.82 (C-16). EMAR (ESI-TOF⁺) m/z: [M⁺+H]⁺ observado 362.1863, requerido para C₂₂H₂₄N₃O₂: 362.1866 error: 0.82 ppm.

meso-(*N*-Boc-indol-7-il)-dipirrometano (4c).



Se siguió la metodología general, empleando 2c (370 mg, 1.5 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos, se utilizó una mezcla hexano/acetato de etilo 8/2 como eluyente, para obtener 68.6 mg (0.19 mmol, 13%) de un sólido color

negro. Punto de fusión: 125 - 127 °C. FTIR- FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3407, 2956, 1731, 1579, 1561, 1258, 1147, 710. UV-Vis (CHCl_3) $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) 242. RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.26 (s, 2H, NH), 7.49 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-12), 7.47 (dd, $J = 7.6, 1.1$ Hz, 1H, H-9), 7.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-8), 7.09 (dd, $J = 7.6, 1.0$ Hz, 1H, H-7), 6.72 (s, 1H, H-5), 6.68 (q, $J = 2.7$ Hz, 2H, H-1), 6.57 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-11), 6.13 (q, $J = 2.7$ Hz, 2H, H-2), 5.84 - 5.81 (m, 2H, H-3), 1.60 (s, 9H, H-16). RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 150.22 (C-14), 133.38 (C-13), 133.14 (C-4), 132.50 (C-8), 129.99 (C-6), 128.53 (C-12), 126.24 (C-7), 123.49 (C-8), 119.80 (C-9), 116.82 (C-1), 107.87 (C-2), 107.57 (C-11), 106.81 (C-3), 83.69 (C-5), 39.89 (C-15), 27.99 (C-16). EMAR (ESI-TOF $^+$) m/z: $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ observado 362.1863, requerido para $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$: 362.1864 error: 0.20 ppm.

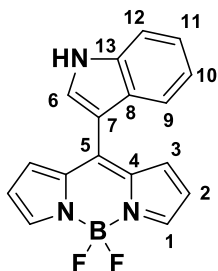
6.4 Síntesis de BODIPYs objetivo (5a-d).

Metodología general.

A una disolución de un dipirrometano (4a-c) (1 mmol) en diclorometano seco (10 mL) se le agregó DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona) (1.2 mmol) y la mezcla se llevó a temperatura de reflujo durante 30 minutos bajo una atmósfera de nitrógeno. Posteriormente se adicionó $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (16 mmol) y trietilamina (4 mmol) a 0 °C, seguido por calentamiento a reflujo. El crudo se vertió en agua con hielo, se filtró y se extrajo con diclorometano. El disolvente residual se

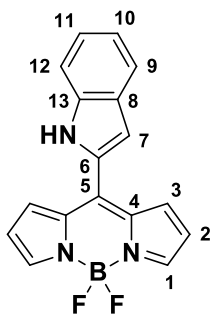
evaporó a presión reducida y el crudo se purificó por cromatografía en columna.

meso-(1*H*-indol-3-il)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno (5a).



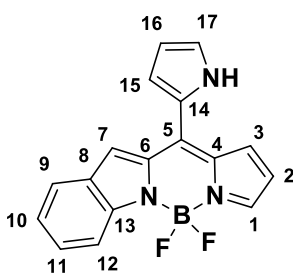
Se siguió la metodología general, empleando 4a (550 mg, 1.53 mmol). La reacción se agitó a temperatura de reflujo durante 2 horas, se utilizó una mezcla hexano/acetato de etilo 8/2 como eluyente, para obtener 231 mg (0.75 mmol, 43 %) de un sólido naranja. Punto de fusión: 158 - 160 °C. FTIR- FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3377, 3121, 3060, 2944, 1536, 1386, 1222, 1123, 1071, 1024, 953, 892, 744, 632, 566, 417. UV-Vis (CHCl_3) $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) 499. RMN- ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) δ 11.40 - 11.31 (m, 1H, NH), 7.98 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-12), 7.88 - 7.83 (m, 3H, H-1, H-6), 7.64 - 7.52 (m, 1H, H-9), 7.30 - 7.24 (m, 3H, H-3, H-11), 7.16 (ddd, $J = 8.1, 7.1, 1.1$ Hz, 1H, H-10), 6.59 - 6.52 (m, 2H, H-2). RMN- ^{13}C (100 MHz, Acetona- d_6) δ 142.41 (C-1), 138.40 (C-5), 134.99 (C-13), 132.90 (C-8), 132.72 (C-12), 131.21 (C-11), 127.88 (C-7), 124.38 (C-6), 122.29 (C-3), 120.76 (C-10), 118.16 (C-2), 113.40 (C-9), 112.15 (C-4). RMN- ^{19}F (376 MHz, Acetona- d_6) δ - 144.70 (q, $J = 28.4$ Hz). RMN- ^{11}B (128 MHz, Acetona- d_6) δ 0.34 (t, $J = 28.4$ Hz). EMAR (ESI-TOF $^+$) m/z : $[\text{M}^+ - \text{F}]^+$ observado 288.1103, requerido para $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{BF}$: 288.1104 error: 0.49 ppm.

meso-(indol-2-il)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno (5b)



Se siguió la metodología general, empleando 4b (175 mg, 0.48 mmol). La reacción se agitó a temperatura de reflujo durante 2 horas, se utilizó una mezcla hexano/acetato de etilo 85/15 como eluyente, para obtener 21 mg (0.07 mmol, 14%) de un sólido naranja con brillo metálico. Punto de fusión: 207 - 209 °C. FTIR- FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3406,

3133, 3099, 2954, 1533, 1786, 1224, 1127, 1084, 1017, 952, 894, 734, 667, 576, 465. UV-Vis (CHCl_3) $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) 513. RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.87 (s, 1H, NH), 7.90 (s, 2H, H-1), 7.78 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-12), 7.55 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-9), 7.42 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-11), 7.32 - 7.26 (m, 3H, H-3, H-10), 7.18 - 7.14 (m, 1H, H-7), 6.61 - 6.53 (m, 2H, H-2). RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 142.96 (C-1), 138.58 (C-5), 136.69 (C-13), 133.36 (C-8), 130.93 (C-3), 130.78 (C-4), 128.17 (C-6), 125.72 (C-11), 122.04 (C-12), 121.54 (C-10), 118.55 (C-2), 112.62 (C-7), 111.85 (C-9). RMN- ^{19}F (376 MHz, CDCl_3) δ -144.31 (q, $J =$, 28.7 Hz). RMN- ^{11}B (128 MHz, CDCl_3) δ 0.29 (t, $J = 28.7$ Hz). EMAR (ESI-TOF $^+$) m/z : $[\text{M}^+ - \text{F}]^+$ observado 288.1102, requerido para $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{BF}$: 288.1104 error: 0.27 ppm.

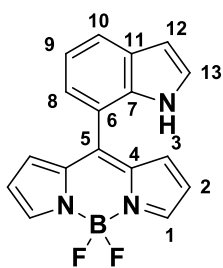


Y 35 mg (0.11 mmol, 24%) de 5d como un sólido color rojo con brillo metálico. Punto de fusión: 225 - 229 °C. FTIR- FTIR-ATR (ν , cm^{-1}): 3364, 3135, 3057, 2922, 1610, 1536, 1376, 1350, 1033, 979, 944, 877, 738, 641, 578, 503, 429. UV-Vis (CHCl_3)

$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) 524. RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 9.40 - 9.34 (m, 1H, NH), 7.95 (s, 1H, H-7), 7.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-12), 7.46 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-11), 7.36 - 7.29 (m, 2H, H-1, H-16), 7.26 - 7.21 (m, 2H, H-10, H-17), 7.01 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-15), 6.94 - 6.90 (m, 1H, H-3), 6.58 (dd, $J = 4.3, 1.7$ Hz, 1H, H-9), 6.48 (dt, $J = 3.6, 2.4$ Hz, 1H, H-2). RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 146.52 (C-13), 144.82 (C-5), 137.78 (C-8), 135.15

(C-6), 134.87 (C-4), 131.79 (C-10), 130.58 (C-14), 129.40 (C-1), 127.62 (C-17), 126.94 (C-7), 123.34 (C-11), 122.44 (C-16), 121.89 (C-15), 121.20 (C-3), 120.33 (C-9), 115.38 (C-12), 113.05 (C-2). RMN-¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) δ -145.24 (q, *J* = 29.3 Hz). RMN-¹¹B (128 MHz, CDCl₃) δ 0.85 (t, *J* = 29.3 Hz). EMAR (ESI-TOF⁺) *m/z*: [M⁺-F]⁺ observado 288.1103, requerido para C₁₇H₁₂N₃BF: 288.1102 error: 0.13 ppm.

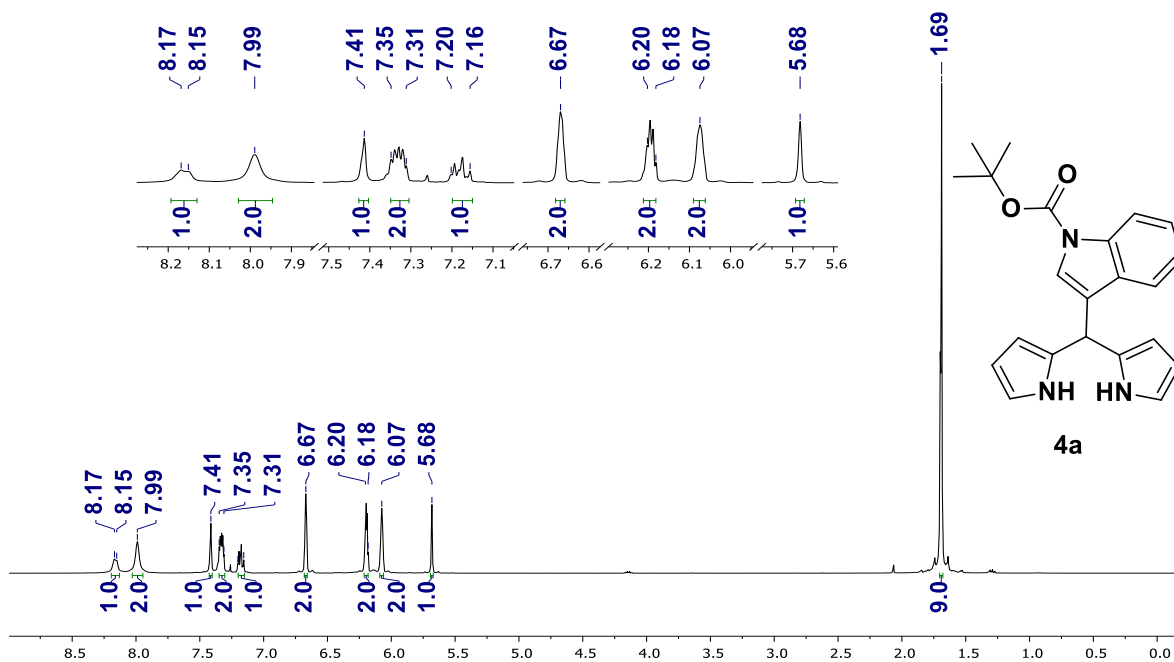
meso-(indol-7-il)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno (4c).



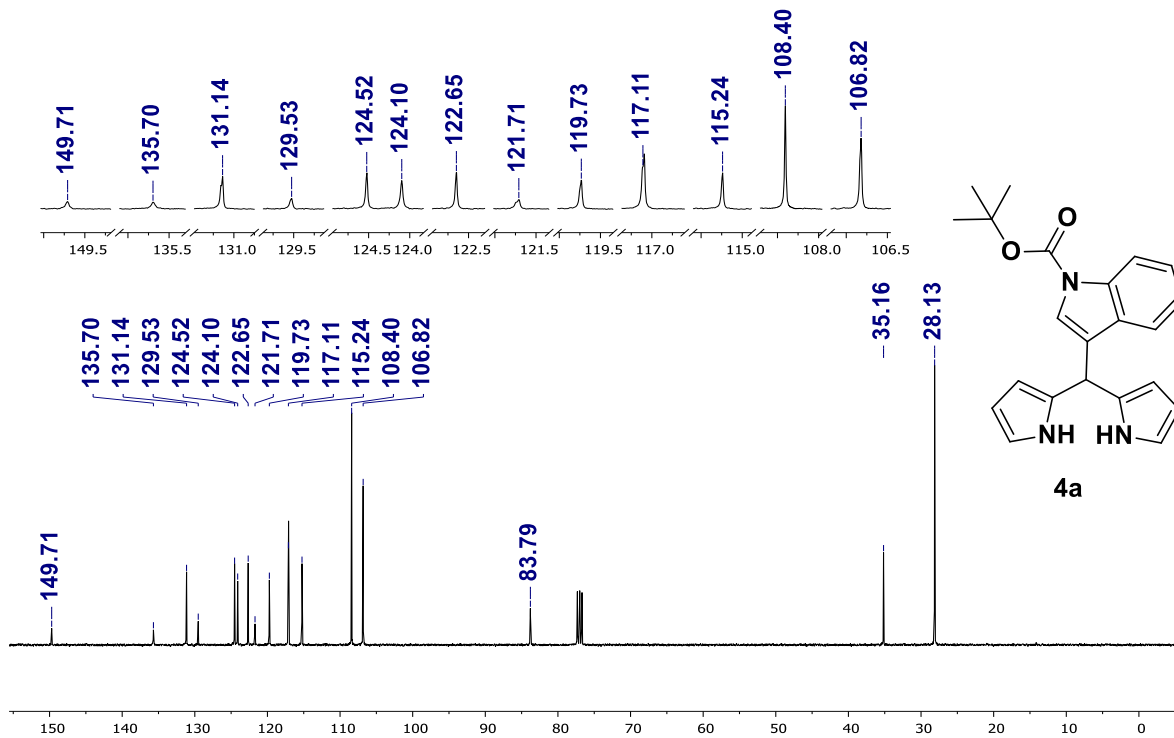
Se siguió la metodología general, empleando 3c (60 mg, 0.19 mmol). La reacción se agitó a temperatura de reflujo durante 1.5 horas, se utilizó una mezcla CH₂Cl₂/MeOH 95/5 como eluyente para la cromatografía en columna, para obtener 30.3 mg (0.1 mmol, 53%) de un sólido rojo.

Punto de fusión: 183-185 °C. FTIR- FTIR-ATR (ν , cm⁻¹): 3407, 3139, 3110, 2920, 1535, 1384, 1111, 1068, 1028, 958, 864, 738, 617, 503, 413. UV-Vis (CHCl₃) $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) 507. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.45 (s, 1H, NH), 7.95 (s, 2H, H-1), 7.86 – 7.78 (m, 1H, H-10), 7.34 – 7.26 (m, 1H, H-8), 7.26 – 7.22 (m, 1H, H-12), 7.19 (t, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-9), 6.94 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H, H-3), 6.63 (dd, *J* = 3.2, 2.1 Hz, 1H, H-13), 6.50 (d, *J* = 3.9 Hz, 2H, H-2). RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 144.49 (C-7), 144.32 (C-1), 134.70 (C-5), 134.25 (C-6), 131.34 (C-3), 128.90 (C-11), 124.85 (C-9, C-8), 123.53 (C-10), 119.63 (C-12), 118.58 (C-2), 117.26 (C-4), 102.77 (C-13). RMN-¹⁹F (376 MHz, CDCl₃) δ -144.93 (dq, *J* = 847.1, 28.6 Hz). RMN-¹¹B (128 MHz, CDCl₃) δ 0.33 (t, *J* = 28.6 Hz). EMAR (ESI-TOF⁺) *m/z*: [M⁺-F]⁺ observado 288.1102, requerido para C₁₇H₁₂N₃BF: 288.1106 error: 0.97 ppm.

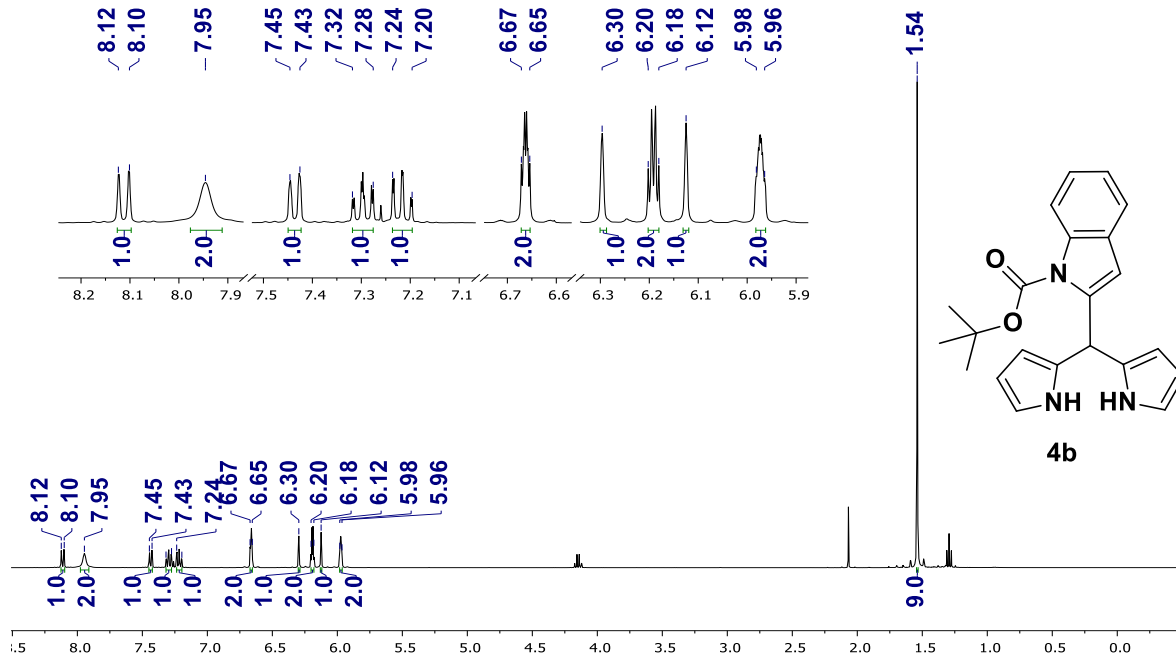
6.5. Espectros de RMN.



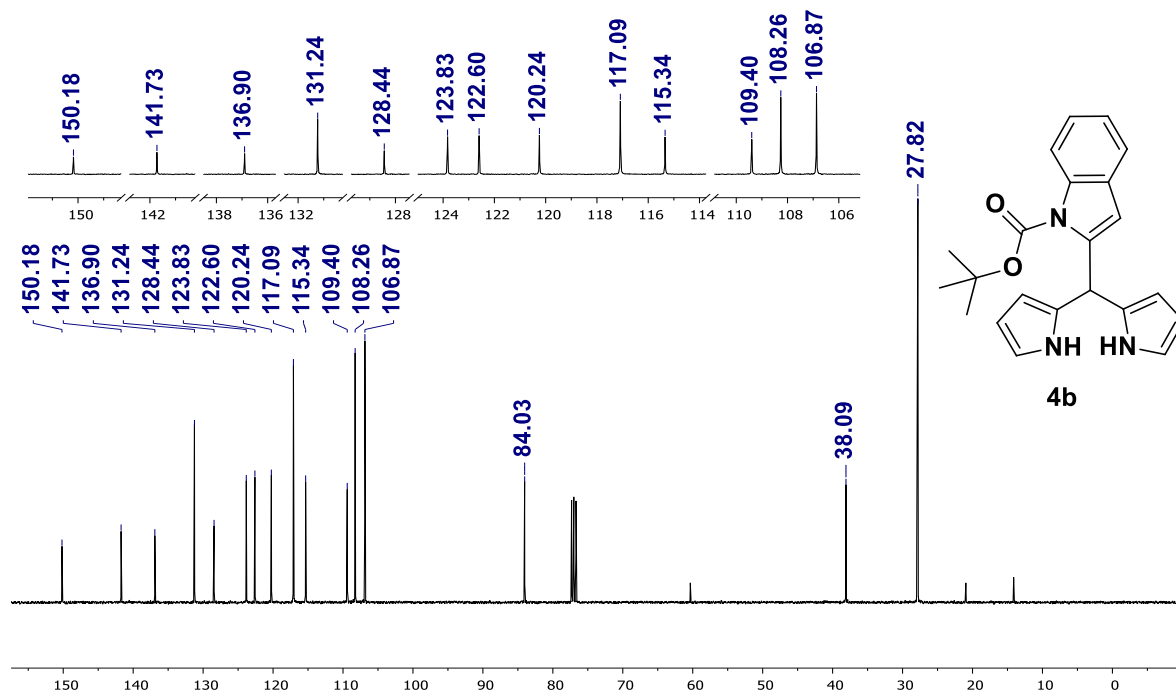
Espectro de RMN-¹H para 4a (CDCl₃, 400 MHz)



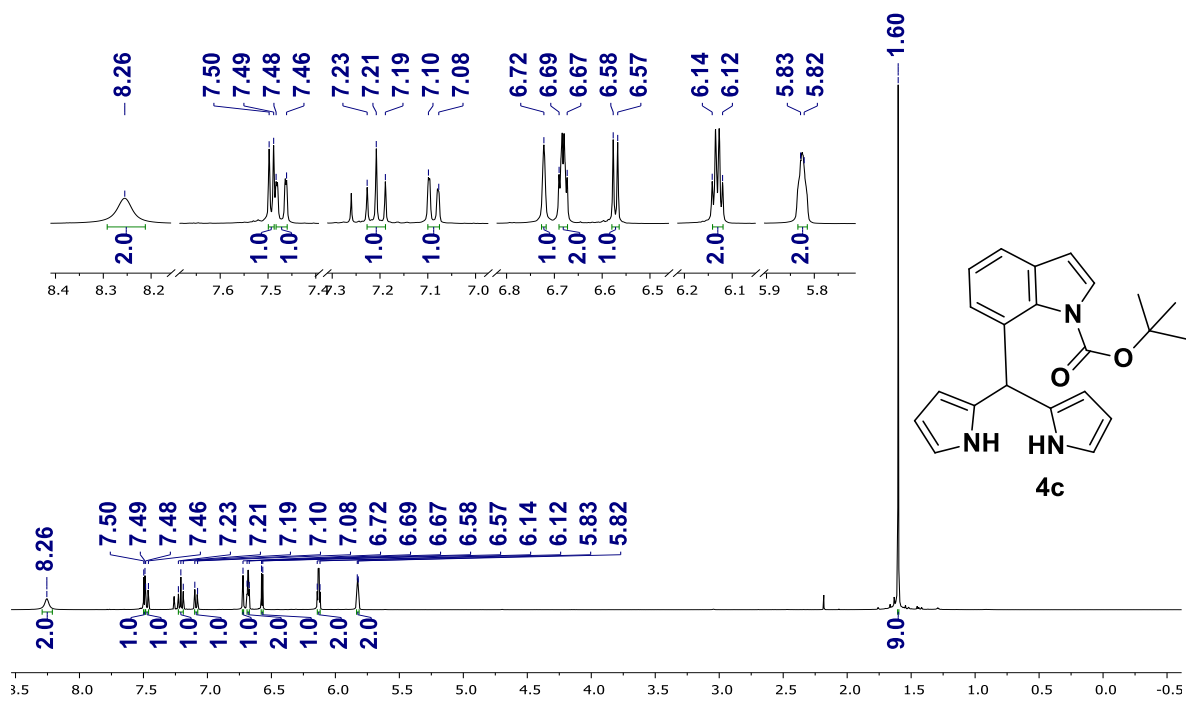
Espectro de RMN-¹³C para 4a (CDCl₃, 100 MHz)



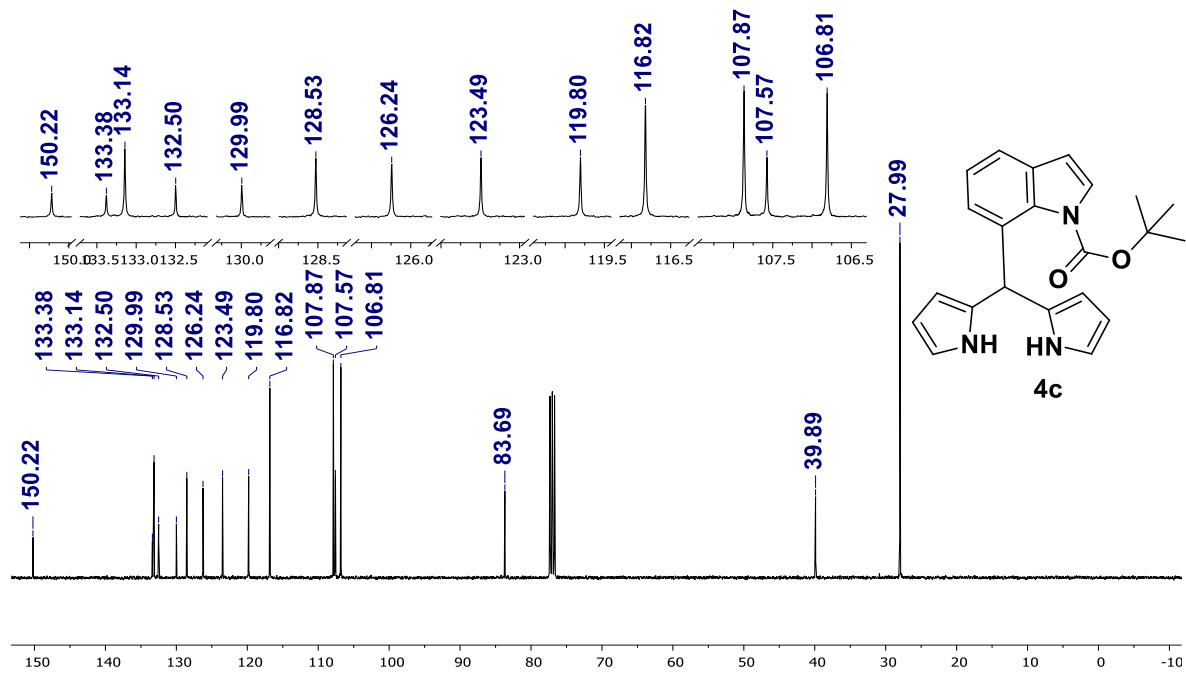
Espectro de RMN-¹H para 4b (CDCl₃, 400 MHz)



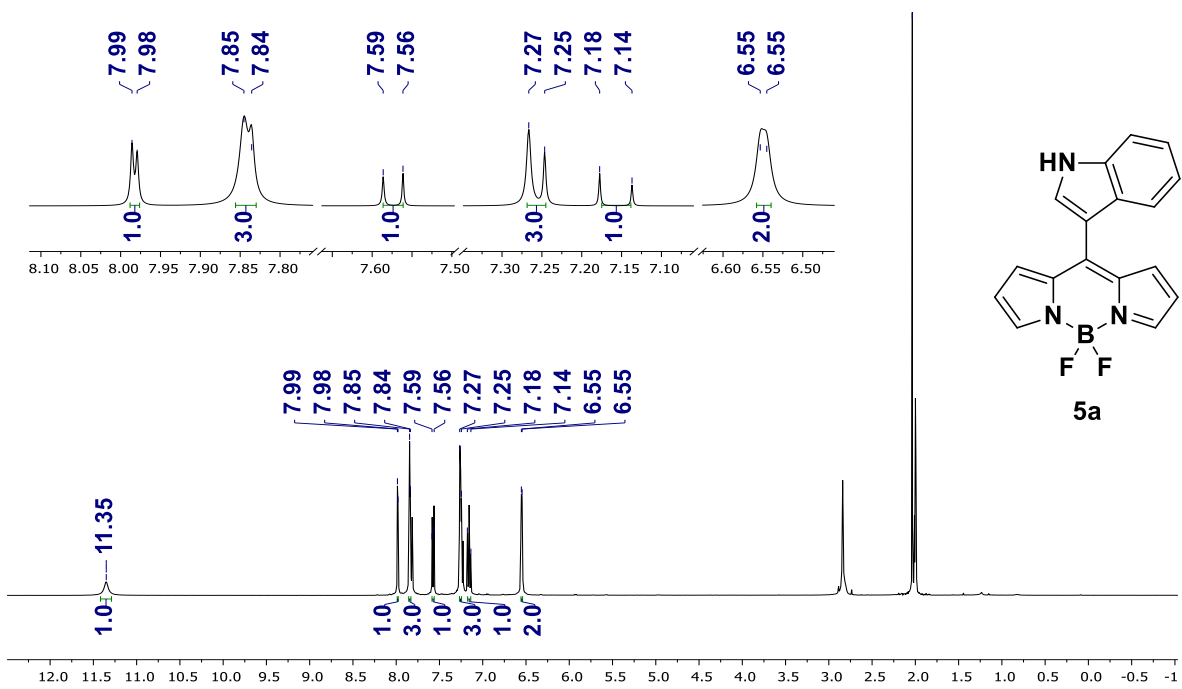
Espectro de RMN-¹³C para 4b (CDCl₃, 100 MHz)



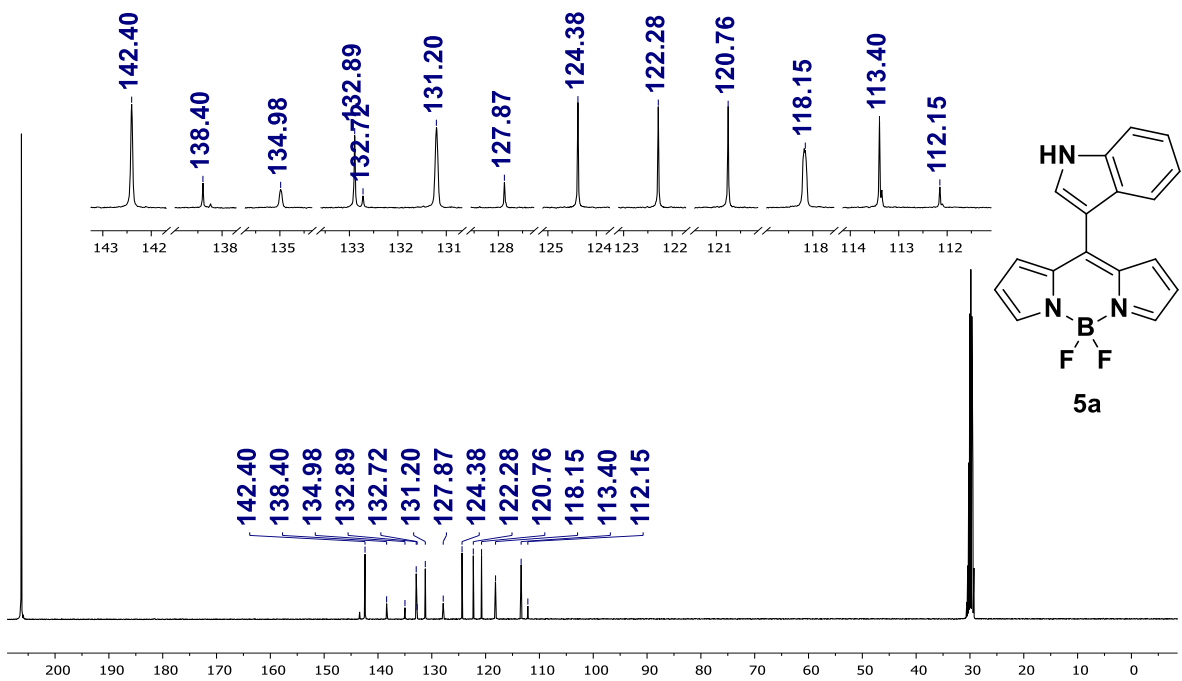
Espectro de RMN-¹H para 4c (CDCl₃, 400 MHz)



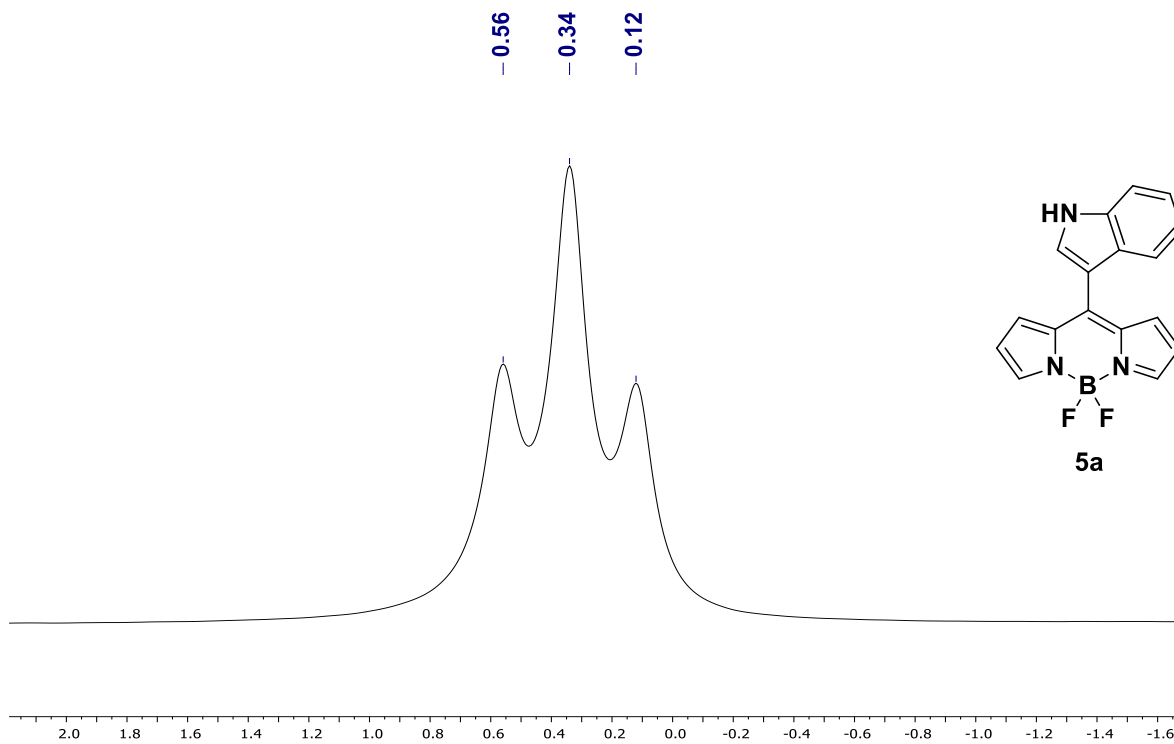
Espectro de RMN-¹³C para 4b (CDCl₃, 100 MHz)



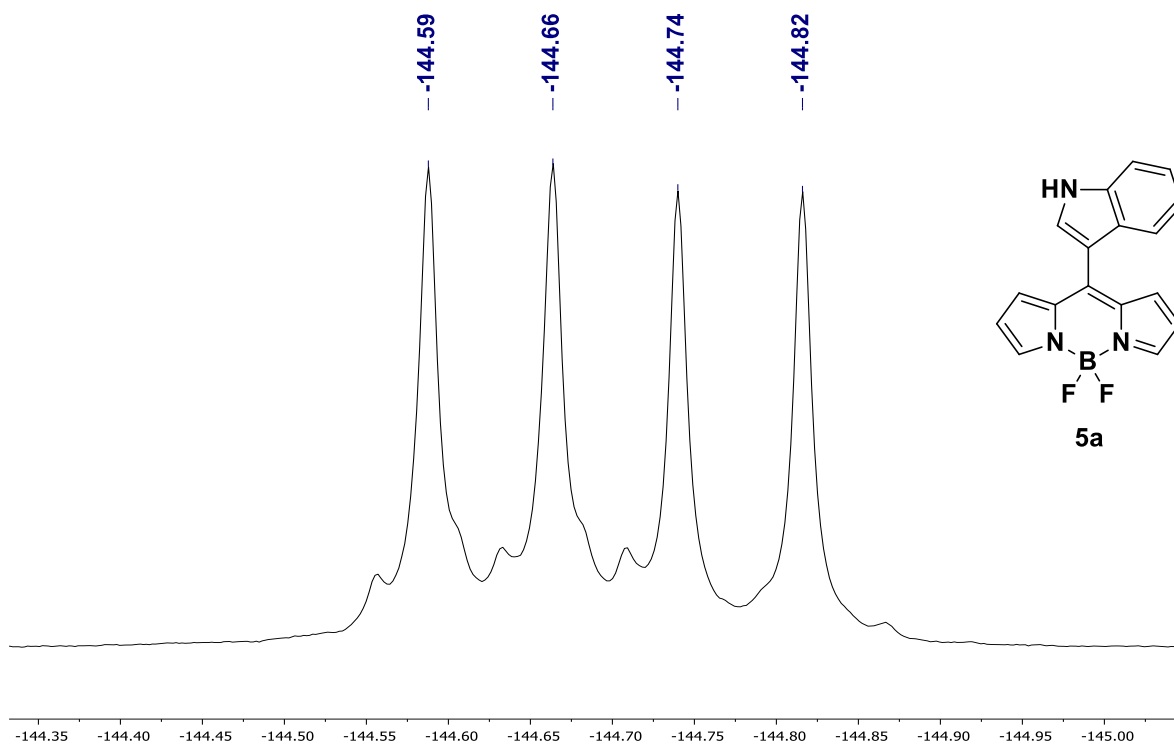
Espectro de RMN-¹H para 5a (Acetona-*d*₆, 400 MHz)



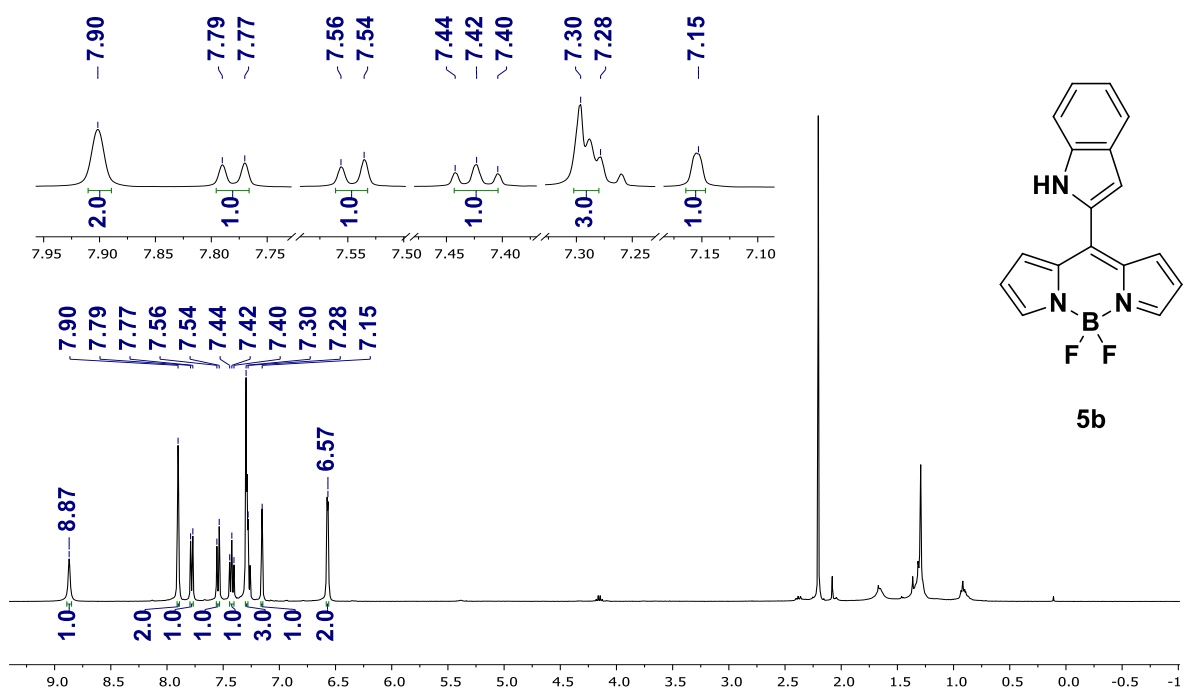
Espectro de RMN-¹³C para 5a (Acetona-*d*₆, 100 MHz)



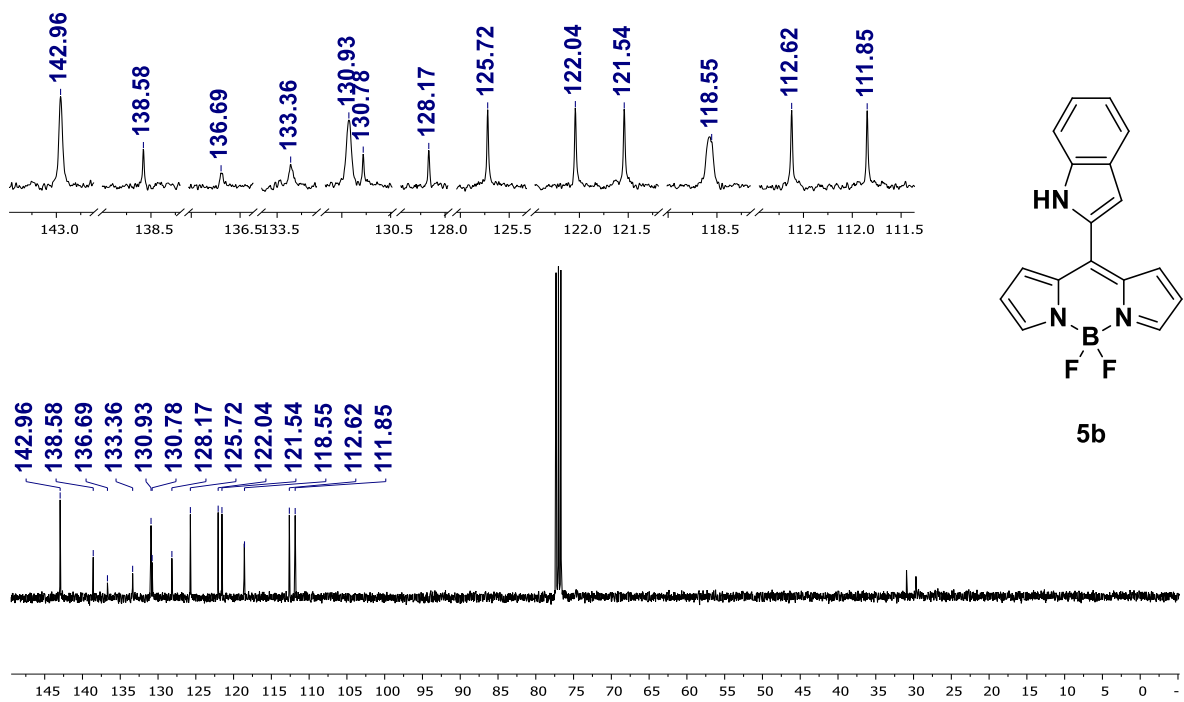
Espectro de RMN-¹¹B para 5a (Acetona-*d*₆, 128 MHz)



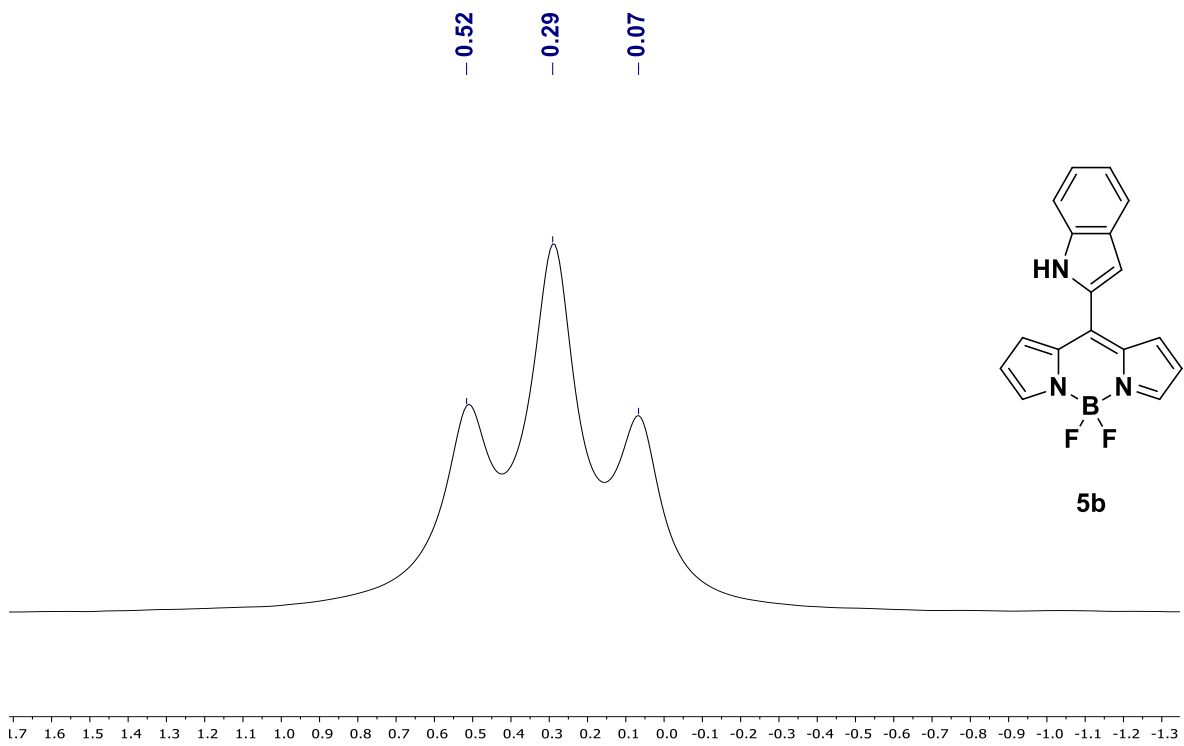
Espectro de RMN-¹⁹F para 5a (Acetona-*d*₆, 376 MHz)



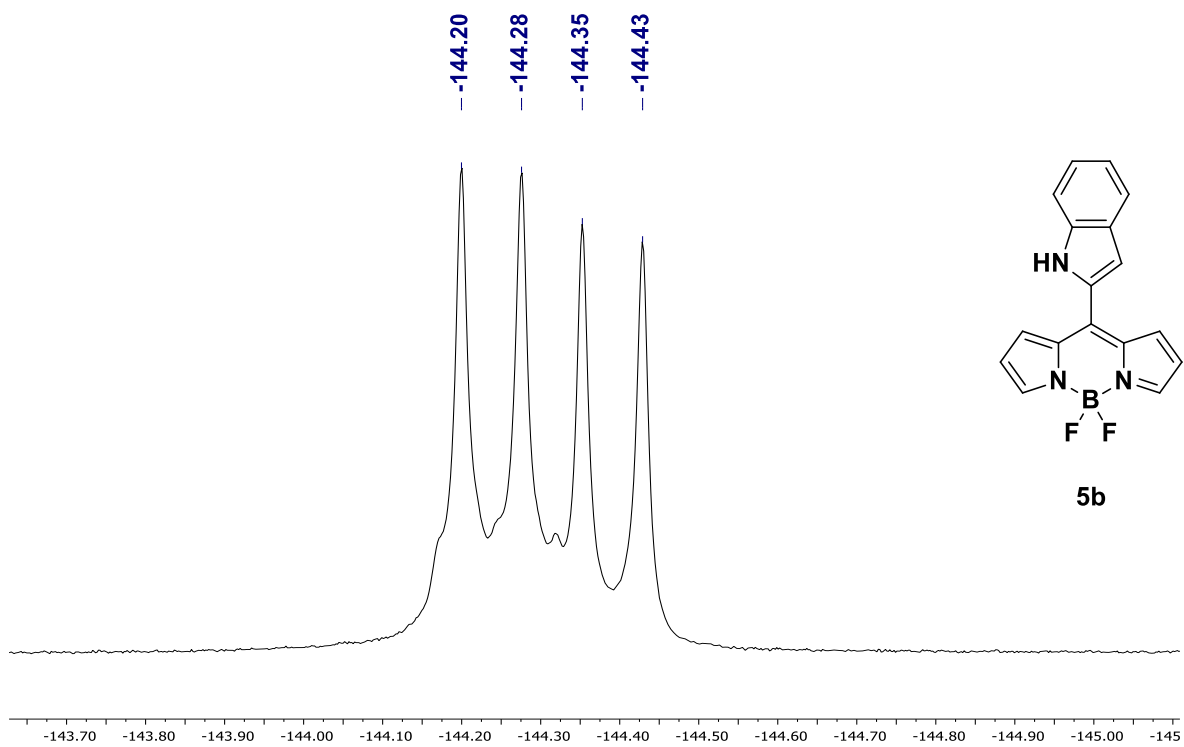
Espectro de RMN- ^1H para 5b (CDCl_3 , 400 MHz)



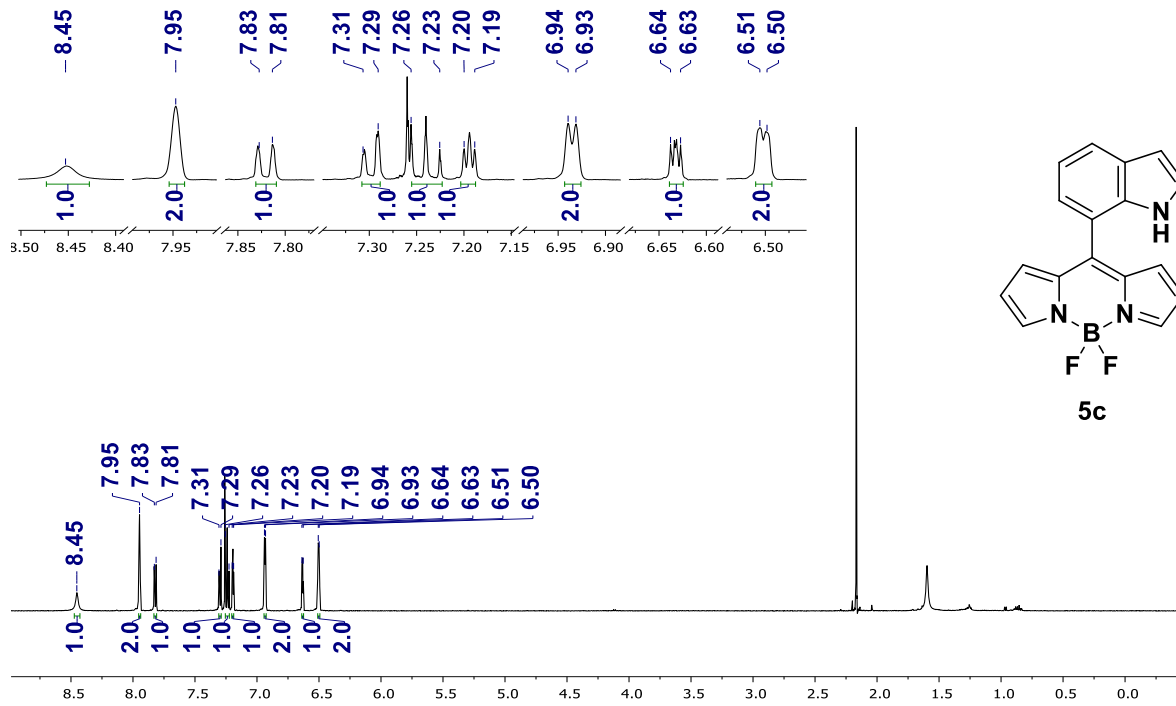
Espectro de RMN- ^{13}C para 5b (CDCl_3 , 400 MHz)



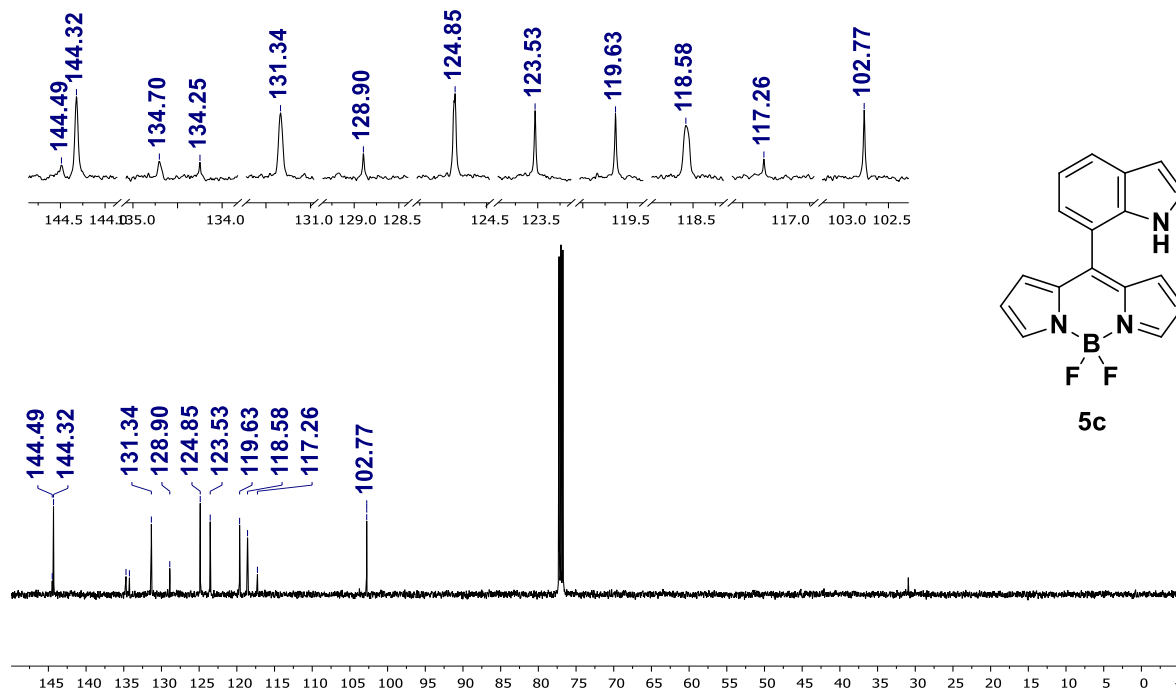
Espectro de RMN-¹¹B para 5b (CDCl₃, 128 MHz)



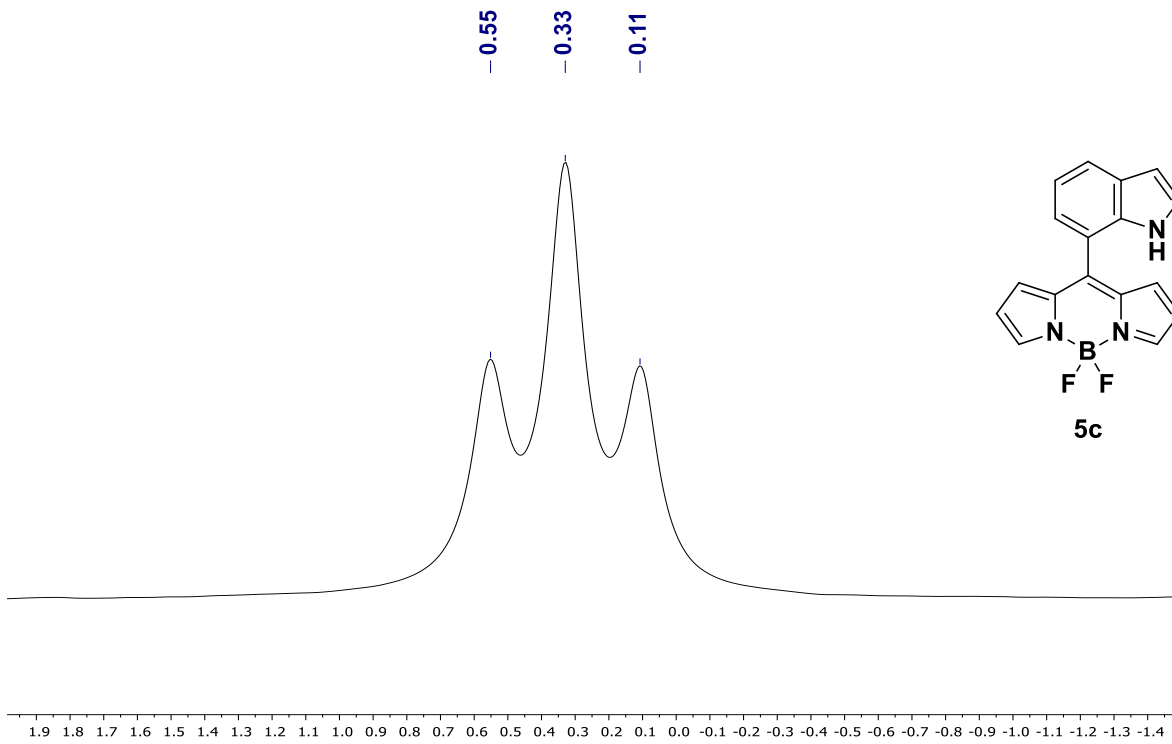
Espectro de RMN-¹⁹F para 5b (CDCl₃, 376 MHz)



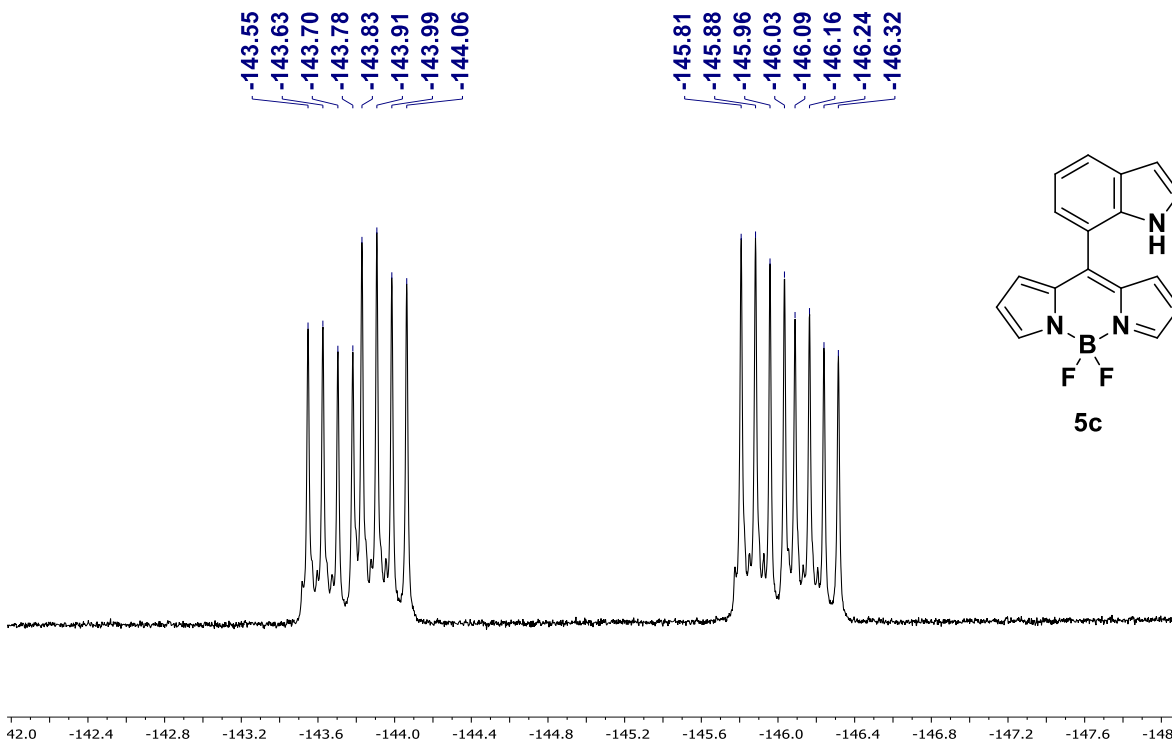
Espectro de RMN-¹H para 5c (CDCl₃, 400 MHz)



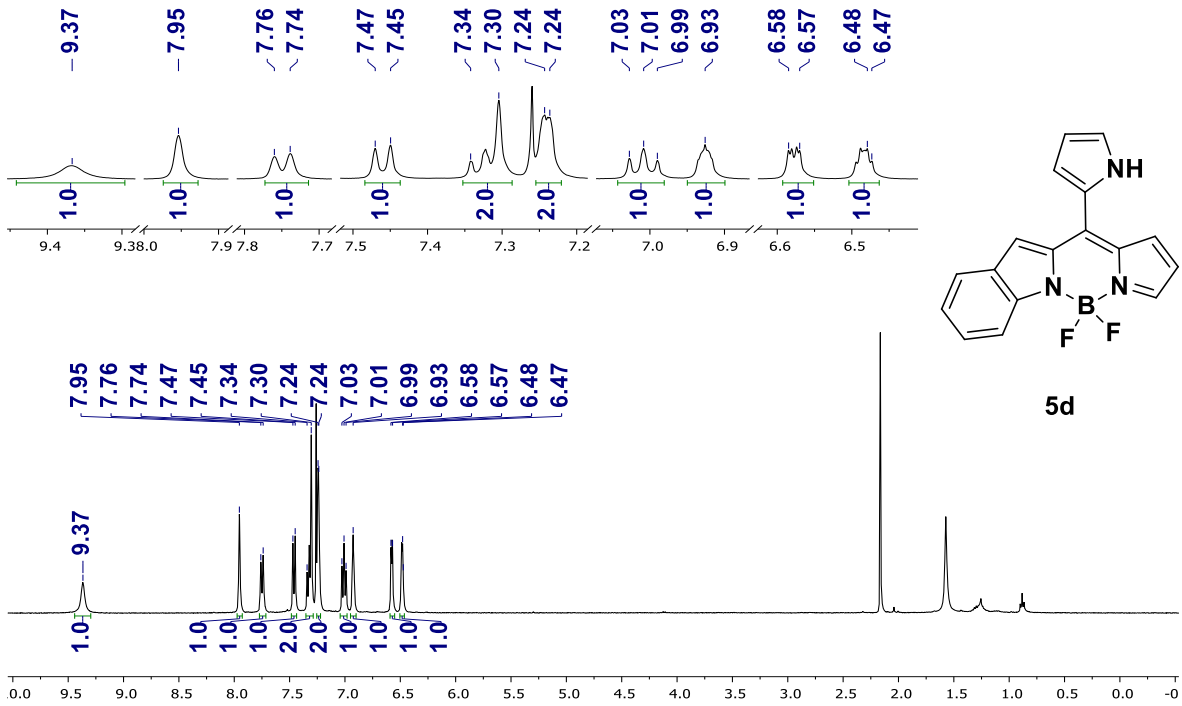
Espectro de RMN-¹³C para 5c (CDCl₃, 400 MHz)



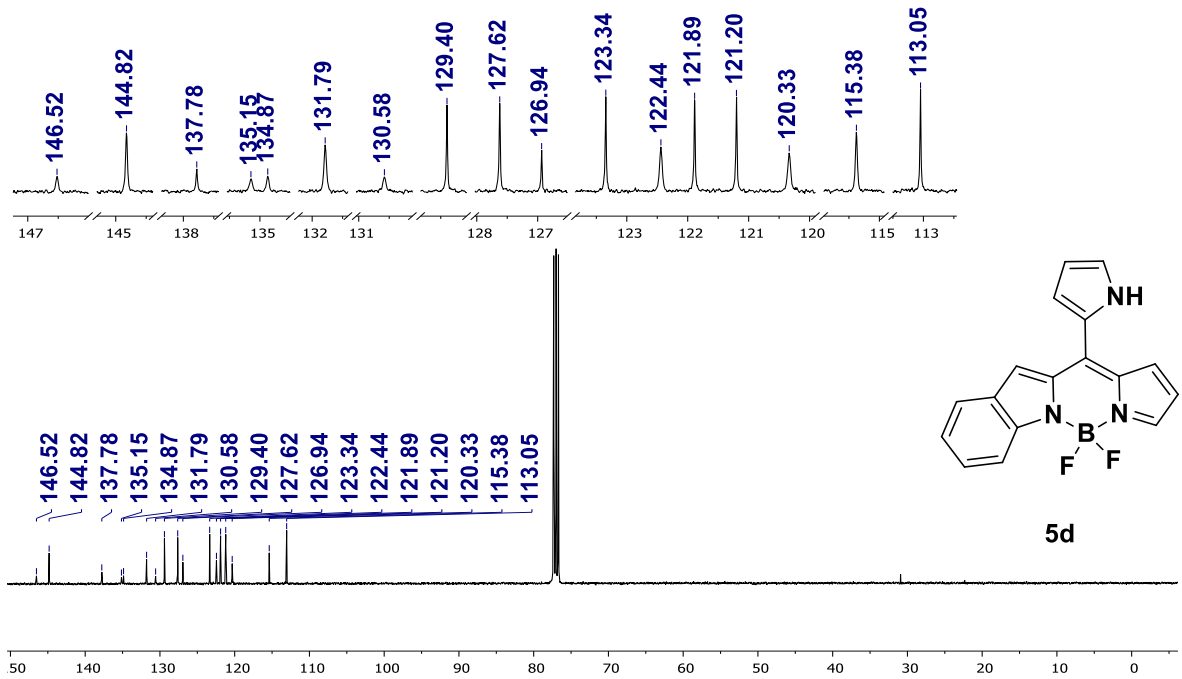
Espectro de RMN-¹¹B para 5c (CDCl₃, 128 MHz)



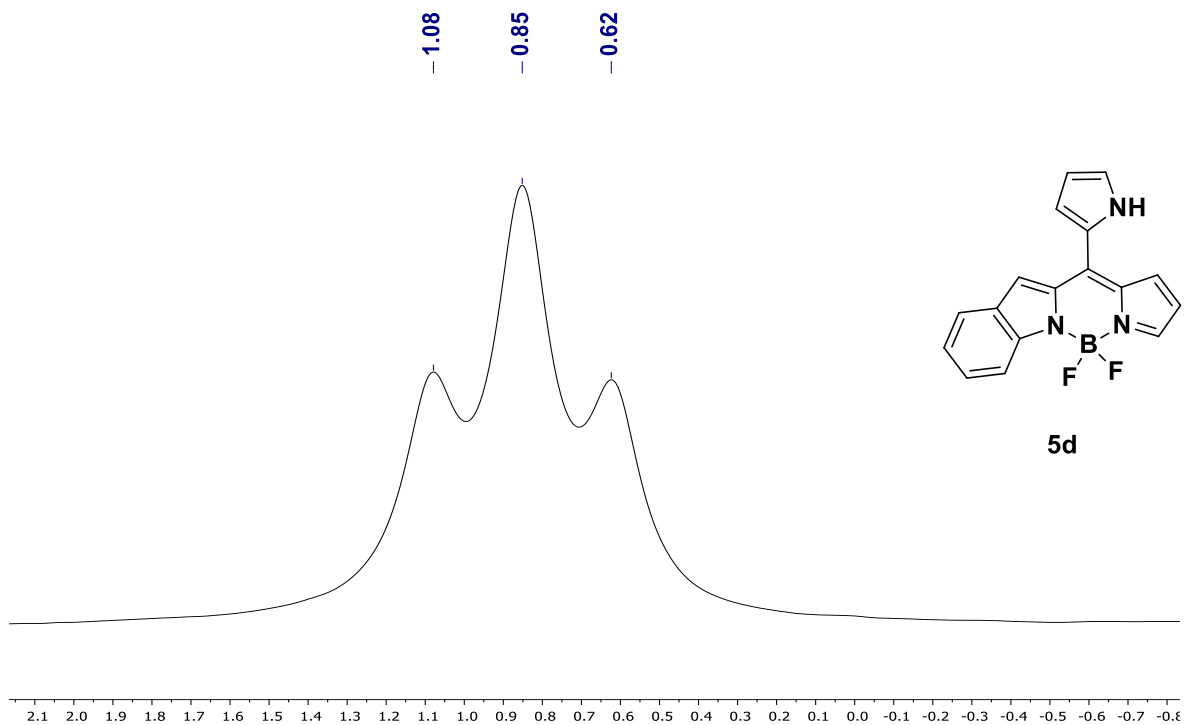
Espectro de RMN-¹⁹F para 5c (CDCl₃, 376 MHz)



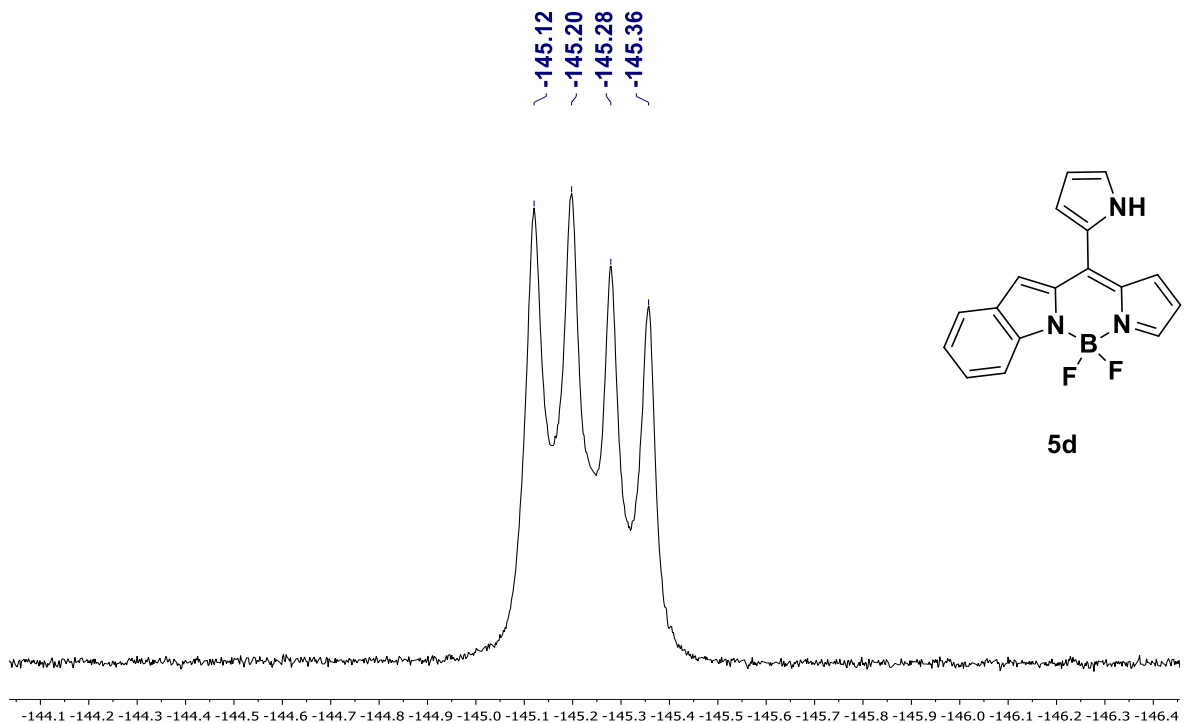
Espectro de RMN- ^1H para 5d (CDCl_3 , 400 MHz)



Espectro de RMN- ^{13}C para 5d (CDCl_3 , 400 MHz)



Espectro de RMN-¹¹B para 5d (CDCl₃, 128 MHz)



Espectro de RMN-¹⁹F para 5d (CDCl₃, 376 MHz)

7. Bibliografía

- [1] Toronto-Research-Chemicals, <https://www.trc-canada.com/>, consultado: 25/07/2018.
- [2] ThermoFisher-Scientific, <http://www.thermofisher.com/>, consultado: 25/07/2018.
- [3] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, EUA, 2002.
- [4] S. E. Braslavsky, in *Pure Appl. Chem.*, Vol. 79, 2007, p. 293.
- [5] A. U. Acuña, F. Amat-Guerri, in *Fluorescence of Supramolecules, Polymers, and Nanosystems* (Ed.: M. N. Berberan-Santos), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2008, pp. 3-20.
- [6] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *J. Chem. Educ.* 2011, 88, 731-738.
- [7] E. D. Clarke, *Ann. Philos.* 1819, 14, 34-36.
- [8] D. Brewster, *Trans. R. Soc. Edinburgh* 1834, 12, 538-545.
- [9] E. Becquerel, *Ann. Chim. Phys.* 1842, 9, 257-322.
- [10] **M. Łukarska, A. Jankowska, J. Gapiński, S. Valable, C. Anfray, B. Ménard, S. Mintova, S. Kowalak**, *Microporous Mesoporous Mater.* 2016, 236, 79-84.
- [11] J. A. Esquivel, Universidad Nacional Autónoma de México (México), 2011.
- [12] Banco-de-México, <http://www.banxico.org.mx/>, consultado: 28/07/2018.
- [13] R. C. Cabriales Gómez, *Ingenierías* 2004, 7, 12-16.
- [14] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, EUA, 2006.
- [15] S. Fery-Forgues, D. Lavabre, *J. Chem. Educ.* 1999, 76, 1260-1264.
- [16] S. Kolemen, E. U. Akkaya, *Coord. Chem. Rev.* 2018, 354, 121-134.
- [17] R. Y. Tsien, *Biochemistry* 1980, 19, 2396-2404.

- [18] B. M. Luby, D. M. Charron, C. M. MacLaughlin, G. Zheng, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2017, 113, 97-121.
- [19] J. Chan, S. C. Dodani, C. J. Chang, *Nat. Chem.* 2012, 4, 973-984.
- [20] G. T. Hermanson, in *Bioconjugate Techniques (Third Edition)* (Ed.: G. T. Hermanson), Academic Press, Boston, 2013, pp. 395-463.
- [21] A. M. Durantini, D. A. Heredia, J. E. Durantini, E. N. Durantini, *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 144, 651-661.
- [22] G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2008, 47, 1184-1201.
- [23] R. Ziessel, G. Ulrich, A. Harriman, *New J. Chem.* 2007, 31, 496-501.
- [24] B. M. Squeo, V. G. Gregoriou, A. Avgeropoulos, S. Baysec, S. Allard, U. Scherf, C. L. Chochos, *Prog. Polym. Sci.* 2017, 71, 26-52.
- [25] C. D. Georgiou, D. Zisimopoulos, V. Argyropoulou, E. Kalaitzopoulou, G. Salachas, T. Grune, *Redox Biol.* 2018, 17, 128-142.
- [26] C. D. Georgiou, D. Zisimopoulos, V. Argyropoulou, E. Kalaitzopoulou, P. V. Ioannou, G. Salachas, T. Grune, *Redox Biol.* 2018, 17, 236-245.
- [27] D. Su, C. Teoh, N. Gao, Q.-H. Xu, Y.-T. Chang, *Sensors* 2016, 16, 1397.
- [28] E. Xochitiotzi-Flores, A. Jiménez-Sánchez, H. García-Ortega, N. Sánchez-Puig, M. Romero-Ávila, R. Santillan, N. Farfán, *New J. Chem.* 2016, 40, 4500-4512.
- [29] P. M. Gosavi, I. V. Korendovych, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2016, 34, 103-109.
- [30] P. Talukder, S. Chen, C. T. Liu, E. A. Baldwin, S. J. Benkovic, S. M. Hecht, *Bioorg. Med. Chem.* 2014, 22, 5924-5934.
- [31] S. Joshi, S. Kumari, A. Sarmah, D. D. Pant, R. Sakhuja, *J. Mol. Liq.* 2017, 248, 668-677.

- [32] Y. Tang, G.-F. Jiang, *Tetrahedron Lett.* 2017, 58, 2846-2849.
- [33] N. Kaur, P. Kaur, G. Bhatia, K. Singh, J. Singh, *RSC Adv.* 2016, 6, 82810-82816.
- [34] J. Wu, Z. Ye, F. Wu, H. Wang, L. Zeng, G. M. Bao, *Talanta* 2018, 181, 239-247.
- [35] C. Zhao, Y. Zhou, Q. Lin, L. Zhu, P. Feng, Y. Zhang, J. Cao, *J. Phys. Chem. B* 2011, 115, 642-647.
- [36] B. J. Littler, M. A. Miller, C.-H. Hung, R. W. Wagner, D. F. O'Shea, P. D. Boyle, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.* 1999, 64, 1391-1396.
- [37] A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* 2007, 107, 4891-4932.
- [38] J.-W. Ka, C.-H. Lee, *Tetrahedron Lett.* 2000, 41, 4609-4613.
- [39] C.-H. Lee, J. S. Lindsey, *Tetrahedron* 1994, 50, 11427-11440.
- [40] T. Alfred, K. Franz-Heinrich, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1968, 718, 208-223.
- [41] R. W. Wagner, J. S. Lindsey, in *Pure App. Chem.*, Vol. 68, 1996, p. 1373.