



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

RECEPTORES BASADOS EN LIGANTES CON PROPIEDADES ES IPT COMO
SENSORES ÓPTICOS PARA IONES METÁLICOS Y POLIOLES

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. KARLA ELISA TREJO HUIZAR

TUTOR DR. ANATOLI IATSIMIRSKI
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR, UNIDAD DE
POSGRADO, FACULTAD DE QUÍMICA.

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**RECEPTORES BASADOS EN LIGANTES CON PROPIEDADES ES IPT
COMO SENSORES ÓPTICOS PARA IONES METÁLICOS Y POLIOLES**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. KARLA ELISA TREJO HUIZAR

**TUTOR DR. ANATOLI IATSIMIRSKI
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR, UNIDAD DE
POSGRADO, FACULTAD DE QUÍMICA.**



Ciudad de México, 2021

La verdad científica está más allá de toda lealtad y deslealtad.

La fundación, Isaac Asimov

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi alma mater, por acogirme durante mis años de estudio, por ser mi segunda casa y por brindarme tanto conocimiento.

A la Facultad de Química y la Unidad de Posgrado por abrirme las puertas de sus instalaciones y de manera muy especial al Dr. Anatoli Iatsimirski por ser un gran asesor que con paciencia y dedicación me llevó de la mano en este camino del conocimiento, gracias por todos sus consejos y enseñanzas, al Dr. Arturo Jiménez Sánchez por compartir conmigo sus conocimientos, por sus aportaciones y colaboraciones y a la Dra. Paola Gómez-Tagle por todo el apoyo recibido.

Al Consejo Nacional De Ciencia Y Tecnología por la beca otorgada para mis estudios de doctorado (CVU 510856).

A los miembros del jurado, Dr. Norberto Farfán, Dr. Herbert Höpfl, Dr. Hugo Morales, Dra. Pilar Carreón y Dr. Alejandro Dorazco por sus valiosas aportaciones.

A la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII) por los servicios de caracterización otorgados.

A la UNAM por el apoyo económico recibido a través de los Proyectos PAPIIT IN 219718 "Estudios estructura-reactividad con nucleófilos coordinados" y PAIP 5000-9161.

A mis compañeros del laboratorio Carlos Lugo, Elizabeth Alpizar, Alejandra López y Ramón Ortega por su amistad y su apoyo.

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, laboratorio 213 de Posgrado. Además, Los resultados obtenidos fueron presentados en:

- 52° Congreso de la Sociedad Química de México, Puerto Vallarta, Jalisco, septiembre 2017, presentación oral No. QSML-P5-O
- 13th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, Quebec City, Canada, Julio 2018, poster No. 316

Además dio lugar a los siguientes artículos

- Trejo-Huizar, K. E.; Jiménez-Sánchez, A.; Martínez-Aguirre, M. A.; Yatsimirsky, A. K. *J. Lumin.* **2016**, *179*, 393–401.
- Trejo-Huizar, K. E.; Jiménez-Sánchez, A.; Yatsimirsky, A. K. *Inorganica Chim. Acta* **2020**, *505*, No. de artículo 119471.
-

Contenido

Abreviaturas y acrónimos	6
Lista de compuestos	9
1 Introducción: aspectos de la luminiscencia.....	10
1.1 Fluorescencia y otros tipos de desexcitación de moléculas excitadas	12
1.2 Transferencia intramolecular de protón en el estado excitado (ESIPT) ...	14
2 Antecedentes.....	16
2.1 Sensores moleculares fluorescentes.....	18
2.1.1 Sensores tipo PET.....	19
2.2 Detección de moléculas neutras	20
2.3 Síntesis, propiedades ópticas y de ácido-base de 3-hidroxiquinolonas y 2-(2'-hidroxifenil)-benzimidazol	24
2.3.1 Síntesis química	25
2.3.2 Propiedades ópticas de los compuestos estudiados	27
2.3.3 Propiedades ácido-base y de coordinación de la 2-fenil-3-hidroxi-quinolona y el 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol	30
3 Hipótesis	34
4 Objetivos.....	34
5 Resultados y discusión	36
5.1 Interacción de 3-hidroxiquinolonas con ácido fenilborónico y el efecto micelar	37
5.1.1 Titulaciones ratiométricas de 3 con polioles	42
5.1.2 Interacción de 4 con micelas de HTAB.....	48
5.1.3 Interacción de 4 con iones metálicos.....	50
5.1.4 Efectos de la complejación en la fluorescencia de 4.	62

5.2	Receptores urea y tiourea con fragmentos (2-hidroxifenil)-benzimidazol para reconocimiento de iones metálicos y aniones.....	65
5.2.1	Estudio de la tiourea 7	67
5.2.2	Reconocimiento de aniones con la tiourea 7	68
5.2.3	Estudio de la tiourea 7 con Zn(II) mediante RMN ¹ H.....	74
5.2.4	Reconocimiento de iones metálicos y aniones para la tiourea 6	75
5.2.5	Estudios para la interacción de la urea 5 con aniones.....	83
5.2.6	Estudio de la interacción de la urea 5 con distintos cationes metálicos 87	
6	Conclusiones	93
7	Procedimiento experimental	95
7.1	Aspectos generales.....	95
7.2	Métodos de síntesis	96
8	Apéndices	110
8.1	Análisis mecánico cuántico de las propiedades fluorescentes de los complejos de Al ³⁺ con el ligante 4.....	110
8.2	Ecuaciones empleadas	116
	Referencias	118

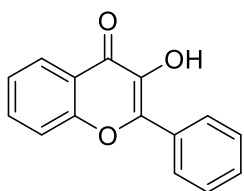
Abreviaturas y acrónimos

λ	Longitud de onda
Abs.	Absorbancia
AcO ⁻	Acetato
AcOEt	Acetato de etilo
AFB	Ácido fenilborónico
AFQ	Aumento de la fluorescencia por quelatación
Ar	Aromático
ARS	Alizarin red S
br.	Ancha
c	Señal cuadruple
CAPS	Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propansulfónico
CHES	Ácido 2-(ciclohexilamino)-etansulfónico
CMC	Concentración micelar crítica
d	Señal doble
DCC	diciclohexilcarbodiimida
Disolv.	Disolvente
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EAQ	Extinción por el aumento de la quelatación
EM-EI	Espectrometría de masas por impacto electrónico
Equiv., eq.	Equivalentes
ESIPT	Excited state intramolecular proton transfer
Exp.	Experimento
FRET	Transferencia de energía de resonancia fluorescente
Fru	Fructosa
Gal	Galactosa
Glu	Glucosa
HBI	Hidroxifenilbenzimidazol
HBO	Hidroxifenilbenzoxazol
HBT	Hidroxifenilbenzotiazol

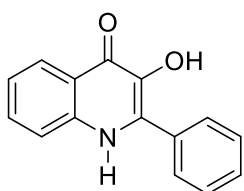
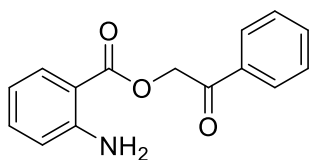
H _m	Hidrógeno meta
H _o	Hidrógeno orto
H _p	Hidrógeno para
HTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
ICT	Transferencia interna de carga
IDA	Indicator displacement assay
ILCT	Transferencia de carga inter- ligante
ITC	Transferencia de carga intramolecular fotoinducida
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K _{ass}	Constante de asociación
k _{nr}	Proceso no radiativo (extinción).
K _{obs}	Constante de equilibrio observada
k _r	Proceso radiativo (emisión)
K _{tet}	Constante de formación del complejo tetraédrico
K _{trig}	Constante de formación del complejo trigonal
Lac	Lactosa
LD	Límite de detección
Man	Manosa
MES	Ácido 2-(N-morfolin)-1-etansulfónico
ML	Complejo metal-ligante
ML	Complejo metal-ligante 1:1
ML ₂	Complejo metal-ligante 1:2
MLCT	Transferencia de carga de metal a ligante
MOPS	Ácido 3-morfolinpropan-1-sulfónico
N	Forma normal en el edo. fundamental
N*	Forma normal en el edo. excitado
NC	No calculada
nm	Nanómetros
OTf	Anión triflato
PET	Photoinduced electron transfer
PPA	Ácido polifosfórico
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear

s	Singulete
S ₀	En el edo. fundamental
S ₀ *	En el edo. excitado
S ₁	En el edo. fundamental
S ₁ *	En el edo. excitado
SDS	Sal de dodecilsulfato de sodio
Sucr	Sucrosa
T	Forma tautomérica en el edo. fundamental
T*	Forma tautomérica en el edo. Excitado
t.a.	Temperatura ambiente
TBET	Energía de transferencia a través de enlace
TD-DFT	Time-dependent density-functional theory
TEA	Trietilamina
Temp.	Temperatura
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TNO	Transición Natural Orbital
UV-Vis	Ultravioleta-visible

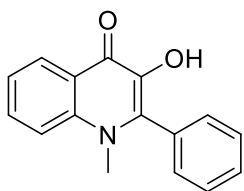
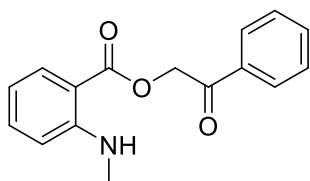
Lista de compuestos



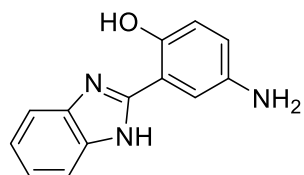
1



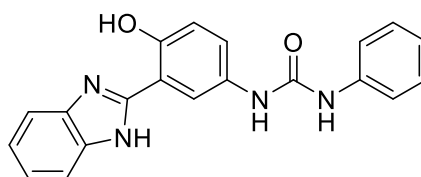
3



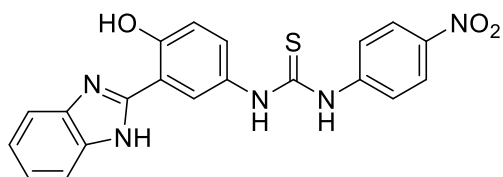
4



5



6



7

1 Introducción: aspectos de la luminiscencia

La luminiscencia es la emisión de fotones del ultravioleta, visible o infrarrojo de especies electrónicamente excitadas. La palabra luminiscencia, la cual viene del latín (*lumen*=luz) fue introducida como *luminescenz* por el físico e historiador de la ciencia Eilhardt Wiedemann en 1888, para describir “todo aquel fenómeno de luz que no está condicionado únicamente por el aumento de la temperatura”, a diferencia de la incandescencia. La luminiscencia es “luz fría” mientras que incandescencia es “luz caliente”. Los distintos tipos de luminiscencia son clasificados de acuerdo al modo de excitación.¹

Fenómeno	Modo de excitación
Fotoluminiscencia (fluorescencia, fosforescencia, fluorescencia retardada)	Absorción de luz (fotones)
Radioluminiscencia	Radiación ionizante (rayos X, α , β , γ)
Cátodoluminiscencia	Rayos catódicos (haces de electrones)
Electroluminiscencia	Campo eléctrico
Termoluminiscencia	Calentamiento después del almacenamiento previo de energía (irradiación radiactiva)
Quimioluminiscencia	Proceso químico (por ej. oxidación)
Bioluminiscencia	Proceso bioquímico
Triboluminiscencia	Fuerzas electrostáticas y friccionales
Sonoluminiscencia	Ultrasonidos

Tabla 1. Distintos tipos de luminiscencia

La fluorescencia y fosforescencia son casos particulares de la luminiscencia (tabla 1). El modo de excitación es la absorción de un fotón, lo que conduce a las especies absorbidas a un estado electrónicamente excitado. La emisión de fotones acompañada de la desexcitación es conocida como fotoluminiscencia (fluorescencia, fosforescencia y fluorescencia retardada), la cual es uno de los posibles efectos físicos resultantes de la interacción de la luz con la materia (figura 1).

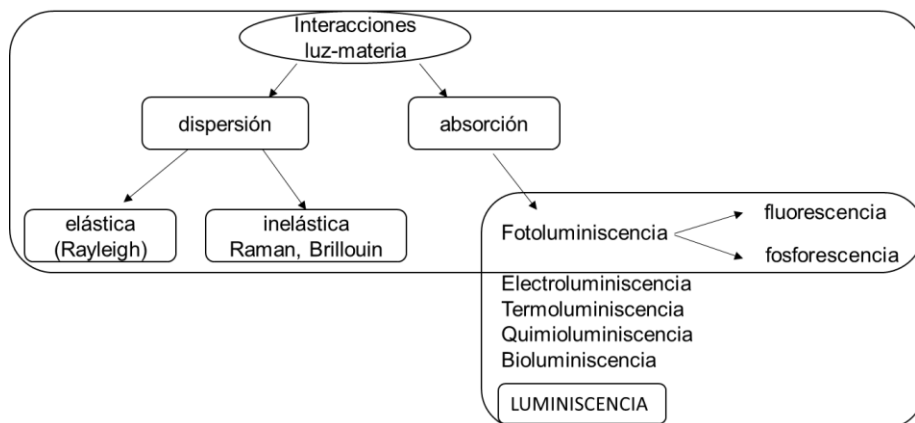


Figura 1. Posiciones de la fluorescencia y fosforescencia en el marco de las interacciones luz-materia

El término fosforescencia viene del griego $\phi\omega\zeta$ =luz (caso genitivo: $\phi\omega\tau\omega\zeta \rightarrow$ fotón) y $\phi\omega\rho\epsilon\iota\nu$ =llevar. Por lo tanto, fosfor significa “lo que lleva luz”. El término fosfor ha sido ciertamente asignado desde la edad media a materiales que brillan en la oscuridad después de ser expuestos a la luz. Existen muchos ejemplos de minerales reportados a lo largo del tiempo que exhiben esta propiedad, por mencionar uno, la piedra de Boloña, descubierta por un zapatero en Boloña en 1602, Vincenzo Cascariolo.

Antes de que se introdujera el término fluorescencia, en 1565 el físico Nicolás Monardes describió el fascinante y peculiar color azul de una infusión de madera conocida como Lignina Nephriticum. Esta madera fue investigada por varios científicos como Boyle, pero el fenómeno no fue entendido. Contrario a la definición de fosforescencia, el término fluorescencia no es tan obvio. Es extraño a primera vista que contenga flúor, el cual como elemento no es conocido por tener fluorescencia. Éste término fue introducido por Sir George Gabriel Stokes, a mediados del siglo XIX, quien publicó un artículo conocido como “Sobre la refrangibilidad de la luz” en 1852. Él demostró que el fenómeno era la emisión de la luz tras la absorción de la misma. Stokes también declaró que la luz emitida es siempre de mayor longitud de onda que la luz de excitación, esto se conoce como la ley de Stokes. En su artículo él llamó al fenómeno observado “reflexión dispersiva” pero no estaba satisfecho con el nombre y estaba más inclinado a llamarlo *fluorescencia*, de la fluorita, así como el análogo del término *opalescencia* es

derivado del nombre del mineral, esto fue retomando la idea de David Brewster en 1833, quien reportó que un haz de luz blanca que pasa a través de un extracto alcohólico de hojas (clorofila) parece ser rojo cuando se observaba desde un lado, y señaló la similitud con la luz azul que viene de un haz de luz que pasa a través de cristales de fluorita. La mayoría de variedades de fluorita (minerales que contienen fluoruro de calcio), ciertamente exhiben la propiedad arriba descrita. Muchos minerales de espato son conocidos por ser coloridos debido a la presencia de pequeñas cantidades de impurezas (europio, itrio y disprosio, por ejemplo), lo que explica las propiedades fluorescentes ya que la fluorita por sí sola no fluoresce.

1.1 Fluorescencia y otros tipos de desexcitación de moléculas excitadas

Una vez que una molécula es excitada por la absorción de un fotón, puede regresar al estado basal con emisión de la fluorescencia, pero generalmente otras formas de desexcitación ocurren, por ejemplo, conversión interna, cruce intersistemas (posiblemente seguido de la emisión de la fosforescencia), transferencia de carga interna y cambio conformacional (figura 2).

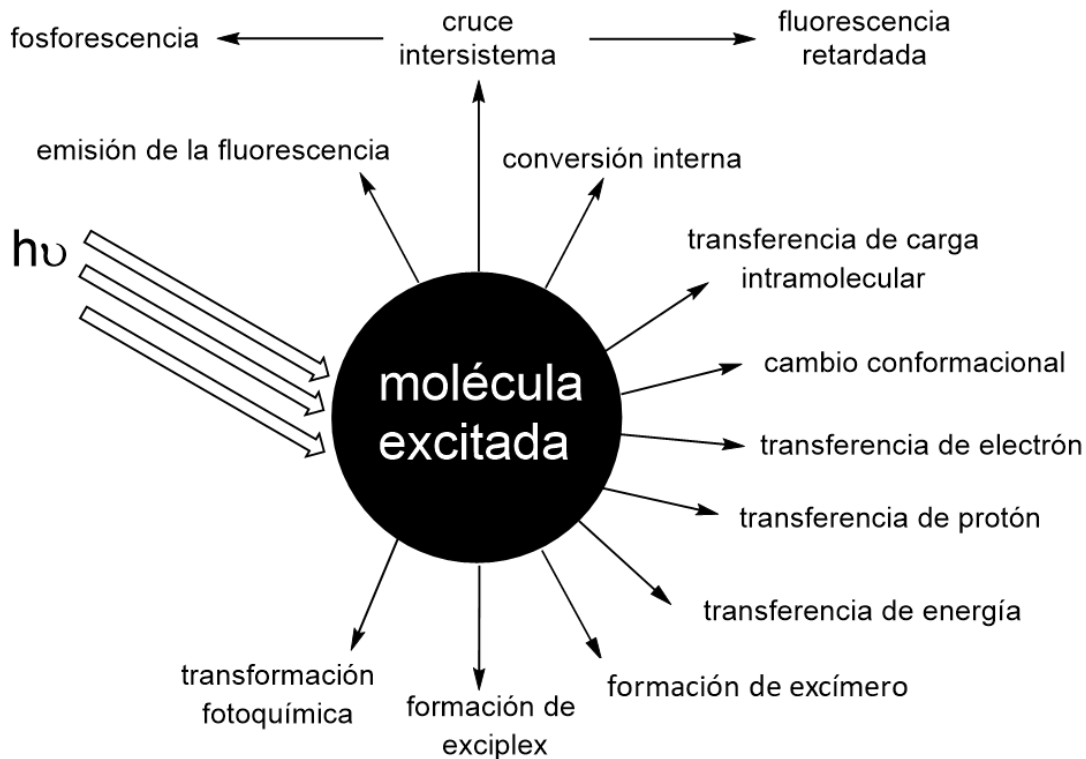


Figura 2. Posibles formas de desexcitación de moléculas excitadas.

Las interacciones en el estado excitado con otras moléculas pueden además competir con la transferencia de electrón, transferencia de protón o transferencia de energía, por mencionar algunas.

Estas formas de desexcitación pueden competir con la emisión de la fluorescencia si tienen lugar en una escala de tiempo comparable con el tiempo promedio (vida útil), durante el cual las moléculas permanecen en el estado excitado. Debe resaltarse que algunos procesos del estado excitado (cambio conformacional, transferencia de electrón, transferencia de protón, transferencia de energía, formación de excímero y exciplex) pueden conducir a otras especies fluorescentes cuya emisión puede superponerse a la de la molécula inicialmente excitada. Dicha emisión debe distinguirse de la fluorescencia “primaria” que surge de la molécula excitada.

Una ventaja de la fluorescencia como herramienta de investigación para estudiar la estructura y la dinámica de la materia o sistemas vivos, es su alta sensibilidad, la especificidad de las características de la fluorescencia debido al microambiente de la molécula que emite y la capacidad de ésta última para proporcionar información espacial y temporal. Los parámetros que afectan las características de fluorescencia de una molécula se muestran en la figura 3.²

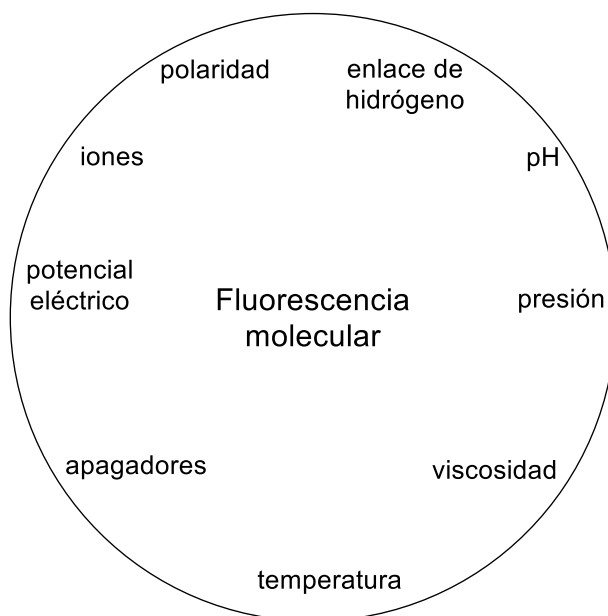


Figura 3. Distintos parámetros que influyen en la emisión de la fluorescencia.

1.2 Transferencia intramolecular de protón en el estado excitado (ESIPT)

La característica óptica más importante de las moléculas estudiadas como receptores en este trabajo es la transferencia intramolecular de protón en el estado excitado (ESIPT). En general, las moléculas pueden exhibir fluorescencia de tipo ESIPT si sus estructuras incorporan una interacción de tipo puente de hidrógeno entre un donador de puente de hidrógeno (grupos -OH y -NH₂) y un aceptor de puente de hidrógeno (grupos =N- y C=O). Algunos ejemplos representativos de fluoróforos que presentan ESIPT se muestran en la figura 4.

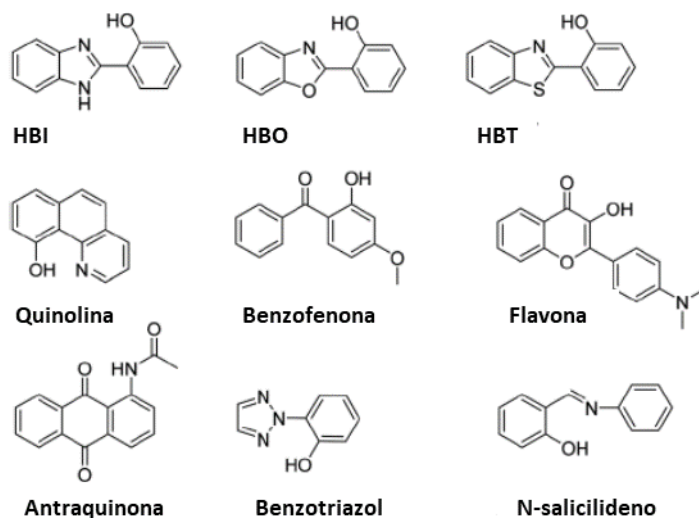


Figura 4. Ejemplos de fluoróforos que presentan fluorescencia ESIPT

ESIPT es un proceso fotoquímico único, con un estado electrónico fundamental que típicamente existe en forma enol (E) (figura 5). Tras la fotoexcitación, la carga electrónica de dichas moléculas se redistribuye, resultando en una mayor acidez para el grupo donador de puente de hidrógeno y un aumento de la basicidad para el grupo aceptor de puente de hidrógeno dentro de la forma E. Como resultado, ocurre una rápida fototautomerización ($k_{\text{ESIPT}} > 10^{12} \text{ s}^{-1}$) de la forma enol a la forma ceto (K), con la forma enol (E^*) en el estado excitado convirtiéndose rápidamente a la forma ceto (K^*) en el estado excitado. Posterior al decaimiento radiativo a su estado electrónico fundamental, sucede una transferencia de protón inversa (RPT por sus siglas en inglés, reverse protón transfer), para producir la forma E original (figura 5).³

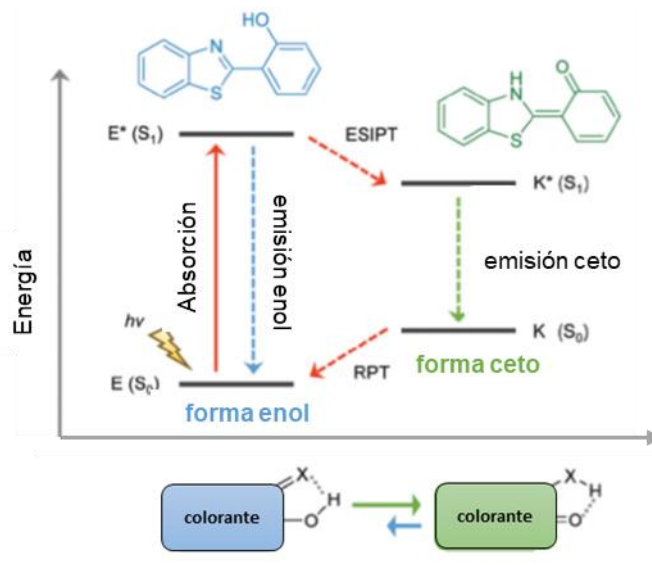


Figura 5. Tautomería ceto-enol del 2-(2-hidroxifenil)benzotiazol en el estado electrónico fundamental y el estado electrónico excitado³

Los sensores fluorescentes que presentan ES IPT, son muy atractivos por sus propiedades coordinantes debido a la presencia de grupos donadores y los grandes desplazamientos de Stokes.⁴ Estudios recientes demuestran que es una aproximación efectiva para realizar reconocimiento de tipo ratiométrica a través de la modulación del proceso ES IPT.⁵

2 Antecedentes

El diseño de sensores fluorescentes es de gran importancia debido a su alta demanda en química analítica, bioquímica clínica, medicina, medio ambiente, etc. Existe una gran variedad de sensores moleculares fluorescentes para aplicaciones particulares y muchos de ellos están disponibles comercialmente, sin embargo, siempre existe la necesidad de sensores con una mejor selectividad y una mínima perturbación del ambiente. En este trabajo se estudió la detección fluorescente de dos tipos de analitos: polioles y algunos iones metálicos, de transición entre otros.

Entre polioles, la detección de azúcares y otros carbohidratos es importante debido a que están involucrados en varios procesos biológicos, ya que los carbohidratos

son transportadores de energía en la naturaleza y son esenciales para la supervivencia celular;⁶ por ejemplo, se encuentran en rutas metabólicas de organismos vivos, además como producto de la fotosíntesis. Los carbohidratos representan la clase más prolífica de compuestos orgánicos que se pueden encontrar en la superficie de la tierra. Así mismo, la afectación del transporte de glucosa se ha correlacionado con ciertas enfermedades como la glucosuria renal,⁷ fibrosis quística⁸ y diabetes.⁹

La detección de cationes metálicos es de gran interés para muchos científicos, ya que metales como sodio, potasio, magnesio y calcio están involucrados en procesos biológicos, como en la transmisión de impulsos nerviosos, contracción muscular, regulación de la actividad en células, etc. Además, varios iones metálicos pertenecen a metaloenzimas. Asimismo, la toxicidad del aluminio ha sido estudiada durante mucho tiempo y existe controversia sobre su posible implicación en la enfermedad de Alzheimer.¹⁰ En oceanografía, se ha demostrado que algunos nutrientes requeridos para la supervivencia de microorganismos en el mar, contienen zinc, hierro, y manganeso como cofactores enzimáticos. Es bien conocido que el mercurio, plomo y cadmio son tóxicos para organismos y su detección temprana en el ambiente es deseable. Por otro lado, se sabe que, los compuestos de organoestaño son altamente contaminantes en ecosistemas marinos y de agua dulce,¹¹ provocando malformaciones en ostras por mencionar un ejemplo.¹²

El Zn(II), como el segundo metal de transición más abundante en el cuerpo humano, juega un rol fundamental en una variedad de procesos biológicos incluyendo la transcripción de genes, transmisión de señales y reproducción de mamíferos.¹³ Algunos de los primeros estudios probaron que la interrupción de la concentración de Zn(II) en las células puede resultar en varios procesos patológicos como la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia y la diarrea infantil.¹⁴

2.1 Sensores moleculares fluorescentes

Una de las desventajas de la fluorimetría es la fuerte dependencia de la intensidad de la señal de los parámetros instrumentales y la posible fotodegradación del fluoróforo, lo que conlleva grandes limitaciones en la aplicación práctica de éste método. Estos problemas son mayormente eliminados usando la técnica *ratiometric*, en la cual, en lugar de la intensidad de la fluorescencia absoluta, se mide la relación de las señales a dos longitudes de onda distintas, lo cual elimina la necesidad de tener la concentración exacta del receptor utilizada para la curva de calibración. El método ratiométrico es especialmente importante para muestras biológicas, por ejemplo, para el monitoreo intracelular de analitos cuando la concentración exacta del sensor es desconocida y el sensor podría estar involucrado en otro tipo de interacciones, las cuales podrían afectar la intensidad de la fluorescencia.¹⁵

Existen distintos diseños de sensores moleculares fluorescentes, los cuales pueden clasificarse en cuatro:

Tipo 1. Fluoróforos que conllevan a la extinción de la fluorescencia tras una colisión con un analito. Este método se emplea, por ejemplo, para la detección de cloruro en medios biológicos con alquilquinolinios como receptores.¹⁶

Tipo 2. Fluoróforos que pueden unirse de manera reversible directamente con un analito. Si el analito es un protón, el término indicador de pH fluorescente por lo general es usado. Si el analito es un ion metálico, el término apropiado es agente quelante fluorescente. La fluorescencia puede extinguirse (tipo EAQ: extinción por el aumento de la quelatación), o crecer por la asociación (tipo AFQ: aumento de la fluorescencia por quelatación).

Tipo 3. Fluoróforos unidos a un receptor (figura 6), con frecuencia mediante un espaciador. El diseño de dichos sensores, los cuales están basados en el reconocimiento de moléculas o iones por un receptor, requiere especial cuidado para cumplir con los criterios de afinidad y selectividad. Los cambios en las propiedades fotofísicas del fluoróforo tras la interacción con el analito unido, son debido a la perturbación por parte de los procesos fotoinducidos, como la

transferencia de electrón, la transferencia de carga, la transferencia de energía, la formación o desaparición de un excímero o exciplex. De igual manera la fluorescencia puede extinguirse o aumentar (EAQ o AFQ)

Tipo AFQ:

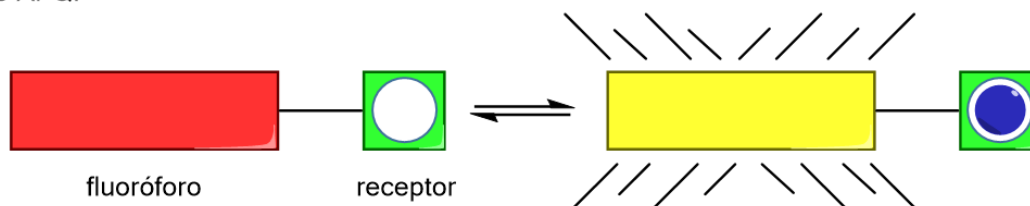


Figura 6. Sensor molecular fluorescente de tipo 3, fluoróforo unido a una cavidad receptora.

Tipo 4. El método del desplazamiento de indicador (Indicator displacement assay (IDA)).

En un IDA, primero se permite que un indicador (ya sea un cromóforo o fluoróforo), se enlace de manera reversible a un receptor. Después, un analito que compita con éste se introduce en el sistema causando un desplazamiento del indicador desde anfitrión, que a su vez modula una señal óptica (figura 7).¹⁷

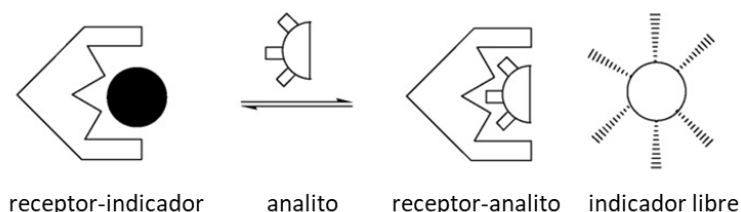


Figura 7. Esquema del modelo de desplazamiento de indicador¹⁷

2.1.1 Sensores tipo PET

Los sensores fluorescentes de tipo PET (por sus siglas en inglés, *photoinduced electron transfer*, transferencia de electrones fotoinducida), consisten en un fluoróforo unido a –por ejemplo- a una amina vía un metileno como espaciador. La transferencia de electrones fotoinducida, la cual se lleva a cabo en los grupos amino de los hidrocarburos aromáticos, provoca la extinción de la fluorescencia de éste último. Cuando el grupo amino es protonado (o interacciona fuertemente con un

cación), la transferencia de electrón es impedida y se observa un gran aumento de la fluorescencia (figura 8b). En la figura 8a se ilustra el mecanismo en términos de orbitales moleculares. Tras la excitación de un fluoróforo, un electrón del orbital HOMO es promovido al orbital LUMO, el cual habilita la PET del orbital HOMO del donador a la del fluoróforo, causando una extinción de la fluorescencia de éste último. Tras la protonación (o la unión con un catión), el potencial redox del donador se eleva de modo que el orbital HOMO baja su energía más que la del fluoróforo, por consecuencia, la PET ya no es posible y se suprime la extinción de la fluorescencia.

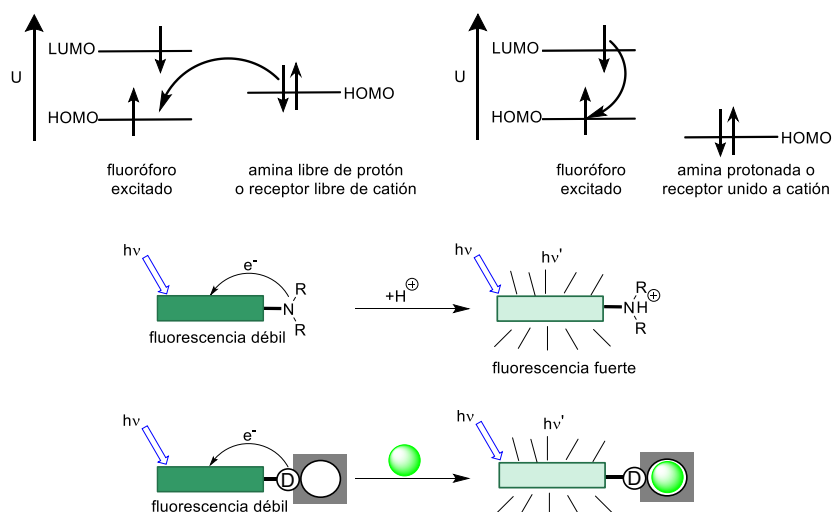


Figura 8. Mecanismo de sensor por transferencia de electrones fotoinducida (PET)

2.2 Detección de moléculas neutras

El reconocimiento de moléculas orgánicas neutras en disolución representa un mayor reto que el reconocimiento de especies iónicas, debido a que involucran interacciones (interacciones de van der Waals, puente de hidrógeno, etc.) que son más débiles que aquellas que existen en las especies cargadas, y los cambios electrónicos por complejación son menores. Los sacáridos son de particular interés, ya que juegan un papel importante en las rutas metabólicas de los organismos vivos. Es necesario detectar la presencia y medir la concentración de azúcares biológicamente importantes (glucosa, fructosa, galactosa, etc.) en disolución

acuosa. Las estructuras de sacáridos típicos se presentan en la figura 9, algunos de los cuales son objetos de estudio en este trabajo.

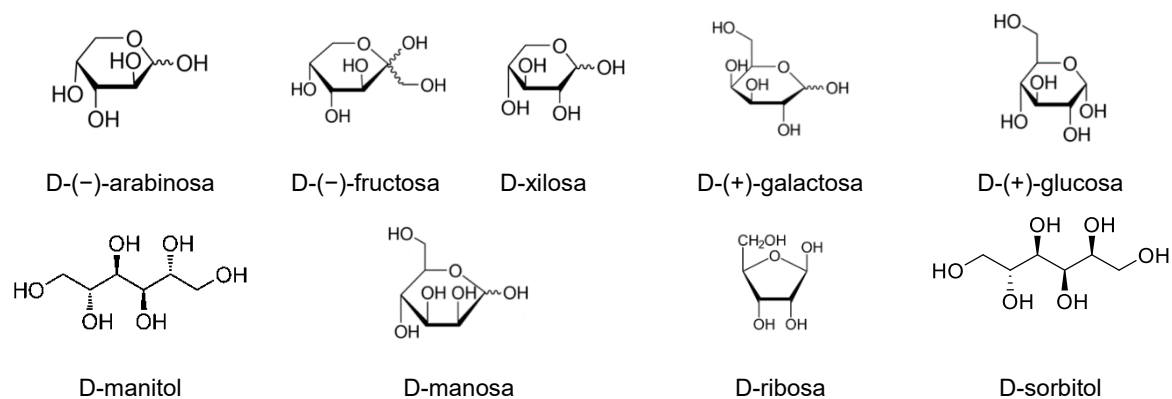


Figura 9. Estructuras de algunos sacáridos

El método empleado en este trabajo para la detección de sacáridos y otros polioles, está basado en la formación de sus ésteres cíclicos con el ácido fenilborónico¹⁸ (figura 10). La ventaja principal de este enfoque es el uso de interacciones covalentes las cuales presentan mayor afinidad y selectividad que interacciones no-covalentes, pero al igual que las interacciones no-covalentes son rápidas y reversibles. En la figura 10 (la cual considera 1,2-diol pero también se puede aplicar para 1,3-diol), se puede definir la constante de formación del complejo tetraédrico aniónico diol-boronato, como K_{tet} y la constante de formación del complejo trigonal diol-ácido borónico como K_{trig} , donde se observa que $K_{tet} > K_{trig}$ (en ésteres cíclicos de 5 miembros con 1,2 dioles, ésta relación es válida, debido a que el ángulo O-B-O en el ácido borónico es de 120° pero en el ciclo debe ser reducido a aproximadamente 110° y este debe crear una tensión en el éster trigonal donde el boro es todavía sp^2 , mientras que en el éster tetraédrico el boro es sp^3 y el ángulo es 109.5° por lo que la tensión es menor). Por ésta razón la afinidad del ácido fenilborónico ($pK_a = 8.9$) hacia polioles depende del pH aumentando en disoluciones básicas.

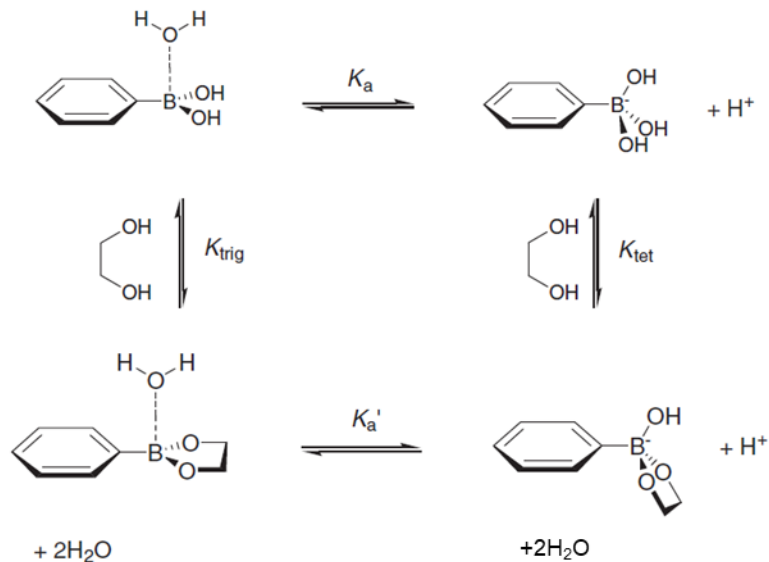


Figura 10. El diol representa un fragmento *cis*-1,2-diol de azúcar o cualquier di- o poliol¹⁸

La máxima afinidad de un poliol se observa cuando los grupos *cis*-OH están en la conformación periplanar. La mayor fracción de esta conformación la tiene la fructosa que se encuentra principalmente en la forma de furanosa y por ello forma el éster más estable. Al otro extremo está la glucosa que principalmente está en forma de piranosa con un ángulo diedro más grande entre los grupos OH, por lo que su éster es poco estable. Otros polioles en la figura 9 ocupan posiciones intermedias. Adicionalmente la figura 11 muestra las fracciones de la forma furanosa con la que interactúa el ácido fenilborónico. Como se ve la K observada con el ácido fenilborónico es proporcional a la fracción de la forma furanosa.¹⁹

Las proporciones de las especies más abundantes y reactivas de varios monosacáridos disueltos en agua, y las constantes de unión correspondientes entre ac. fenilborónico y monosacáridos

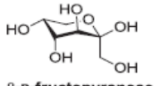
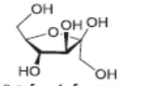
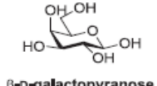
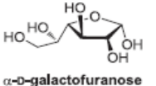
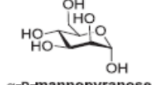
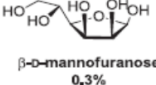
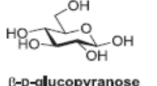
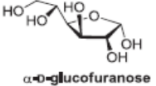
Sacárido	Configuración	Constante de unión K
Fructosa	 β -D-fructopyranose 61%	4370 M^{-1}
	 β -D-fructofuranose 25%	
Galactosa	 β -D-galactopyranose 64%	276 M^{-1}
	 α -D-galactofuranose 2.5%	
Manosa	 α -D-mannopyranose 65.5%	172 M^{-1}
	 β -D-mannofuranose 0.3%	
Glucosa	 β -D-glucopyranose 65%	110 M^{-1}
	 α -D-glucofuranose 0.14%	

Figura 11. Fracciones de la forma furanosa con la que tiene interacción el AFB

En esta área se usan más frecuente receptores basados en IDA, el ejemplo más conocido es el reportado por B. Wang y colaboradores, el cual consiste en el uso del colorante alizarina roja S (ARS, **1**) que se compleja con un ácido borónico (**2**) produciendo un gran aumento en la intensidad de la fluorescencia; posteriormente, al adicionar un *cis*-diol (**3**) se compleja con el ácido borónico (el ácido fenilborónico tiene muy baja fluorescencia por si solo) dando lugar a un complejo tetraédrico (**4**), desplazando así el ARS por competencia con éste (figura 12) ²⁰

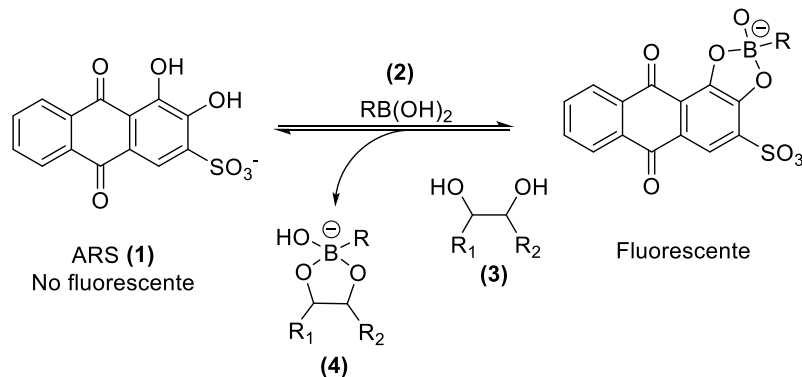


Figura 12. Competencia entre la complejación de un ácido borónico con ARS y un *cis*-diol^{20,54}

2.3 Síntesis, propiedades ópticas y de ácido-base de 3-hidroxiquinolonas y 2-(2'-hidroxifenil)-benzimidazol

Las 3-hidroxiquinolonas y el 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol (productos finales de los esquemas 1 y 2, respectivamente) ambos son compuestos con propiedades ESIPT que fueron elegidos como objetos principales de éste estudio. Además de sus importantes propiedades ópticas y de coordinación son interesantes por sus propiedades medicinales. Por otra parte, los compuestos de tipo quinolona (naturales y sintéticos), poseen importantes propiedades biológicas, incluyendo actividades antimicrobianas y anticancerígenas.²¹ Las hidroxiquinolonas poseen características químicas atractivas, al ser análogos de los flavonoides muestran la transferencia de protón intramolecular en el estado excitado (ESIPT) así como un comportamiento de fluorescencia dual.²²

Los derivados de benzimidazol sustituidos han encontrado aplicaciones comerciales en medicina veterinaria como agentes antihelmínticos (desparasitantes), y como agentes antiterapéuticos para humanos tales como antiúlceras,²³ antihipertensores,²⁴ antivirales²⁵ y antihistamínicos solo por nombrar algunos. Además, los medicamentos que son capaces de marcar ADN son de gran interés debido a su potencial uso en quimioterapia, en este sentido, algunos de los derivados tanto sintéticos como naturales que contienen benzimidazol dentro de su estructura, son conocidos como potentes agentes anticancerígenos (figura 13), y su actividad está relacionada con su propiedad de interacción con la doble hélice del ADN.²⁶

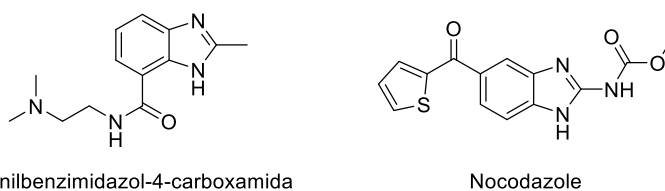
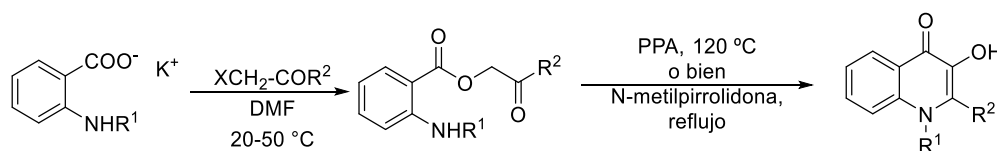


Figura 13. Estructuras de dos agentes anticancerígenos que contienen el fragmento benzimidazol.

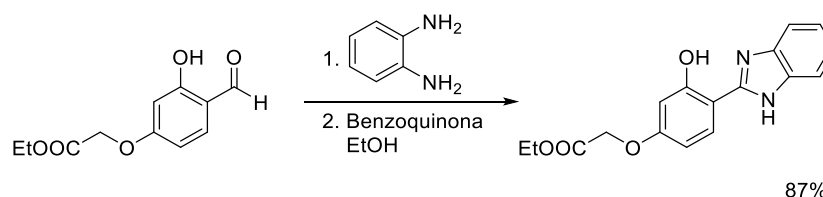
2.3.1 Síntesis química

Se han estudiado las hidroxiflavonas durante muchos años debido a sus buenas propiedades quelantes con metales, un análogo de éstas son las hidroxiquinolinonas, las cuales han sido menos investigadas debido a que son colorantes relativamente nuevos, además de que tienen vías sintéticas más complejas. En este sentido, un paso muy importante fue el desarrollo de una ruta de síntesis relativamente sencilla que permitiera obtener los derivados de una estructura variable a partir de ácidos antranílicos, en acuerdo con el esquema general 1, donde X=Cl, Br.²⁷ La primera etapa es la formación de la chalcona mediante la sustitución nucleofílica del halógeno de la bromoacetofenona, en la segunda etapa se usan condiciones de reflujo con N-metilpirrolidona o bien, se realiza la condensación del éster intermediario con ácido polifosfórico.



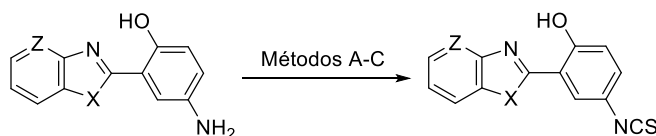
Esquema 1. Ruta general de síntesis para la obtención de hidroxiquinolinonas²⁷

Existen dentro de la literatura distintos métodos de síntesis para los derivados de benzimidazol, por mencionar algunos, el de Henary et al.,²⁸ quienes a partir de un salicilaldehído funcionalizado y o-fenilendiamina, obtienen un derivado de benzimidazol útil para la detección de cationes (esquema 2). Si en lugar de salicilaldehído se emplea el ácido salicílico, la reacción no requiere el oxidante (benzoquinona). Además, recientemente Kamal et al.²⁶ ha reportado la síntesis de derivados de benzimidazol mediante la funcionalización con OH de un enlace inerte C-H con un catalizador de paladio, capaces de marcar ADN.



Esquema 2. Método de síntesis para la obtención de un derivado de benzimidazol funcionalizado²⁸

Por otro lado, se han reportado distintos métodos para la síntesis de ureas y tioureas con sustituyentes benzimidazolilo, los más utilizados parten de isocianatos e isotiocianatos –según sea el caso- como precursores. En este sentido, Holler y colaboradores propusieron distintas rutas para la formación de isocianato/isotiocianato, partiendo de la amina correspondiente, los cuales obtuvieron a partir de tres rutas distintas, la primera es a partir de disulfuro de carbono y Et₃N e incluye 7 días de reacción a baja temperatura, la segunda es conocida como la síntesis de Jochims, que incluye dicitclohexilcarbodiimida (DCC) a baja temperatura y el tiempo de reacción disminuye a 24 h, la última ruta es a partir de tiofosgénico. Los productos finales fueron propuestos como sondas fluorescentes para proteínas (esquema 3).²⁹

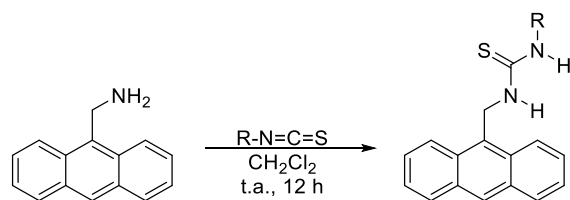


Método A (síntesis de Kaluza): i) CS₂, Et₃N, -18°C, 7 días, ii) CHCl₃, ClCO₂Et, Et₃N, 0°C, 1h.
 Método B (síntesis de Jochims): iii) DCC, CS₂, -18°C, 24 h.
 Método C (síntesis de tiofosgénico): iv) CH₃COCH₃, CSCI₂, r.t., 2h.

Esquema 3. Síntesis de isotiocianatoS por los métodos Kaluza (método A), Jochims (método B) y tiofosgénico (método C)²⁹

Wu y colaboradores reportaron con anterioridad la síntesis de un derivado del benzoxazol, el cual es un conocido análogo del benzimidazol, como sensor que puede detectar aniones tales como F⁻, CH₃COO⁻ y H₂PO₄⁻, esto mediante la modulación de la acidez de los donadores de protones y la inhibición del ES IPT mediante la complejación con aniones; sin embargo, no presentó buena sensibilidad.³⁰

En el caso particular de las ureas y tioureas, se reportó el uso de tioureas como sensores tipo PET para la detección de los aniones F⁻, CH₃COO⁻ y H₂PO₄⁻, mediante la formación de puente de hidrógeno con los NH de dichas tioureas, las cuales fueron sintetizadas a partir de aminometil-antraceno y los derivados de isotiocianato correspondientes bajo condiciones suaves de reacción (esquema 4).³¹



Esquema 4. Síntesis de tiourea como sensor fluorescente tipo PET para la detección de aniones³¹

2.3.2 Propiedades ópticas de los compuestos estudiados

Los procesos de transferencia fotoinducida de protón y electrón son desencadenados por el cambio de propiedades redox y ácido-base de las moléculas tras la excitación electrónica. Las moléculas con fragmentos con la capacidad tanto de aceptar como donar electrones, usualmente conllevan a la transferencia de electrón intramolecular fotoinducida en el estado excitado, lo cual tiene aplicación en sensores luminiscentes, entre otros.³²

Las 2-aryl-3-hidroxiquinolonas fueron propuestas como fluoróforos de emisión dual para pruebas ópticas de la polaridad y basicidad del medio.³³ La emisión dual fue atribuida al ESIPT en acuerdo con la figura 13, donde las estructuras marcadas con símbolos N y T corresponden a E y K en el caso de hidroxibenzotiazol (ver figura 5). En este caso, en el estado fundamental la forma más estable es la forma ceto (K) la cual es considerada por los autores como “normal” (N) y la forma menos estable es enólica (E) a la que los autores llaman “tautomérica” (T). A la forma normal excitada N* le asignan la estructura zwitterionica, que no está justificada, mientras que las formas T y T* tienen que ser zwitteriones porque no existen estructuras resonantes que permitan anular las cargas después de la transferencia de protón.

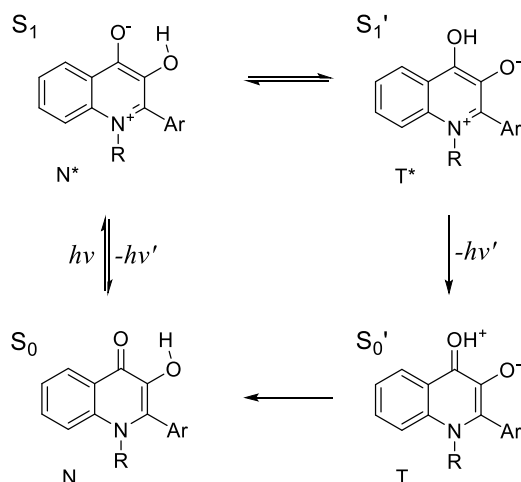


Figura 13. Formas normal y tautomérica de la 2-fenil-3-hidroxi-quinolona en el estado fundamental y en el estado excitado (donde N y T corresponden al estado basal y N* y T* al estado excitado)⁴⁸

Lo espectros de emisión de los compuestos **3** y **4** empleados en nuestro estudio en diferentes disolventes se presentan en la figura 14.

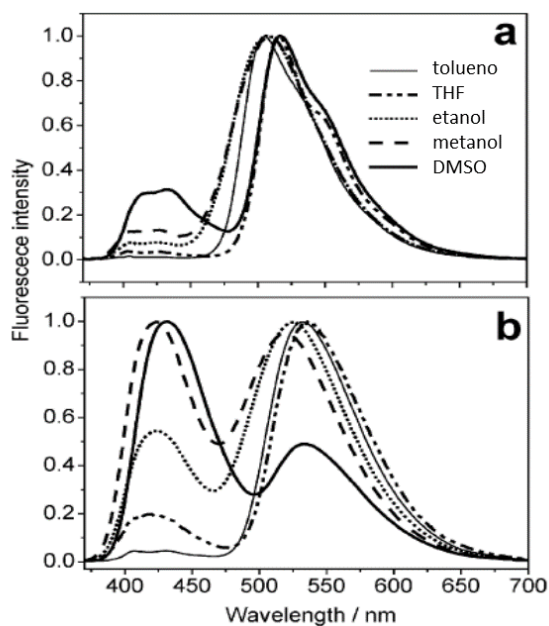


Figura 14. Espectros de emisión normalizados de las 2-aryl-3-hidroxiquinolonas **3** (a) y **4** (b) en diferentes disolventes⁴⁸

La emisión de baja energía con el máximo alrededor de 540 nm pertenece a la forma T* más estable en el estado excitado y la emisión con el máximo alrededor de 420 nm de mayor energía pertenece a la forma N*. Los disolventes polares impiden la

transferencia de protón intramolecular y así favorecen la forma N* mientras que en disolventes como tolueno se observa principalmente la emisión de la forma T* (figura 13). El máximo de absorción de la luz por 2-aril-3-hidroxiquinolonas se ubica alrededor de 350 nm y es poco sensible al disolvente.

Los 2-(2'-hidroxifenil)benzazoles son moléculas fluorescentes interesantes, las cuales presentan grandes desplazamientos de Stokes y tienen buena estabilidad fotofísica y térmica debido al mecanismo de transferencia de protón intramolecular en el estado excitado. Éstos compuestos han sido estudiados mucho más ampliamente que las hidroxiquinolonas,³⁴ (en particular teóricamente³⁵) como estabilizadores de polímeros frente a la luz UV, materiales ópticos no lineales³⁶ (NLO, por sus siglas en inglés) y han sido incorporados a materiales poliméricos orgánicos e inorgánicos con la finalidad de incrementar la eficiencia láser y la fotoestabilidad de dichos materiales, como alternativa a los láser de colorantes líquidos, lo cual es una ventaja desde el punto de vista económico.³⁷

Tal como los derivados de hidroxiquinolonas, el hidroxifenilbenzimidazol es una molécula que exhibe ESIPT en la escala de tiempo por debajo de los picosegundos, y ha sido estudiado en diferentes disolventes, así como en medios restringidos (complejos de inclusión).^{38,39} En el estado fundamental, la forma más estable de esta molécula es la forma enol (E), la cual presenta un grupo fenol ácido y un átomo de nitrógeno básico, y esta forma puede además adoptar las configuraciones tanto *cis* como *trans* (ver figura 5). En el primer estado excitado singlete, la redistribución de la carga electrónica conlleva un aumento en la acidez del grupo hidroxilo y la basicidad del fragmento benzimidazol, causando que el ESIPT tenga lugar entre los dos grupos que están conectados por un puente de hidrógeno preexistente (*cis-enol**).³⁹

Comparando con las 3-hidroxiquinolonas, el 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol absorbe y emite luz a longitudes de onda más cortas: el máximo de absorción es a 314 nm y el de emisión 430-450 nm (*forma ceto*) y 370-390 nm (*forma enólica*).

2.3.3 Propiedades ácido-base y de coordinación de la 2-fenil-3-hidroxi-quinolona y el 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol

Las figuras 15 y 16 presentan los procesos de disociación ácida para ambos fluoróforos (2-fenil-3-hidroxi-quinolona y el 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol) y la tabla 2 presenta las constantes de acidez correspondientes. Ésta información será de gran ayuda para interpretar las interacciones de los ligandos con metales y ácido fenilborónico en disolución.

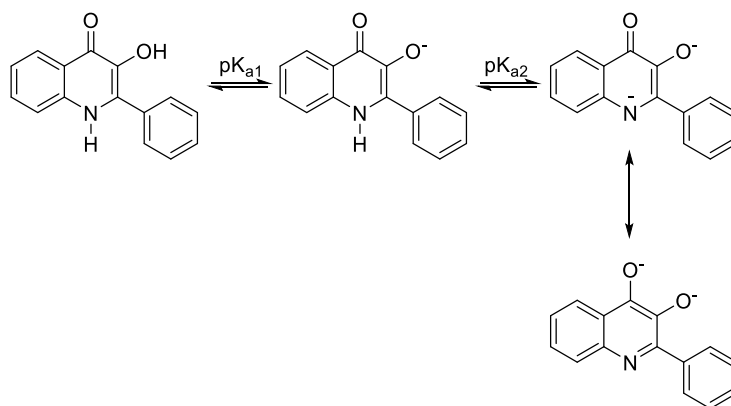


Figura 15. Equilibrio de disociación ácida para la 2-fenil-3-hidroxi-4-quinolona

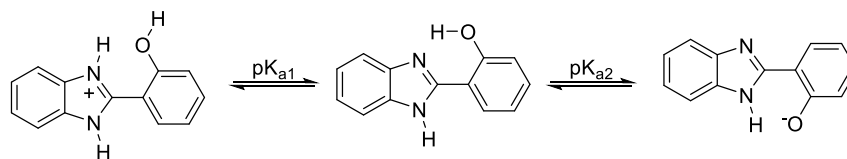


Figura 16. Equilibrio de disociación ácida para el 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol

Tabla 2. Constantes de acidez de las quinolonas 3 y 4 y del 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol en medios acuosos^{39,47}

	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}^*	pK_{a2}^*
1-metil-2-fenil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona (4)	9.8 ^{a)}			
2-fenil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona (3)	10.2			
2-fenil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona (3)	9.1 ^{a)}	10.4 ^{a)}		
2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol	5.4	8.7	6.8	2.2

^{a)} En presencia de 5 mM HTAB
(Los errores reportados varían entre ± 0.1 y ± 0.05)

En el caso de la 3-hidroxiquinolona N-metilada **4** se observa sólo un proceso de disociación ácida del grupo fenólico; sin embargo, en el caso de **3** es posible además la disociación del grupo NH. Este último se observa solo en presencia del tensoactivo catiónico HTAB que facilita la disociación por su carga positiva bajando el valor del pK_{a1} e induciendo la segunda disociación (compare las dos primeras líneas en la tabla 2).^{39,47}

En el caso de 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol, el primer pK_a corresponde a la disociación del nitrógeno protonado y el segundo pK_a corresponde a la disociación del grupo fenólico al igual con hidroxiquinolona.⁴⁰ De los valores de pK_a es obvio que en una disolución neutra a pH 7 ambos fluoróforos se encuentran en la forma neutra.

Para 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol además hay estimaciones de los valores de pK_a^* en el estado excitado (tabla 2, dos últimas columnas).³⁹ Dentro de estos valores destaca la disminución de pK_a del grupo fenólico en estado excitado por 6.5 unidades logarítmicas. Las moléculas que incrementan su acidez en el estado excitado se conocen como fotoácidos, ya que tienden a ser desprotonadas tras la excitación en disolventes capaces de aceptar un protón o en presencia de especies básicas. Si una molécula tiene un grupo ácido y un grupo básico unidos por un puente de hidrógeno en el estado basal, puede ocurrir una rápida transferencia de protón en el estado excitado (ESIPT), del sitio ácido al básico.

La complejación de ambos fluoróforos con iones metálicos es conocida, aunque no hay datos detallados respecto a la estabilidad y composición de las especies en disolución. Por otro lado, hay reportes de estructuras cristalinas de algunos complejos metálicos que permiten observar el modo de coordinación con ambos tipos de ligante (figura 17).^{41, 42, 43}

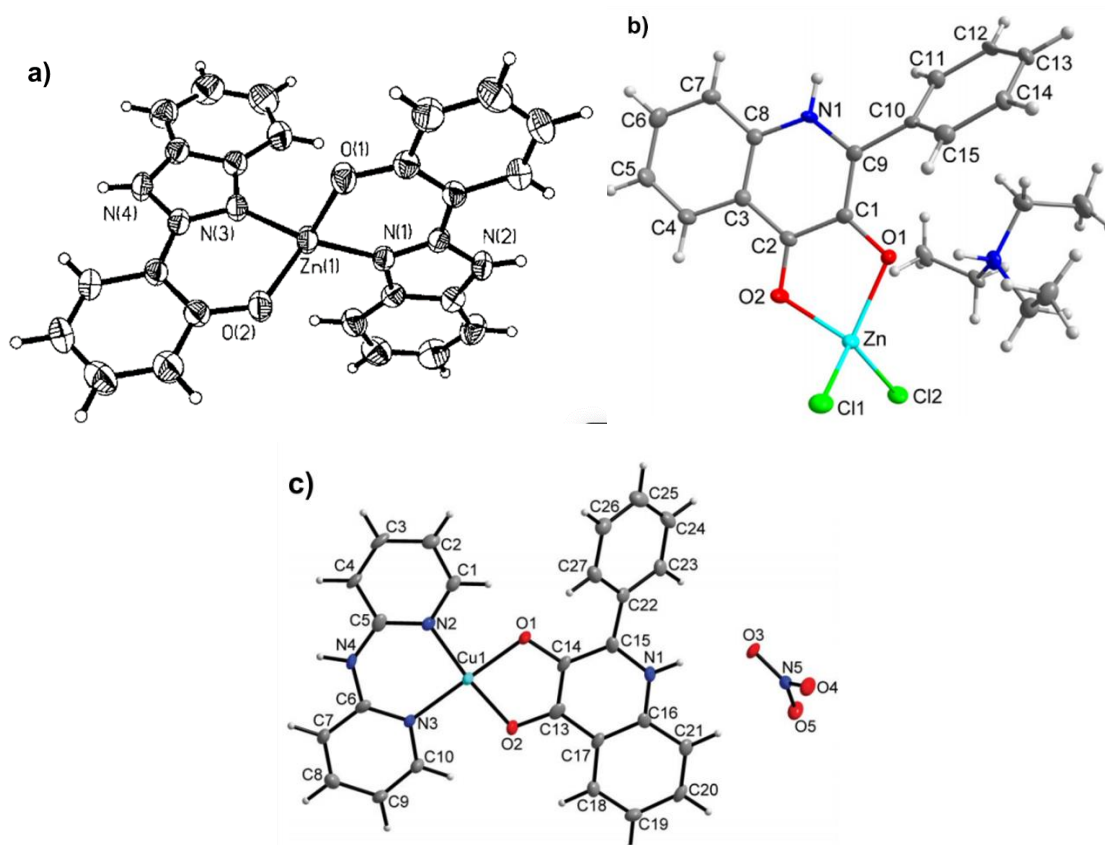


Figura 17. (a) ORTEP (con un nivel de 50% de probabilidad) del complejo $[Zn(pbm)_2]$ (Hpbm=2-(2-hidroxifenil)benzimidazol)⁴¹ (b) Estructura molecular del complejo $(Et_3NH)[Zn(qui)Cl_2]$ con esquema de numeración de átomo. Los átomos no-H están descritos como elipsoides térmicos con un nivel de probabilidad de 50% (donde Hqui= 2-fenil-3-hidroxi-4(1H)-quinolinona)⁴² (c) Estructura molecular del complejo $[Cu(qui)(ambpy)]NO_3$ con el esquema de numeración de átomos. Los átomos no-H están descritos como elipsoides térmicos con un nivel de probabilidad de 50%. (Hqui=2-fenil-3-hidroxi-4(1H)-quinolinona, ambpy= bis(2-piridil)amina)⁴³

Como se esperaba, la coordinación ocurre mediante quelatación con grupos fenólico y el nitrógeno del benzimidazol en 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol y con los grupos 3-OH y 4-carbonilo en la 3-hidroxiquinolona. La estabilidad de los complejos metálicos observada a pH 7 es un poco mayor para 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol, por ejemplo con Zn(II) $\log K_{ML}^{obs} = 4.32$ y 3.76 para 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol y el compuesto **3**, respectivamente.^{28,47} Sin embargo, hay que tomar en cuenta el mayor pK_a de **3** (Tabla 2) de tal manera que las constantes calculadas para la complejación con las formas desprotonadas de cada ligante empleando la ecuación (1) (ver sección 8.2, anexo I) derivado para el caso cuando $pH < pK_a^{HL}$, son $\log K_{ML}$

= 6.02 y 6.96 respectivamente. La mayor estabilidad del complejo con **3** puede ser relacionada con la formación del típicamente más estable ciclo de 5 miembros.

$$\log K_{ML} = \log K_{obs} + pK_a^{HL} - pH \quad (1)$$

Donde:

ML= complejo metal ligante 1:1

HL= ligante protonado

Se toma el pH al que fue determinada la K_{obs}

3 Hipótesis

Las 3-hidroxiquinolonas (las cuales son análogos estructurales de las 3-hidroxi-flavonas) debido a que poseen propiedades de tipo ESIPT, pueden funcionar como mejores sensores fluorescentes para cationes metálicos que las hidroxiflavonas esto gracias a que tienen mayor afinidad a los cationes por la presencia del átomo donador de nitrógeno en su estructura. En el caso de que las 3-hidroxiquinolonas muestren la capacidad de formar complejos con ácidos borónicos (los cuales no se forman con hidroxiflavonas), esto podría ser aprovechado para el desarrollo de un nuevo sensor para la detección de carbohidratos.

La incorporación de grupos funcionales como (tio)ureas (conocidos por su capacidad para reconocer especies aniónicas) en 3-hidroxiquinolonas u otros ligantes con ESIPT, por ejemplo, 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol, permitirá obtener receptores bifuncionales capaces detectar tanto cationes metálicos como aniones.

4 Objetivos

Objetivo general

Caracterizar cuantitativamente las propiedades ópticas, de acidez y de coordinación, de las 3-hidroxiquinolonas como ligantes para ácidos borónicos y cationes metálicos de diferentes tipos, esto combinado con la modificación de su fluorescencia por interacción con dichos ácidos de Lewis con el propósito de emplearlos como receptores y sensores ópticos para iones metálicos y polioles aprovechando sus propiedades ESIPT. Diseñar receptores bifuncionales y realizar estudios preliminares para su interacción con especies catiónicas y aniónicas con moléculas con ESIPT como base.

Objetivos particulares

- Se sintetizarán, evaluarán y estudiarán, los derivados de 3-hidroxi-4-quinolinona para su aplicación como nuevos sensores ópticos posiblemente ratiométricos para detección de metales [Al(III), Cu(II), Zn(II), Fe(III)],

organoestaño] y polioles (en particular azúcares) de importancia para el monitoreo de cationes de diferentes tipos en medios acuosos y azúcares en alimentos.

- Se explorará la composición, la estabilidad y las propiedades fluorescentes de complejos metálicos con 3-hidroxi-4-quinolinona N-metilada en medio acuoso con el propósito de establecer la naturaleza de cambios en la fluorescencia inducida por complejación y las tendencias generales en la selectividad de complejación con este tipo de ligantes.
- Se sintetizarán y explorarán nuevos receptores bifuncionales derivados de la 3-hidroxiquinolona y el 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol, los cuales combinan fragmentos de (tio)urea capaces de reconocer aniones y ligantes con propiedades ópticas ESIPT para la detección simultánea de especies catiónicas y aniónicas en disolventes polares apróticos

5 Resultados y discusión

En una publicación reciente, los compuestos fluorescentes que poseen propiedades tales como transferencia interna de carga (ICT), transferencia intramolecular de protón en el estado excitado (ESIPT), transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), energía de transferencia a través de enlace (TBET) y la formación de monómero-excímero, fueron identificados como los más útiles para el desarrollo de sensores ratiométricos.⁶

Uno de los fluoróforos que presenta ESIPT y se usa frecuentemente para el diseño de diferentes sensores ópticos es el flavonol **1**.⁴⁴ La complejación del flavonol con varios cationes en particular con Al(III), Zn(II) y Fe(III) ha sido ampliamente estudiada.⁴⁵ Típicamente la unión de metales por flavonol involucra la quelación con grupos 3-hidroxi desprotonado y 4-carbonilo como se ilustra en la estructura **2**. Sin embargo, la estabilidad de complejos metálicos de flavonol en medios acuosos es muy baja. De hecho todas las constantes de estabilidad con flavonol como ligante reportadas hasta la fecha fueron determinadas en disolventes orgánicos.⁴⁶

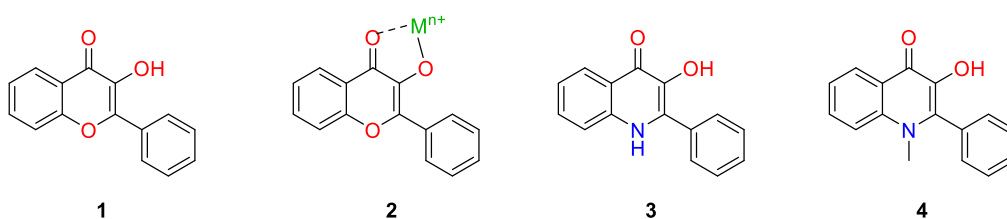


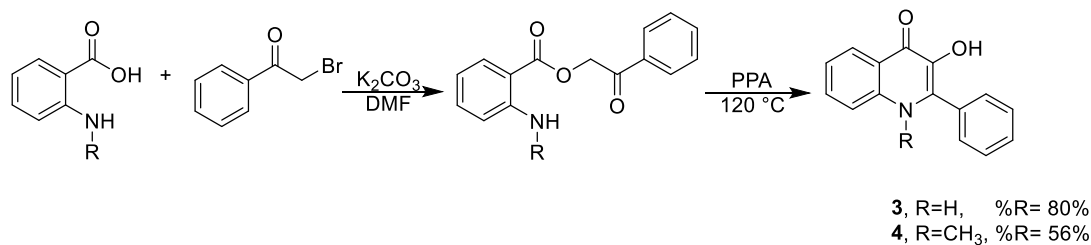
Figura 18. Flavonol (**1**) y sus aza-derivados 3-hidroxiquinolonas

Recientemente se ha demostrado que las 2-fenil-3-hidroxi-4(1H)-quinolonas (**3**, **4**) son químicamente parecidas al flavonol, pero son ligantes más poderosos debido a su aumento significativo en la carga negativa en el grupo 4-carbonilo,⁴⁷ los cuales al mismo tiempo conservan alta fluorescencia y la propiedad ESIPT de flavonol.⁴⁸ Estudios preliminares para la complejación de iones metálicos demostraron un comportamiento diferente para **3**, el cual a veces conllevaba además de la

desprotonación de 3-OH, a la desprotonación del NH en la complejación, mientras para **4** la complejación está libre de ésta complicación (figura 18)

5.1 Interacción de 3-hidroxiquinolonas con ácido fenilborónico y el efecto micelar

La hidroxiquinolona **3** se sintetizó en presencia de una base, a partir del ácido 2-aminobenzóico y 2-bromoacetofenona como se muestra en el esquema 5.²⁷



Esquema 5. Ruta de síntesis para las hidroxiquinolonas **3** y **4**²⁷

Las 3-hidroxiquinolonas están relacionadas estructuralmente con las 3-hidroxipiridonas⁴⁹ y 3-hidroxi flavonas,⁵⁰ y se coordinan fuertemente con iones metálicos, pero la complejación con ácidos borónicos nunca fue realizada para compuestos de este tipo. Ciertamente el compuesto **3** no interacciona con el ácido fenilborónico (AFB) en agua o una mezcla agua-disolvente orgánico en un intervalo de pH 7-10, como se puede ver en la figura 19. En los estudios por fluorescencia (figura 19a) y por espectrofotometría UV-vis (figura 19b), no se observa un gran cambio en los espectros tanto inicial como final de ambas titulaciones en presencia de AFB, sin embargo, en la presencia del HTAB, el ligante **3** forma un complejo muy estable con AFB en acuerdo con esquema en la figura 20.

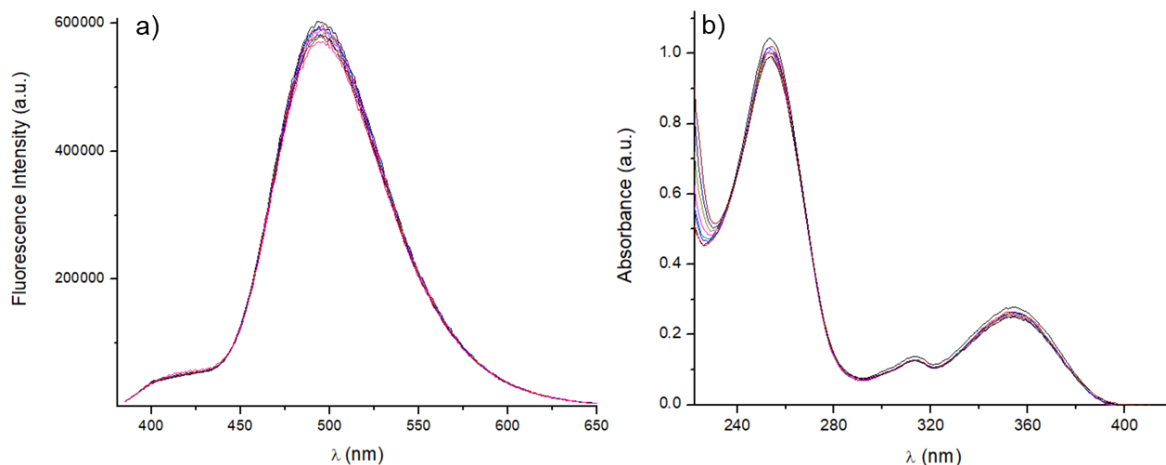


Figura 19. (a) espectros de emisión (λ excitación a 373 nm) de 40 μM de **3** en H_2O con 5% vol. de MeCN a pH 9.5 (b) espectros de absorción de 40 μM de **3** en H_2O con 5% vol. de MeCN a pH 9.5 en presencia del ácido fenilborónico añadido hasta 5 mM.

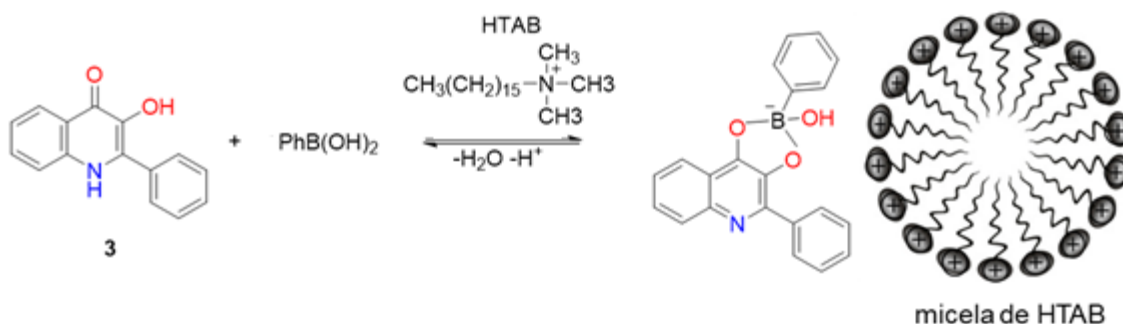


Figura 20. Esquema de reacción propuesto para **3** en HTAB con AFB a pH 8.

El curso de las titulaciones por fluorescencia y UV-Vis para **3** con AFB se muestra en la figura 21 y el ajuste de estos datos con HypSpec nos ayuda a calcular la constante de estabilidad observada $K_{\text{obs}} = 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (todos los errores relativos para los ajustes de K están por debajo de $\pm 10\%$) a pH 8.0 (todos los errores relativos para la medición del pH están de ± 0.01). Aun el ácido fenilborónico, el cual es un ácido de Lewis débil, se une con **3** en agua en presencia del tensoactivo catiónico, y el fuerte cambio de la fluorescencia de **3** inducido por la complejación con el ácido fenilborónico fue empleado para el desarrollo de un método radiométrico para la determinación cuantitativa de azúcares.⁵¹

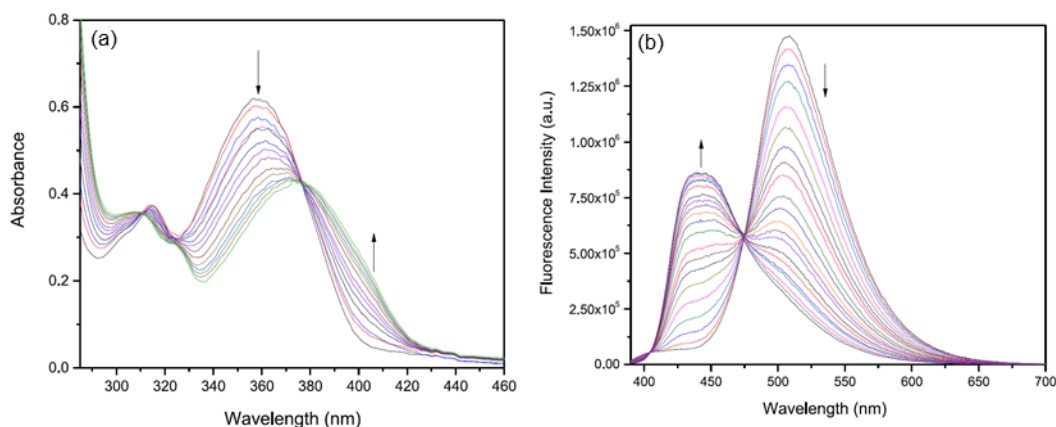


Figura 21. (a) Espectros de UV-Vis para 80 μM de **3** con 5 mM HTAB a pH 8 y concentración variable de AFB (0-1 mM). (b) Espectros de emisión (excitación a 377 nm) de 40 μM de **3** en 5 mM HTAB a pH 8 y concentración variable de AFB (0-1 mM) en medio acuoso. Las flechas indican la dirección del cambio espectral por adición de AFB.

Por otro lado, el compuesto metilado **4** no interactúa con el ácido fenilborónico aun en presencia del HTAB. Esta observación nos permite proponer que la forma reactiva de **3** es su forma tautomérica, la cual tiene estructura de catecol que es conocida por su alta afinidad con ácidos borónicos. Se propone que la reacción para **3** con el AFB ocurre en acuerdo con la figura 22, la formación de este tautómero no es posible con el compuesto **4**.

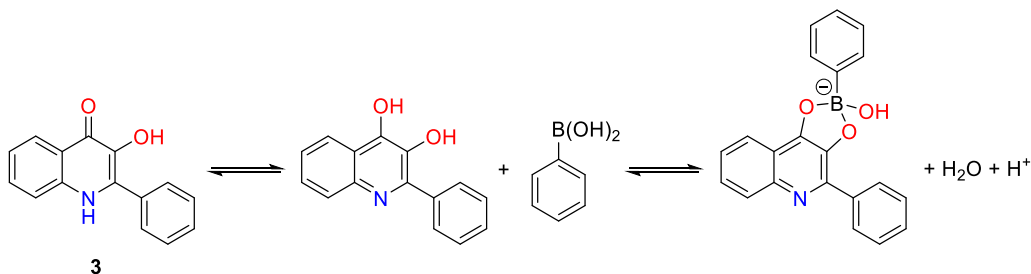


Figura 22. Equilibrio de reacción para **3** con el AFB

La formación de un éster aniónico como el producto de la reacción (figura 22), concuerda con la disminución de la constante observada a pH más bajo ($K_{\text{obs}} = 3.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ a pH 7), debido al desplazamiento del equilibrio a la izquierda en un medio más ácido.

La observación de la reacción en la figura 22 únicamente en presencia de HTAB implica un muy fuerte efecto micelar sobre el equilibrio de complejación, la concentración utilizada es de 5 mM, ya que así aseguramos que nos encontramos por encima de la concentración micelar crítica (cmc, por abajo de 1 mM para HTAB).⁵² Este efecto puede atribuirse a una fuerte estabilización del éster aniónico por la carga positiva de las micelas del tensoactivo catiónico. La reacción no se observa en presencia de tensoactivos neutros o aniónicos tales como Tritón X-100 o SDS respectivamente.

Como se observa en la figura 21b, la interacción con ácido fenilborónico elimina el máximo de fluorescencia a 506 nm que pertenece a la emisión de la estructura tautomérica de **3** formada por ESIPT y aumenta la fluorescencia con el máximo a 439 nm cercano al máximo de la forma normal a 410 nm (ver antecedentes). Evidentemente, la formación del éster elimina la posibilidad del ESIPT y deja sólo un máximo de emisión. Es importante resaltar que el cambio del espectro de emisión ocurre con la aparición de un punto isoemisivo a 474 nm que permite el diseño del método ratiométrico.

Para hacer la comparación entre **3** y otro fluoróforo (el cual también cuenta con propiedades ESIPT), se realizó un estudio similar con el 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol (**HBI**, figura 4). La figura 23 muestra el curso de la titulación fluorimétrica de **HBI** con AFB en 5 mM HTAB en medio acuoso a pH 7.4, que procede en acuerdo con la figura 24. En éste caso el producto es neutro y el efecto de la carga positiva micelar es irrelevante: la reacción se da de la misma manera que en agua y sin tensoactivo.

Figura 23. Espectros de fluorescencia (excitación a 330 nm) de 2.8 μM HBI en 5 mM HTAB a pH 7.4 en medio acuoso y concentración variable de AFB (0 – 0.6 mM). Las flechas muestran la dirección de los cambios espectrales con el incremento de la concentración de AFB.

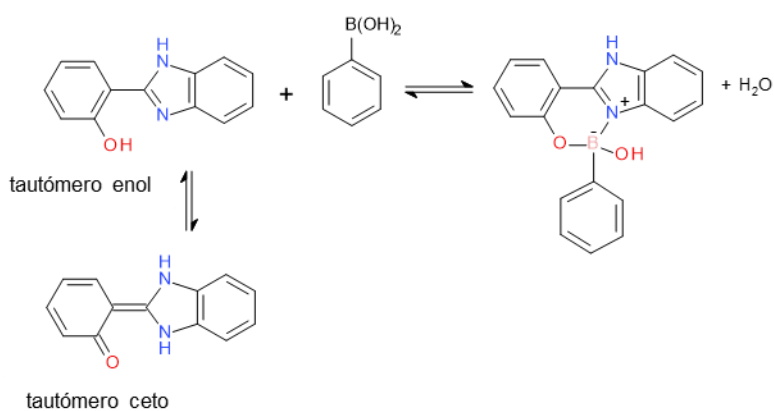


Figura 24. Equilibrio tautomérico de HBI y su complejación con AFB

El ajuste de estos datos permite calcular la constante de asociación observada $K_{\text{obs}} = 1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ a pH 7.4, por el orden de magnitud cercana a la de **3**. También el tipo de cambio espectral es parecido (comparar figuras 21b y 23). Sin embargo, con el compuesto **3** la emisión se observa a longitudes de onda más largas, lo que presenta una ventaja por la menor interferencia de impurezas y mayor sensibilidad) para la detección a simple vista (compare el cambio de color en las figuras 23 y 25).

5.1.1 Titulaciones ratiométricas de **3** con polioles

Las curvas de calibración para un método ratiométrico pueden construirse como la relación de emisión en un máximo (creciente o cayendo) y en el punto isoemisivo, o como relación de emisión en el máximo creciente y el máximo cayendo. El último método da una mayor pendiente de la curva de calibración y será usado en este trabajo.

La figura 25a muestra el resultado de la titulación de la mezcla de **3**+AFB con fructosa. Los cambios espectrales son los inversos de aquellos observados en la titulación de **3** con AFB y HTAB en medio acuoso (figura 21b), aunque la intensidad de la señal a 506 nm no se recupera por completo, aparentemente debido a la fotodestrucción parcial de **3** durante el experimento. Un comportamiento inverso similar también fue observado en la titulación por UV-Vis. La figura 25b muestra los cambios visuales en fluorescencia tras adiciones de AFB a **3** y la subsecuente titulación con fructosa. Evidentemente el cambio de color es fácilmente detectable, permitiéndonos tener una estimación de la concentración de fructosa a simple vista.

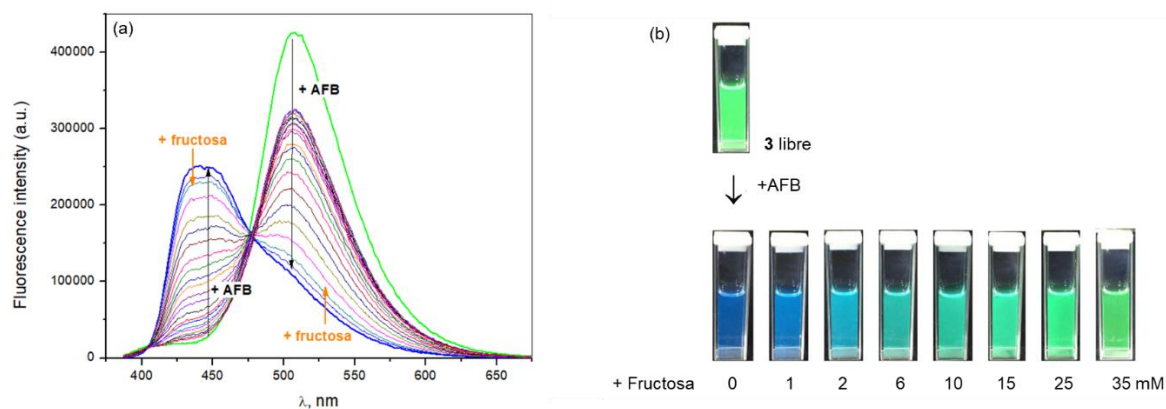


Figura 25. (a) Titulación por fluorescencia de la mezcla de 40 μ M de **3 con 0.5 mM de AFB en HTAB 5 mM a pH 8 con disoluciones de concentración variable de fructosa. La línea verde indica el espectro inicial de **3** libre y la línea azul es el espectro después de la adición de AFB (b) Cambios visuales en la fluorescencia en las adiciones de AFB y posteriormente fructosa.**

En la figura 26 se muestra el color observado de la luminiscencia en la celda de fluorescencia para el compuesto **3** libre. Posterior a la adición de AFB cambia a color azul pero al comenzar a añadir azúcar (siguiendo la idea de la figura 25, donde se añadió fructosa), el color de la fluorescencia regresa a verde.

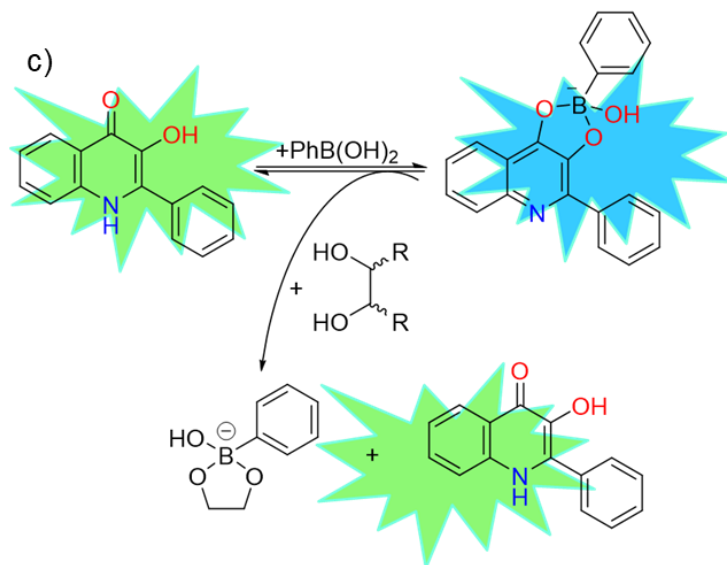


Figura 26. Representación del cambio visual de la fluorescencia de la mezcla de 40 μM de 3 con 0.5 mM de AFB en HTAB 5 mM a pH 8. El color verde indica el espectro inicial de 3 libre, el color azul es el color de la disolución después de la adición de AFB, luego de las adiciones de concentración variable de fructosa el color regresa a verde

La figura 27 muestra las titulaciones ratiométricas de 3-AFB para una serie de polioles. Todas las curvas de calibración muestran intervalos dinámicos lineales inusualmente largos con una fuerte respuesta óptica: los valores de I_{506}/I_{439} incrementan hasta 10 veces, mientras que la señal de fluorescencia directa nunca cambia por un factor más allá de 1.5 en un intervalo lineal (figura 28).

Los límites de detección ($LD = 3\sigma/m$, en una curva de calibración de un gráfico de señal "x" vs. la concentración del analito "c". La relación entre "x" y "c" se puede obtener mediante una regresión lineal de los datos con la ecuación $x=mc+i$ donde m es la pendiente de la curva de calibración)⁵³ varían desde 1 mM para glucosa hasta 0.04 mM para sorbitol.

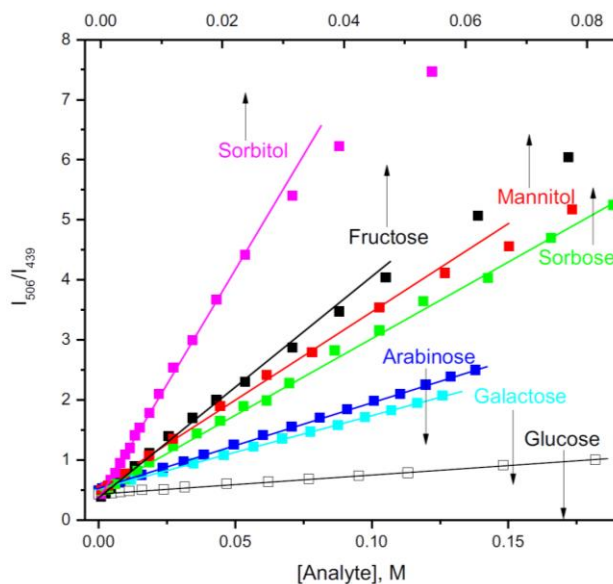


Figura 27. Curvas ratiométricas I_{506}/I_{439} para la titulación del complejo AFB-3 con diferentes polioles (mismas condiciones empleadas que en la figura 25)

La figura 28a muestra el perfil de la titulación del cual se ve que **3** permite una determinación cuantitativa de fructosa con un límite de detección de menos de 1 mM con un incremento de la intensidad de la fluorescencia a 506 nm, pero con un intervalo dinámico muy corto de cero a 2.5 mM (círculos sólidos).

Los círculos sin relleno muestran una respuesta tipo ratiométrica, la cual se define como la relación de la intensidad de la fluorescencia a 506 y 439 nm (I_{506}/I_{439}), lo que demuestra una mejora notable en las características analíticas del sistema: el intervalo lineal se extiende hasta 25 mM y la señal I_{506}/I_{439} crece por un factor de 5 (de 0.4 a 2.5) al final del intervalo lineal mientras que la intensidad de la fluorescencia absoluta a 506 nm crece sólo por un factor de 2.5 a concentraciones cercanas a la saturación. Efectos similares fueron observados para otros polioles como se ilustra para arabinosa (figura 28b)

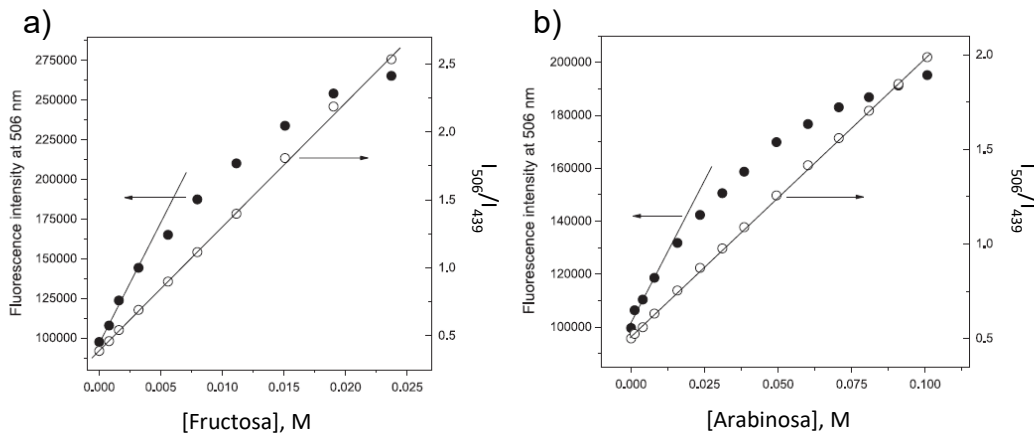


Figura 28. Gráficos para las titulaciones para los complejos de AFB+ 3 a bajas concentraciones de a) fructosa y b) arabinosa de la intensidad de la fluorescencia (círculos sólidos), o bien vs. la relación de las intensidades (círculos con fondo blanco) a 506 y 439 nm (I_{506}/I_{439}) vs la concentración del analito

La selectividad de la determinación correlaciona muy bien con los órdenes conocidos de las afinidades para estos polioles con AFB (tabla 3).⁵⁴

Tabla 3. Constantes de asociación (K_{eq}) del éster formado con AFB a pH 8 en buffer de fosfato 0.10 M

pH	K_{eq} (M^{-1}) del complejo con AFB				
	Fructosa	Catecol	Glucosa	Galactosa	Sorbitol
8	310	2900	7.2	38	840

Los valores son un promedio de las corridas por triplicado redondeado a dos cifras significativas

La presencia de micelas de HTAB cargadas positivamente, pueden incrementar la afinidad a la carga negativa de los analitos. Por esta razón probamos la interacción del sensor con una serie de nucleótidos de adenosina aniónicos (AMP, ADP, ATP), en comparación con la adenosina neutra (figura 29).

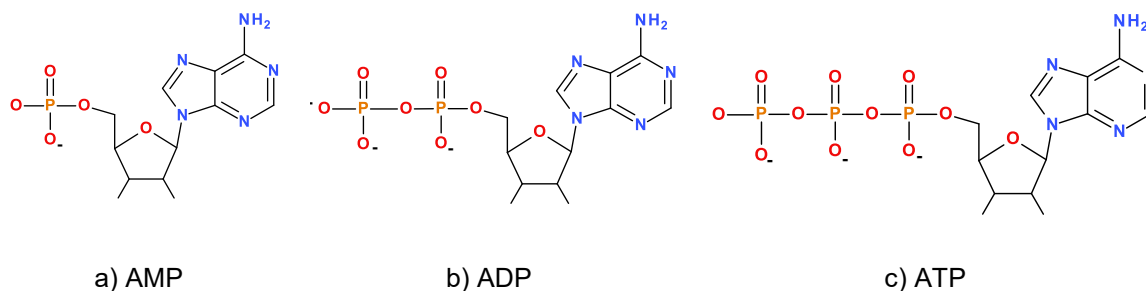


Figura 29. Estructuras de nucleótidos aniónicos de adenosina utilizados para probar su interacción con AFB en presencia de HTAB, a) AMP b) ADP c) ATP

Los tres nucleótidos de la figura 29 tienen fragmentos de azúcar (ribosa), la cual es capaz de formar ésteres borónicos, además cuentan con cargas negativas que pueden ser atraídas por la carga positiva superficial de la micela de HTAB. Los nucleótidos no interactúan directamente con el complejo AFB-3. El esquema que describe mejor esta interacción es el mismo esquema de competencia IDA como en el caso de fructosa y otros carbohidratos (ver figura 26). Una representación esquemática de dicho modelo IDA con AMP se presenta en la figura 30.

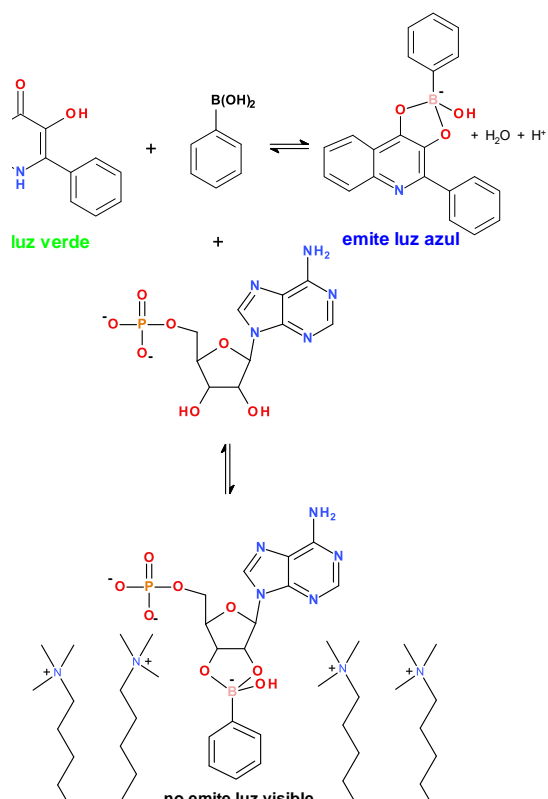


Figura 30. Representación de modelo IDA para 3-AFB en medio acuoso con HTAB a pH 8 con adiciones consecutivas de AMP

Con ADP y ATP la interacción electrostática es mayor ya que tanto sus cargas negativas son mayores así como su señal es más fuerte, pero adenosina no tiene el grupo fosfato y no tiene carga y da una señal más baja. Éste efecto electrostático de HTAB es evidente si se compara la tendencia de estabilidad de los complejos de nucleótidos con ácido bórico en agua,⁵⁵ (tabla 4) donde observamos que la

estabilidad intrínseca de los ésteres borónicos cae con un aumento de la carga negativa. Además es importante mencionar que las mediciones sin HTAB como “prueba” de su efecto son imposibles porque sin HTAB no hay interacción entre AFB y **3**.

Tabla 4. K_A de algunos complejos borato-nucleótido a pH 10.3⁵⁵

Nucleótido	K_A (Lmol ⁻¹)	Nucleótido	K_A (Lmol ⁻¹)	Nucleótido	K_A (Lmol ⁻¹)
AMP	270±50	ADP	44±5	ATP	No observado

La figura 31 muestra los resultados de la titulación de **3** y AFB con cuatro distintos nucleótidos (en medio acuoso con HTAB a pH 8), de dichos resultados se concluye que la influencia del analito cargado negativamente es evidente

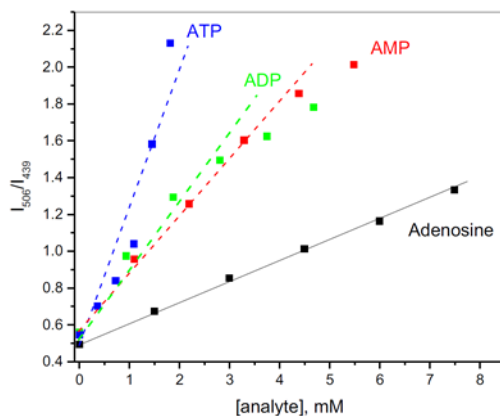


Figura 31. Curvas de titulación utilizando agua como disolvente para de 40 μ M de **3** con 0.5 mM de AFB en HTAB 5 mM a pH 8 para ATP, ADP, AMP y adenosina, ATP induce precipitación por arriba de 2 mM.

Para el caso de los azúcares de la figura 27, el sistema **3**-AFB nos da una señal mayor para fructosa y eso puede ser aplicado para la determinación de fructosa, por ejemplo, en alimentos. La figura 32 ilustra la selectividad en la determinación de 10 mM de fructosa en comparación con otros azúcares estudiados a la misma concentración. La última columna a la derecha muestra el efecto de compuestos típicos interferentes (para fructosa en alimentos) como maltosa, sacarosa, glucosa y almidón, que fueron adicionados todos juntos cada uno con un exceso de 10 veces

de fructosa. Evidentemente, las señales observadas están dentro del límite de error solamente para fructosa.

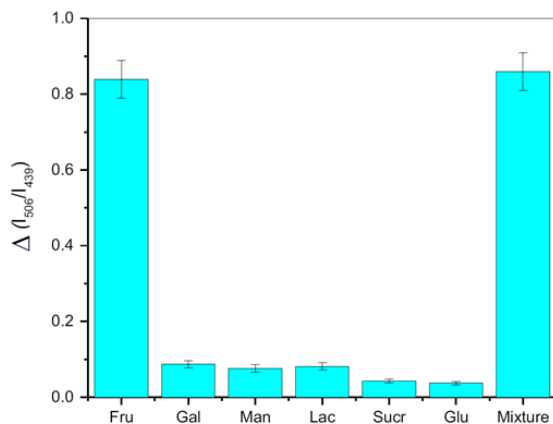


Figura 32. Señales ratiométricas observadas como el incremento de la relación de la intensidad de la fluorescencia de las señales a 506 nm y 439 nm ($\Delta(I_{506}/I_{439})$) del complejo AFB-3 en presencia de 10 mM de diferentes sacáridos. La última columna muestra una mezcla de 10 mM de fructosa con un exceso de maltosa, sucrosa, glucosa, y almidón.

5.1.2 Interacción de 4 con micelas de HTAB

A pesar del progreso que existe en el desarrollo de sondas fluorescentes ratiométricas para metales como zinc⁵⁶ (por mencionar uno), existen muy pocas estructuras que son adecuadas para su construcción lo que limita el ajuste fino de sus propiedades fotofísicas y afinidades a los iones metálicos, lo que obstaculiza el desarrollo de este tipo de tecnología.

El compuesto **3** resultó ser muy útil para el desarrollo de un método fluorimétrico ratiométrico de detección de sacáridos, esto gracias a la posibilidad de la tautomerización y subsecuente desprotonación del grupo NH por coordinación con el ácido borónico. Sin embargo, este mismo fenómeno complica la interacción de la 3-hidroxiquinolona **3** con cationes metálicos (figura 33)⁴⁷, debido a la formación de complejos con diferente grado de desprotonación del ligante.

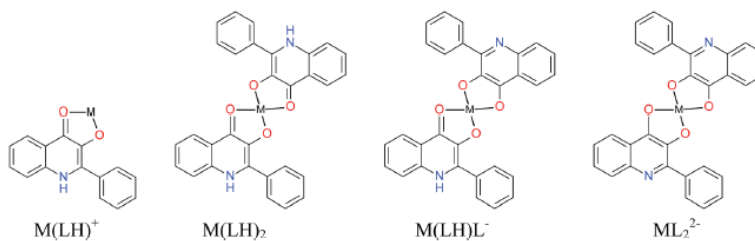


Figura 33. Tipos de complejos de **3** y (LH₂) y cationes metálicos, establecidos mediante titulaciones potenciométricas

Por esta razón el estudio de la complejación de 3-hidroxiquinolonas con metales fue realizado con el compuesto N-metilado **4**, el cual se sintetizó siguiendo la ruta del esquema 5. Comparado con **3**, el compuesto **4** tiene menor solubilidad en agua. Después de probar varios métodos para intentar aumentar su solubilidad (mezcla de disolventes orgánico, acuoso, tensoactivo aniónico, tensoactivo neutro) escogimos como el más óptimo la disolución micelar acuosa de HTAB (el cual es un tensoactivo catiónico con una concentración micelar crítica $cmc = 1\text{mM}$ o menor dependiendo de las condiciones), y que nos permitió obtener mediciones más reproducibles.

El espectro de emisión de **4** en agua a pH 7 tiene dos máximos de aproximadamente la misma intensidad a 421 y 501 nm (figura 34), los cuales pertenecen a los estados excitados de las formas tautoméricas neutral y zwitterionica (N y T en la figura 14), respectivamente. En presencia de HTAB, la emisión de la forma neutra (N^*) es fuertemente reducida y la emisión de la forma zwitterionica (T^*) incrementa con un desplazamiento del máximo hacia el rojo a 523 nm (figura 34a). Un espectro de emisión similar de **4** es observado en acetonitrilo.⁴⁸ Por lo tanto, se puede concluir que **4** es incorporado en el interior hidrofóbico de las micelas de HTAB.

Figura 34. (a) Espectro de emisión de 4 a una concentración de 40 μM en agua a pH 7 (línea negra) y en presencia de 5 mM HTAB (línea roja), λ excitación de 340 nm. (b) Efecto de HTAB en el espectro de absorción de 4 a pH 5, el recuadro muestra la absorbancia vs perfil de conc. HTAB a 354 nm
Las flechas muestran la dirección de los cambios espectrales conforme al incremento de la conc. del tensoactivo.

El medio micelar afecta también al espectro de absorción de **4** (figura 34b). Se observa que en el perfil de concentración, la absorbancia vs. HTAB se satura a una

concentración por alrededor de 5 mM y el ajuste de este perfil a isoterma de unión de 1:1 (recuadro derecho en la figura 34b), permite calcular la constante aparente de unión $(1.2\pm 0.1)\times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para la complejación de **4** con HTAB. Los cambios espectrales se observan aún por debajo de la concentración micelar crítica de HTAB. Lo que significa que las moléculas hidrofóbicas de **4** inducen la formación de las micelas a menores concentraciones del tensoactivo. Para el estudio de complejación con metales se realizaron experimentos a una concentración de HTAB 5 mM donde alrededor del 90% de **4** es incorporado en las micelas. A estas condiciones el pK_a de **4** es 9.8 (Tabla 2).

5.1.3 Interacción de **4** con iones metálicos

Las interacciones de la prueba de **4** con iones metálicos en un intervalo de pH 5-7, mostraron efectos insignificantes para Mg(II), Ca(II), Mn(II) para concentraciones de hasta 1 mM tanto para absorción como para fluorescencia de **4**. Los cationes como Co(II), Ni(II) y Eu(III) extinguieron la fluorescencia por alrededor de un 90% a saturación, con constantes de estabilidad observadas de los complejos 1:1 ($\beta_{1:1}^{obs}$) dadas en la tabla 5 (entradas 1-3).

Tabla 5. Constantes de estabilidad de complejos metálicos de **4 en 5 mM HTAB acuoso.**

	Cación	$\log\beta_{1:1}^{obs}$	$\log\beta_{1:2}^{obs}$	pH	I_{ML}/I_L a)	I_{ML_2}/I_L a)	$\log K_1$	$\log K_1$	$\log K_1$
								b)	b)
								Maltol	Hdmp
1	Co ²⁺	3.25±0.04		7	0.23		6.05	5.1	6.6
2	Ni ²⁺	3.49±0.03		7	0.11		6.29	5.4	6.9
3	Eu ³⁺	4.32±0.05		7	0.06				
4	Cu ²⁺	6.39±0.03	12.05±0.03	7	0	0	9.19	7.7	10.6
5	Zn ²⁺	2.20±0.06		6	18				
6	Zn ²⁺	3.72±0.02		7	24		7.57	5.6	7.2
7	Zn ²⁺	4.77±0.02	9.58±0.04	8	19	5.9			
8	Me ₂ Sn ²⁺	4.17±0.03	7.60±0.05	5	12	0			
9	Me ₂ Sn ²⁺	3.72±0.02	8.38±0.06	7	51	0			
10	Pb ²⁺ d)	5.11±0.01	9.53±0.01	7	0.05	0	7.91	6.83 ^{c)}	9.09 ^{c)}
11	Al ³⁺ e)	3.08±0.04		3	45				
12	Al ³⁺	4.20±0.03	8.16±0.06	4	44	0	9.9	8.3	12
13	Al ³⁺	4.58±0.03	8.96±0.05	5	27	0			
14	Al ³⁺	6.16±0.06	11.47±0.08	6	5.6	0.42			
15	Al ³⁺	3.75±0.06	9.62±0.09	7	8.7	0.14			

16	Ga ³⁺	4.19±0.03	11.51±0.05	5	24	0.24
17	Be ²⁺	2.7±0.1		5	8.1	
18	Fe ³⁺	11.56±0.01	22.27±0.01			

a) La relación de las intensidades de la fluorescencia / a una longitud de onda correspondiente a la diferencia máxima en la fluorescencia entre L y ML o L y ML₂ respectivamente.

b) Constantes de unión de complejos de cationes de metales de transición de carga 2+ con maltol y Hdmp en agua, de ref.⁵⁷

c) En agua de ref.⁵⁸

d) $\log\beta_{1:1}^{obs} = 4.92 \pm 0.06$ y $\log\beta_{1:2}^{obs} = 9.91 \pm 0.04$ de los datos de UV-Vis.

e) $\log\beta_{1:1}^{obs} = 3.03; 3.9$ y 4.18 a pH 3, 4 y 5, respectivamente, de los datos de UV-Vis.

En la Tabla 5 los símbolos $\beta_{1:1}^{obs}$ y K_1 tienen los mismos sentidos que K_{ML}^{obs} y K_{ML} respectivamente en la ecuación (1). Es decir, $\beta_{1:1}^{obs}$ está calculada como una constante de estabilidad aparente del complejo 1:1, que es válida solo al pH de su determinación y K_1 es una constante de estabilidad verdadera para asociación del catión metálico con ligante desprotonado.

La constante $\beta_{1:2}^{obs}$ es una constante observada, pero para la formación del complejo 1:2 en solo una etapa que corresponde a la ecuación $M+2L \leftrightarrow ML_2$. Al igual con $\beta_{1:1}^{obs}$ es válida solo a pH de su determinación y en su cálculo se emplea la concentración total del ligante, es decir $[LH]+[L^-]$.

En otras palabras, $\beta_{1:1}$ formalmente corresponde a la ecuación $M + L \rightarrow ML$

$$\beta_{1:1}^{obs} = \frac{[ML]^{n+}}{[M^{n+}][L]}$$

pero en su cálculo $[L]$ representa la concentración total del ligante, es decir $[LH] + [L^-]$.

Igualmente, $\beta_{1:2}$ corresponde formalmente a la ecuación $M+2L \rightarrow ML_2$

$$\beta_{1:2}^{obs} = \frac{[ML_2]^{n+}}{[M^{n+}][L]^2}$$

pero en su cálculo $[L]$ también representa la concentración total del ligante, es decir $[LH] + [L^-]$.

Una completa extinción de la fluorescencia y una muy fuerte unión fue observada con los cationes Cu(II) y Fe(II/III) (figura 35). Los perfiles de las curvas de titulación indican la formación de los complejos ML_2 y ML_3 como las formas predominantes con Cu(II) y Fe(II), respectivamente (ver recuadros en las figuras 35a,b). El ajuste de los resultados para Cu (II) con el programa HypSpec mostró que se formaron dos complejos, con estequiometría 1:1 y 1:2 con las constantes de estabilidad dadas

en la tabla 4 y ambos complejos fueron no fluorescentes. La unión de Fe(II) fue muy fuerte para un ajuste confiable de los resultados a un pH fijo, por lo que fue analizado mediante mediciones a pH variado (figura 35b). Sorprendentemente, las titulaciones con los cationes Fe(II) y Fe(III) produjeron resultados idénticos. Un comportamiento similar fue observado para la interacción de iones de hierro con deferiprona⁵⁹ y desferrioxamina B⁶⁰ y fue atribuido a la rápida oxidación de Fe(II) a Fe(III) por el ligante. En nuestro caso no se observó consumo alguno del ligante en los experimentos con Fe(II), lo cual sugiere que otro oxidante, aparentemente el oxígeno atmosférico podría estar involucrado.

En la figura 35b se muestran los resultados de la titulación espectrofotométrica UV-vis de pH de una mezcla de cationes de hierro (resultados idénticos fueron obtenidos con ambas sales de Fe(II) y Fe(III)) y **4** en una relación molar 1:3. Las bandas de absorción en un intervalo de 450-700 nm pertenecen a los complejos de Fe(III) y el ajuste de estos resultados con HypSpec da constantes de estabilidad $\log\beta_{110} = 11.65 \pm 0.01$, $\log\beta_{120} = 22.27 \pm 0.01$ y $\log\beta_{130} = 31.35 \pm 0.02$ (estas constantes son “verdaderas”, no “observadas”, y corresponden a la unión del catión metálico con 1, 2 o 3 ligantes en forma desprotonada). De estos resultados se deduce que $pFe = 15.14$ ⁶¹ para **4** (lo que indica que la concentración de Fe_{libre} es igual a $10^{-15.14}$ M en presencia de 10 μ M del ligante **4** a pH 7.4). Este valor es cercano a $pFe = 16.6$ reportado para la 2-metil-3-hidroxi-4-quinolona (una molécula de señalización de tipo *quorum sensing*: proceso a través del cual las poblaciones unicelulares de bacterias provocan un comportamiento colectivo a través de un sistema de comunicación que depende de la liberación de pequeñas moléculas de señalización denominadas “moléculas de detección de quórum”⁶²) en 50% DMSO,⁶³ confirmando la fuerte habilidad de quelatación del hierro por parte de las 3-hidroxiquinolonas (figura 36). Ambos valores son significativamente más bajos que $pFe = 20.67$ para 1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridinona,⁶⁴ mejor conocido como deferiprona, un fármaco quelante de hierro de uso médico.

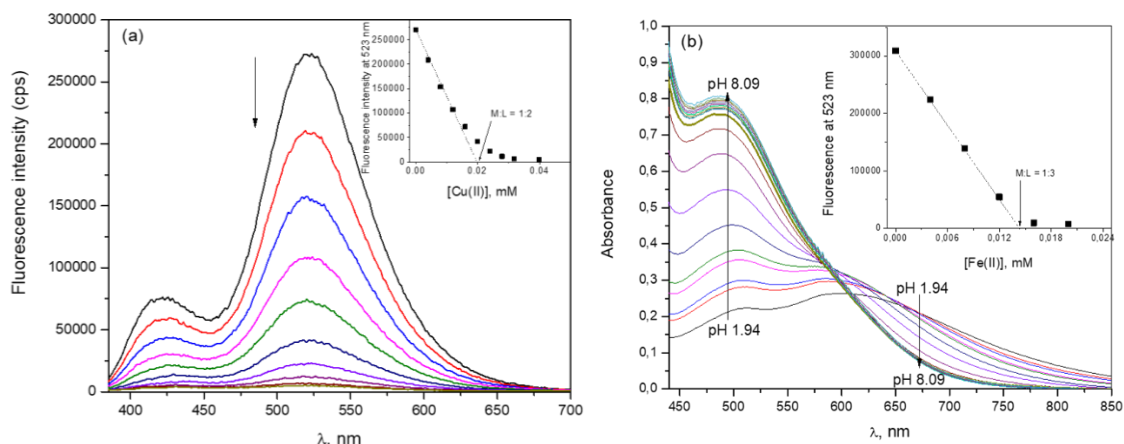


Figura 35. (a) Espectros de emisión de una disolución 40 mM de 4 a pH 7 en presencia de 5 mM HTAB en agua con un incremento de la concentración de Cu(II) (4-40 μ M); $\lambda_{\text{excitación}}$ 374 nm. Las flechas muestran la dirección de los cambios espectrales conforme al incremento de la concentración de la concentración de Cu(II). El recuadro muestra el perfil de concentración de la intensidad de la fluorescencia vs. conc. de Cu(II) a 523 nm. (b) Espectros de absorción UV-Vis de una disolución 0.1 mM Fe(II) o bien Fe(III) en presencia de 0.3 mM 4 a pH variable. El recuadro muestra el perfil de concentración de la intensidad de la fluorescencia a 523 nm vs. conc. Fe(II/III).

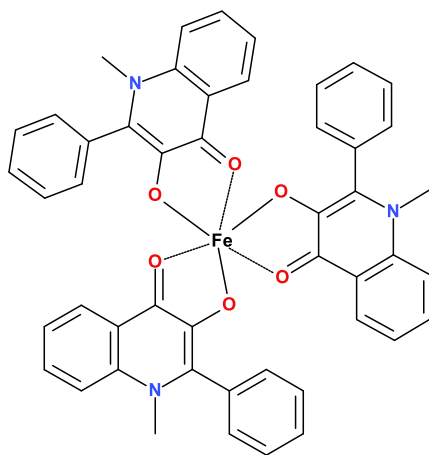


Figura 36. Estructura propuesta para el complejo con estequiometría 3:1, formado a partir de Fe(III) con la hidroxiquinolona 4

Para Pb(II) se observó una extinción casi completa de la fluorescencia (figura 37). El ajuste de los resultados en HypSpec muestra la formación de los complejos 1:1 y 1:2, con constantes de estabilidad dadas en la tabla 5. Es interesante que, a pesar de que el complejo 1:1 tiene una fluorescencia débil con un máximo de emisión a 476 nm, el complejo 1:2 no presenta ningún tipo de fluorescencia. En la figura 37b no se ve un punto isobéptico definido, lo que indica que el equilibrio no es de 1:1, por el contrario, es un equilibrio más complejo.

Figura 37. (a) Titulación por fluorescencia y (b) espectrofotométrica de una disolución 40 μM y 20 μM de **4, respectivamente con Pb(II) (4-272 μM y 4-196 μM respectivamente) a pH 7 en 5 mM HTAB. $\lambda_{\text{excitación}}$ 374 nm. Las flechas muestran la dirección de los cambios espectrales conforme al incremento de la concentración del ion metálico.**

En contraste con Pb(II), la coordinación con Zn(II) induce un fuerte aumento de la fluorescencia de **4** con un punto isoemisivo en 424 nm (figura 38). Al mismo tiempo los cambios en los espectros de UV-Vis inducidos por la complejación de **4** son similares para ambos cationes (figuras 37b y 38b). En ambos casos el máximo de absorción a 359 nm disminuye y un nuevo máximo a una mayor longitud de onda aparece a 382 nm para Pb (II) y 376 nm para Zn (II).

Figura 38. (a) Titulaciones por fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}$ 374 nm) y (b) espectrofotométrica de una disolución acuosa 40 μM y 20 μM de **4 respectivamente en 5 mM de HTAB con Zn(II) (12-384 μM y 4-494 μM respectivamente) a pH 7. Las flechas muestran la dirección de los cambios espectrales conforme al incremento de la concentración del ion metálico.**

El efecto de la fluorescencia en la coordinación de Zn(II) puede ser racionalizado en términos de la figura 39. El ligante libre tiene dos máximos de emisión, a 421 y 523

nm, los cuales se atribuyen a las dos formas tautoméricas **A** y **B** (N^* y T^*) de **4**. En el estado basal la forma **A** tiene una menor energía y emite a una menor longitud de onda (421 nm), pero en el estado excitado el grupo OH se convierte en más ácido y esto conlleva a una transferencia de protón (ESIPT) con la formación de una forma tautomérica **B**, la cual emite a una mayor longitud de onda (523 nm).⁴⁸ La unión con el ion metálico libera el protón del grupo OH y elimina la posibilidad de un equilibrio tautomérico en el complejo **C**, el cual tiene un único máximo de emisión a 479 nm. Los resultados para el ajuste de la titulación a pH 7 con HypSpec muestran la formación del complejo 1:1 con una constante de estabilidad observada dada en la tabla 5.

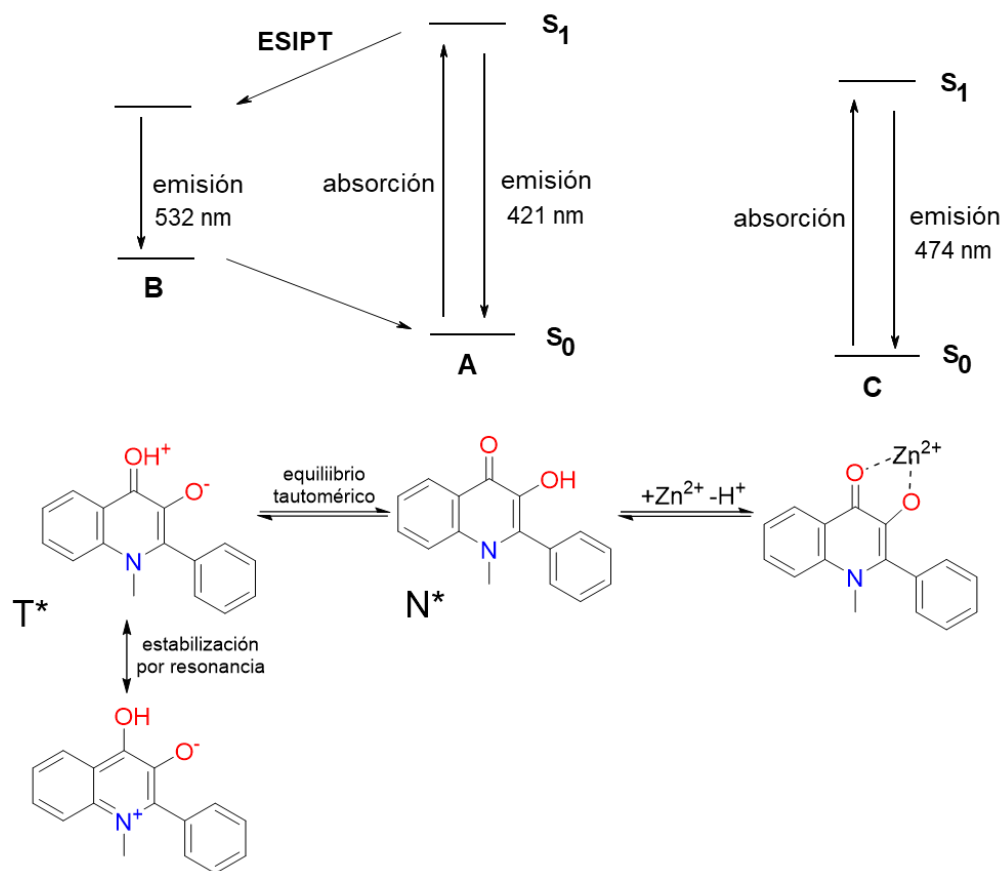


Figura 39. ES IPT. Transferencia de protón intramolecular en el estado excitado A y bloqueo de ES IPT por medio de un ion metálico. Considerar que el Zn^{2+} se encuentra en medio acuoso y está coordinado con varias moléculas de H_2O para completar su esfera de coordinación, omitidas en la estructura del complejo.

Las titulaciones con $Zn(II)$ en un intervalo de pH de 5 a 8 mostraron la disminución esperada de $\beta_{1:1}^{obs}$ a menor pH (tabla 5, entradas 5-7), debido a la competencia con

el protón por el equilibrio de complejación (1). A pH 5 la interacción con Zn(II) a concentraciones mM es prácticamente indetectable, pero a pH 8 un segundo complejo de estequiometría 1:2 correspondiente a la ecuación (2) comienza a contribuir con la constante de estabilidad aparente $\beta_{1:2}^{obs}$ (tabla 5, entrada 7). Evidentemente la mayor dependencia de la estabilidad observada del complejo ML_2^+ del pH es debido a la liberación de 2 protones acompañado de la unión con el metal es responsable de la aparición de este complejo únicamente a valores de pH lo suficientemente altos. En el caso de Pb(II), la intensidad de la fluorescencia de ML_2 es significativamente menor que la de ML^+ y ambos complejos son menos fluorescentes que el ligante libre (ver arriba), mientras que el complejo ZnL^+ tiene un fuerte incremento de la fluorescencia, pero el complejo ZnL_2 es menos fluorescente (Figura 40).

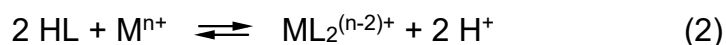
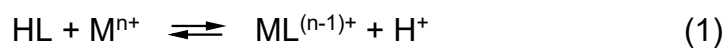


Figura 40. Espectros de emisión de HL, ZnL^+ y ZnL_2 generados por HypSpec a pH 8, $[L]_{total} = 4 \times 10^{-5} M$

La interacción de **4** con $Me_2Sn(IV)$ estuvo acompañada por cambios espectrales en fluorescencia similares a los observados con Zn(II) (figura 41a), y puede ser interpretada en términos de la figura 39. El perfil de la titulación en el máximo de emisión del complejo a 457 nm, ajusta bien para una isoterma de unión 1:1 (figura 41c), pero los perfiles a otras longitudes de onda claramente muestran la formación de dos complejos (por ejemplo, la curva a 535 nm de la figura 41c). El ajuste con HypSpec nos ayuda a obtener las constantes de estabilidad respectivas (tabla 5,

entradas 8 y 9), así como los espectros de emisión calculados, los cuales se muestran en la figura 41b, donde se puede observar que el complejo ML es mucho más fluorescente que el ligante libre, en contraste a ML_2 que no tiene fluorescencia.

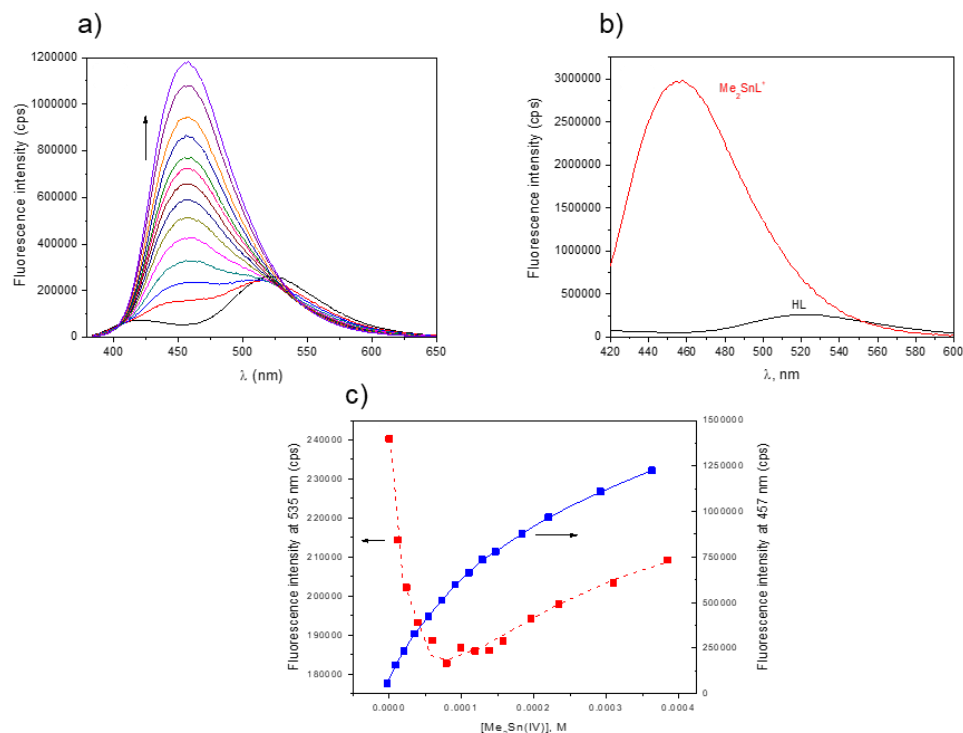


Figura 41. (a) Titulación por fluorescencia de una disolución acuosa $40 \mu\text{M}$ de 4 para Me_2SnCl_2 ($12\text{-}384\mu\text{M}$) en 5 mM HTAB a $\text{pH } 7$, $\lambda_{\text{excitación}} 374 \text{ nm}$. Las flechas muestran la dirección de los cambios espectrales conforme al incremento de la concentración del ion metálico. (b) Espectro de emisión de HL y Me_2SnL^+ generados por HypSpec a $\text{pH } 7$; (c) Perfiles de concentración de titulación a 457 nm (escala de la derecha) a 535 nm (escala de la izquierda).

Por otro lado, los cationes de Al(III) indujeron el mayor incremento de la intensidad de la fluorescencia y el visualmente detectable cambio del color de emisión (figura 42). La existencia de dos complejos de estequiometría 1:1 y 1:2 es claramente vista en los resultados de la titulación a $\text{pH } 6$ (figura 42b). Las adiciones iniciales de bajas concentraciones de Al(III) dan lugar a la formación del complejo 1:2 que domina la extinción de la fluorescencia a 523 nm , pero conforme aumenta la concentración de Al(III) un nuevo máximo de emisión aparece a 450 nm .

Figura 42. Titulación por fluorescencia de una disolución acuosa 40 μM de 4 con Al(III) (4-421 μM) en 5 mM HTAB a pH 5, $\lambda_{\text{excitación}}$ 374 nm (a) y pH 6 (b). Las flechas muestran la dirección de los cambios espectrales conforme al incremento de la concentración del ion metálico.

Así como en el caso de Sn(IV) y Zn(II), el complejo ML_2^+ tiene baja fluorescencia, pero en el caso del complejo ML^{2+} , aumentó la intensidad de la fluorescencia. Los cambios espectrales en el espectro de absorción de UV-Vis son del mismo tipo que con las sales de Zn(II) and Pb(II) (figura 43).

Figura 43. Titulación espectrofotométrica de una disolución acuosa 40 mM de 4 por Al(III) (4-421 μM) a pH 5 en 5 mM HTAB. Las flechas muestran la dirección de los cambios espectrales conforme al incremento de la concentración del ion metálico.

Las constantes de estabilidad para Al(III) determinadas a distintos valores de pH fijos muestran tendencias complejas (tabla 5, entradas 10-14) debido a la formación de hidroxocomplejos con este catión por encima de pH 4. Las constantes individuales de estabilidad fueron determinadas por análisis de HypSpec de los

espectros de fluorescencia y UV-Vis de las mezclas ion-ligante a pH variable (figura 44) usando las constantes de hidrólisis (formación de hidroxocomplejos) reportadas en la literatura para Al(III) $\log\beta_{1,-1} = -5.33$, $\log\beta_{1,-2} = -10.9$, $\log\beta_{3,-4} = -13.13$, $\log\beta_{13,-32} = -107.41$, $\log\beta_{1,-4} = -23.3$ (los subíndices en $\beta_{x,y}$ indican el número de cationes metálicos y el número de ligantes tipo hidroxido (OH^-), que es negativo porque el proceso se presenta como desprotonación de agua en el hidroxocomplejo M_xOH_y) como parámetros fijos y asumiendo que las reacciones de complejación tienen lugar por coordinación del ligante desprotonado. Los valores resultantes de $\log\beta_{110} = 9.99 \pm 0.01$ y $\log\beta_{120} = 19.60 \pm 0.03$ (UV-Vis) y $\log\beta_{110} = 9.74 \pm 0.01$ y $\log\beta_{120} = 19.83 \pm 0.03$ (fluorescencia) dan las constantes de estabilidad promedias $\log\beta_{110} = 9.9 \pm 0.1$ y $\log\beta_{120} = 19.7 \pm 0.1$. Tal como en el caso de hierro, estas constantes son “verdaderas” por decirlo de alguna forma.

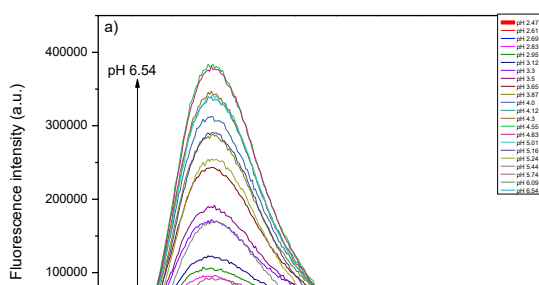


Figura 44. (a) Titulación por fluorescencia de una disolución acuosa a pH variable conc. 50 μM de 4 en presencia de 50 μM Al(III); (b) Titulación UV-Vis en disolución acuosa de pH variable conc. 50 μM de 4 en presencia de 400 μM de Al(III) en 5 mM HTAB

Si se calculan las constantes observadas correspondientes empleando la ecuación (1) para el complejo 1:1 y la ecuación correspondiente para el complejo 1:2 ($\log K_{\text{ML}2} = \log K_{\text{obs}} + 2 \text{p}K_{\text{a}}^{\text{HL}} - 2 \text{pH}$) estas coinciden muy bien con las constantes de estabilidad observadas, que fueron medidas para pH fijo. Por ejemplo, a pH 4 calculadas con valores de constantes $\log\beta_{1:1}^{\text{obs}} = 4.1$ y $\log\beta_{1:2}^{\text{obs}} = 8.1$, mientras que los respectivos valores experimentales son 4.20 y 8.16 (tabla 5, entrada 12).

Las titulaciones a pH variable indican las tendencias opuestas en las constantes de estabilidad para Zn(II), y Me₂Sn(IV) (figura 45). Esta inversión ocurre porque el Me₂Sn²⁺ es un ácido de Lewis mucho más fuerte que Zn(II), con el primer y segundo valor de pK_a de 3.17 y 5.25, respectivamente.⁶⁵ Por lo tanto, a pH 7 el catión existe completamente en su forma dihidróxido Me₂Sn(OH)₂ y la disminución del pH lo convierte en un complejo monohidróxido Me₂Sn(OH)⁺ más reactivo.

Figura 45. Perfiles de pH para las constantes de estabilidad de los complejos 1:1 para 4 con Al(III), Zn(II) y Me₂Sn(IV). La pendiente para Al(III) es de 0.84±0.17, la pendiente para Zn(II) es de 1.28±0.09.

Se hicieron estudios con Be²⁺ y Ga³⁺ debido a que éstos suelen interferir con Al³⁺, particularmente Ga³⁺ se encuentra en la misma familia dentro de la tabla periódica y Be²⁺ se encuentra en diagonal con el Al³⁺ y por eso es conocido como un típico interferente.⁶⁶ Ambos se comportan cualitativamente igual, pero cuantitativamente si se llega a la concentración 1 mM vemos que la intensidad de la fluorescencia sube aproximadamente dos veces y con Al³⁺ ya que con concentración de 0.1 mM sube mucho más por lo que no deben interferir. Los datos de la titulación para Be(II) y Ga(III) (figura 46) muestran que también estos cationes inducen un aumento de la fluorescencia, aunque el efecto de Be(II) es modesto (figura 46a). En el caso de Ga(III) hay dos pasos de complejación correspondientes a los complejos ML y ML₂ que corresponde a [Ga(III)]:[4]= 1:2, éstos complejos presentan una menor fluorescencia que la del ligante libre (figura 46b).

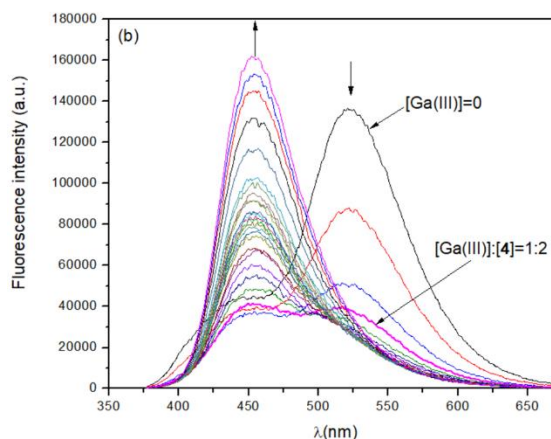


Figura 46. Titulaciones por fluorescencia de una disolución acuosa con 20 μM de **4 y (a) 157-671 μM Be(II) y (b) 4-775 μM Ga(III) a pH 5 en 5 mM HTAB. Las flechas muestran la dirección de los cambios espectrales conforme al incremento de la concentración del ion metálico.**

Los resultados de la tabla 5 muestran que **4** se comporta como un ligante fuerte hacia diferentes metales tales como Eu(III), Pb(II), Al(III), Ga(III) y Sn(IV). Sería interesante comparar **4** y **1** como ligantes pero las constantes de estabilidad reportadas para complejos metálicos con **1** fueron medidas en disolventes orgánicos, generalmente en metanol o en mezclas acuosas/orgánicas,⁶⁷ bajo condiciones de especiación desconocida de metales y no pueden ser comparadas con las que fueron realizadas en el presente estudio. Una comparación más significativa es posible con los ligantes 3-hidroxi-2-metil-4-pirona (mejor conocido como maltol) y 3-hidroxi-1,2-dimetil-4-piridinona (Hdpp), ya que son solubles en agua y estructuralmente similares. Las constantes de estabilidad disponibles para los complejos con estequiometría 1:1 con estos ligantes, están compiladas en la tabla 5. Estas constantes se refieren a la unión de un ion metálico en agua con un ligante aniónico desprotonado.

Así mismo las respectivas constantes para **4** calculadas a partir de las constantes condicionales $\beta_{1:1}^{\text{obs}}$ y el pK_a conocido para **4** empleando la ecuación (1) (ver Antecedentes), se encuentran en la tabla 5, en la columna $\log K_1$. Evidentemente las constantes de estabilidad para **4** y sus diferentes iones metálicos correlacionan muy

bien para con las de maltol y Hdpp, ocupando una posición intermedia entre el menos poderoso ligante maltol y el más poderoso ligante Hdpp (figura 47).

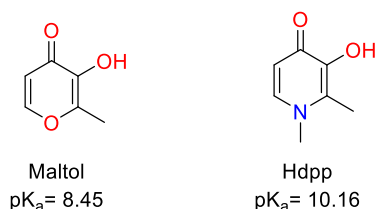


Figura 47. Estructuras de maltol y Hdpp con sus respectivos valores de pK_a .

5.1.4 Efectos de la complejación en la fluorescencia de 4.

Los efectos de coordinación de los metales descritos anteriormente en las propiedades ópticas de **4**, en general siguen el patrón típico observado con diferentes metales y ligantes cromo/fluorogénicos.⁶⁸ El máximo de absorción en UV-vis se desplaza hacia longitudes de onda mayores de forma no selectiva debido a las interacciones electrostáticas de los cationes con los pares libres adyacentes al sistema π del ligante. Los cationes paramagnéticos inducen una mayor extinción de la fluorescencia, el catión pesado diamagnético Pb^{2+} también induce la extinción de la fluorescencia y los cationes diamagnéticos ligeros (Al^{3+} , Zn^{2+} , Sn^{4+}) aumentan la fluorescencia actuando como se describe en el esquema 1 para Zn^{2+} . Efectos similares son observados para **1** como ligante fluorescente aunque Pb^{2+} aumenta la fluorescencia de **1** en metanol.⁶⁹

Los resultados de este estudio resumidos en la tabla 5 señalan aspectos ignorados del efecto de coordinación del metal en la fluorescencia de los ligantes unidos; su fuerte dependencia en el número de ligantes unidos (ver columnas I_{ML}/I_L and I_{ML_2}/I_L). Con todos los cationes excepto Cu^{2+} y Fe^{2+} , los cuales extinguen por completo la fluorescencia en ambos complejos ML^+ and ML_2 , se observa una más fuerte fluorescencia del complejo ML^{n-1} por sobre el complejo ML_2^{n-2} y a veces sobre el ligante libre. Particularmente se observa una gran diferencia para Me_2Sn^{2+} , Al^{3+} y Ga^{3+} . Estos cationes inducen un fuerte aumento en la intensidad de la fluorescencia

en los complejos ML comparando con ligante libre, pero una extinción de la misma para los complejos ML_2^{n-2} .

Las observaciones ocasionales para este efecto se encuentran en la literatura. Así los complejos 1:1 de organoestaño con **1** son fuertemente fluorescentes, pero los complejos con dos moléculas de **1** tienen fluorescencia casi nula.⁷⁰ El efecto es atribuido al hecho de que los complejos 1:1 son pentacoordinados, mientras que los complejos 1:2 son hexacoordinados, aunque no quedó claro por qué el número de coordinación era importante.

Recientemente se ha reportado una mayor dependencia de la fluorescencia de los complejos Al^{3+} con ligantes derivados de 8-hidroxiquinolina en su estructura.⁷¹ La intensidad de la fluorescencia del complejo con un ligante trípode, donde el ion metálico se une a tres unidades de 8-hidroxiquinolina, es similar a la del ligante libre, pero la fluorescencia de un ligante que contiene una única unidad de 8-hidroxiquinolina incrementa la fluorescencia por un factor de 100 en un complejo 1:1. Se concluyó entonces que “la densidad de carga en el Al(III) es modulada por el número de grupos quelantes y sus cargas formales, lo que influye en la transferencia de carga intramolecular fotoinducida (ICT) hacia el fluoróforo, lo cual tiende a extinguir la emisión de la fluorescencia”⁷¹

Los resultados pertinentes pueden ser encontrados en estudios previos de fluorescencia de complejos de Al^{3+} con el flavonol **1**, aunque son un poco confusos. En un estudio anterior se reportó la formación de una serie de complejos de estequiometría variable dependiendo de la acidez o basicidad del medio ajustado por adiciones de $HClO_4$, $KOAc$ o $NaOH$ en metanol puro.⁷²

Los complejos de estequiometría 1:1, que en algunos casos son especies metálicas poliméricas (del tipo M_nL_n) son fluorescentes, pero los complejos del tipo ML_2 carecen de fluorescencia en acuerdo con nuestras observaciones para los complejos de **4** con Al(III).

En un estudio más reciente,⁷³ únicamente el complejo ML_2 fue observado en disoluciones neutra y básica de metanol, pero en una mezcla acuosa al 50% de metanol a pH 6 ambos complejos ML y ML_2 fueron observados mediante titulaciones espectrofotométricas con altas constantes de estabilidad $\log\beta_{1:1} = 5.17$ y $\log\beta_{1:2} = 9.91$.⁷⁴ Las propiedades fluorescentes de los complejos no fueron medidas, pero en otro estudio realizado⁴⁶ el complejo AlL_2^+ con **1** fue reportado como muy fluorescente en ambos medios, metanol y mezcla de agua-metanol. Finalmente, en el ligante **1** con el grupo metóxido como sustituyente en el anillo de fenilo, en una mezcla 95% metanol-5% agua que contiene 0.01-10 mM $HClO_4$ solamente AlL^{2+} es decir, 1:1 que tiene una alta intensidad de la fluorescencia fue detectado.⁷⁵ Interesantemente, en este estudio la estabilidad de los complejos de $Zn(II)$, $Cd(II)$ y $Pb(II)$ aumentó fuertemente con la disminución en las concentraciones del ácido, esto en concordancia con el modo de unión de **2** (ver figura 19), reacción (1), pero la estabilidad del complejo de $Al(III)$ fue independiente de $[HClO_4]$ lo que indica una posible complejación fuerte entre el metal y la forma neutra del ligante sin suponer una desprotonación concomitante. Este aspecto puede ser motivo de controversia debido a que en disoluciones de metanol, la desprotonación postulada generalmente no está confirmada, pero debido a la baja polaridad de las soluciones de metanol comparadas con agua, una complejación muy eficiente con el grupo OH puede ciertamente tomar lugar bajo ciertas condiciones y los complejos discutidos pueden contener el ligante **1** en forma neutra o aniónica.

En ejemplos más recientes, complejos 1:2 no fluorescentes y complejos 1:1 fluorescentes de Cu^{2+} con **1** en metanol han sido observados.⁷⁶ Conforme a los resultados encontrados en el presente estudio, se puede suponer que la disminución de la fluorescencia de los complejos 1:2 en comparación con los complejos 1:1 es un fenómeno general para ligantes derivados de 3-hidroxi piranona y 3-hidroxi piridinona. El análisis mecánico cuántico detallado de este fenómeno (ver Anexo 7.1) empleando el método de Orbitales Naturales transitorios (*Natural Transition Orbital analysis*) de los estados basal y excitado de las especies LH , AlL^{2+} and AlL_2^+ muestra que la fluorescencia del complejo AlL_2^+ se apaga por el proceso

de transferencia interna de electrón que no existe en el complejo 1:1 AlL^{2+} . El mecanismo de la extinción de fluorescencia elaborado con base en los resultados de este trabajo para el complejo ML_2 de $Al(III)$ y **4** debe ser válido para otros metales diamagnéticos ligeros y ligantes aromáticos O,O-quelatantes tales como 3-hidroxi-pirranonas, 3-hidroxi-piridinonas y 3-hidroxi-quinolonas además para catecoles. Vale la pena mencionar que el efecto de la composición mostrado en este estudio es importante para el diseño de nuevos receptores porque con frecuencia se propone el uso de ligantes di- o tri-topicos para lograr la mayor afinidad al metal, pero tales ligantes pueden sufrir de la pérdida de intensidad de fluorescencia en respuesta con la complejación con metal tal como ocurre con éste en complejos tipo ML_2 descritos en este trabajo.

5.2 Receptores urea y tiourea con fragmentos (2-hidroxifenil)-benzimidazol para reconocimiento de iones metálicos y aniones

Actualmente hay un gran interés por el desarrollo de sensores con funciones múltiples (*multiple-channel sensing*) que permiten detectar más que un analito, típicamente varios cationes metálicos, empleando el mismo sensor.⁷⁷ Es por eso que, en este trabajo intentamos avanzar en esta dirección construyendo nuevos sensores bifuncionales capaces de detectar tanto cationes metálicos como aniones. Los aniones juegan un rol fundamental en muchos fenómenos, incluidos procesos biológicos, tales como el transporte de hormonas, proteínas, biosíntesis, regulación de ADN y la actividad de enzimas.⁷⁸ El reconocimiento y la detección de aniones es uno de los actuales objetivos del reconocimiento molecular.⁷⁹ Los importantes roles que juegan los aniones han inspirado a los químicos a dedicar esfuerzos significativos hacia el diseño de quimiosensores prácticos para la detección de distintos aniones, tanto de manera cualitativa como cuantitativa. En todos los sistemas biológicos y/o ambientales, los cationes metálicos coexisten con las especies aniónicas; por ejemplo, las células de mamíferos contienen $Zn(II)$ ⁸⁰ $Cu(II)$,⁸¹ $Mg(II)$ ⁸² y otros cationes junto con fosfatos de diferentes tipos (nucleótidos,

azúcares y proteínas fosforiladas, así como el fosfato inorgánico), cloruro y varios carboxilatos. Por eso la posibilidad de utilizar el mismo sensor para diferentes especies puede tener cierto interés práctico.

Inicialmente intentamos obtener receptores bifuncionales en base de 3-hidroxiquinolonas como centros de reconocimiento de cationes incorporando a ellas los sitios capaces de reconocer aniones. Sin embargo, resulto imposible modificar una hidroxiquinolona conservando intacto su centro de quelatación de metales. Fue por eso que se sintetizó un derivado del (2-hidroxifenil)benzimidazol con el que se obtuvieron resultados. El (2-hidroxifenil)benzimidazol a su vez es conocido por tener propiedades tipo ESIPT al igual que la 3-hidroxiquinolona (ver Antecedentes), que se modifican de manera parecida por complejación con metales (figura 48, comparar con la figura 39). Con el propósito de obtener un receptor bifuncional capaz de reconocer tanto metales como aniones, dicho fragmento fue ligado a la urea **5** y a las tioureas **6** y **7**, ya que las ureas aromáticas son poderosos receptores de aniones en medios apróticos.⁷⁸ De estos tres receptores, la urea **5** es la menos ácida al tener oxígeno y la tiourea **7** es la más ácida (tiourea $pK_a=21.1$ y urea $pK_a=26.9$ ambas en DMSO)⁸³ al tener dentro de su estructura al azufre y el grupo NO_2 .

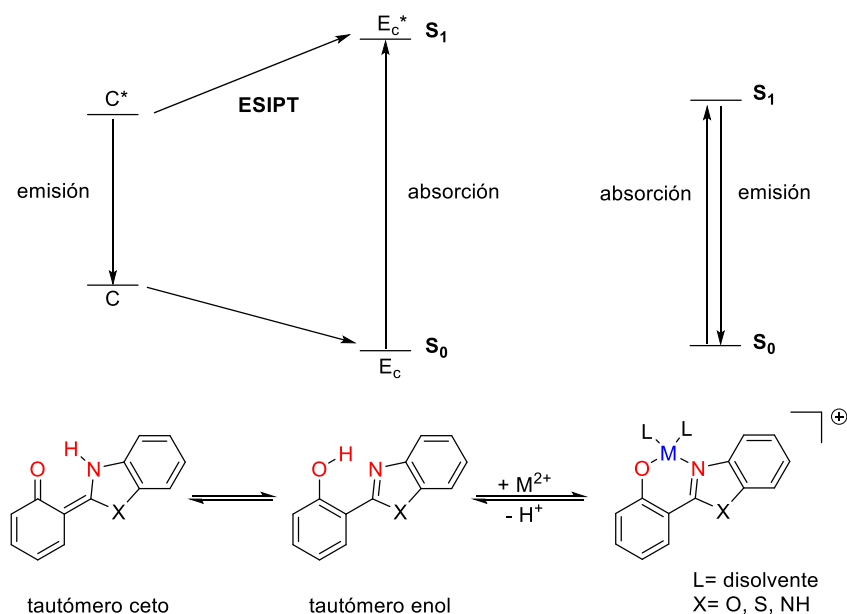
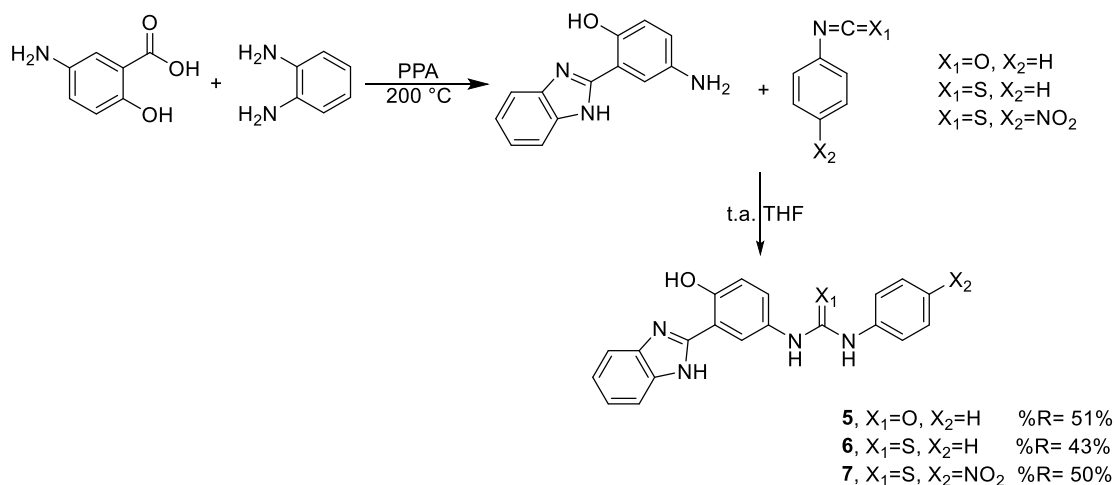


Figura 48. Transferencia de protón intramolecular en el estado excitado y bloqueo de ESIPT por medio de un ion metálico en 2-hidroxifenilbenzimidazol²⁵

La síntesis de la urea **5** y las tioureas **6** y **7** se muestra en el esquema 6. En la primera etapa de la ruta seguida, fue obtenido un derivado de (2-hidroxifenil)benzimidazol funcionalizado con el grupo amino que después fue tratado con isocianato o isotiocianato correspondiente, según sea el caso.



Esquema 6. Síntesis de las urea/tioureas 5-7 derivadas del 2-hidroxifenilbenzimidazol

5.2.1 Estudio de la tiourea 7

En la primera etapa buscamos caracterizar las propiedades ácido-base de la tiourea **7**, por lo que se probaron distintos medios de reacción para ésta misma, esto debido a la baja solubilidad de la tiourea **7** en medio acuoso. El uso de solubilizantes “supramoleculares” tales como micelas de HTAB o ciclodextrinas en este caso no fue exitoso. Por otro lado, la solubilidad fue suficiente en un medio de reacción con una mezcla de agua con 40% metanol lo que permitió la medición de pH confiable, y posteriormente se calculó el pKa de la tiourea **7** en este medio, (figura 49a). Los pKa calculados, $pK_{a1}=4.8\pm 0.1$ y $pK_{a2}=8.9\pm 0.1$ (figura 49b) son cercanos a los pKa correspondientes de 2-hidroxifenilbenzimidazol (Tabla 2) y por analogía pueden atribuirse a la desprotonación de la especie protonada en el benzimidazol y al grupo fenólico respectivamente. Un débil efecto del grupo tiourea a pKa fenólico corresponde a pequeña constante de Hammet $\sigma_p = 0.07$ de este grupo (el valor

reportado es para el grupo NHCSNH₂)⁸⁴ y el efecto sobre pK_a de benzimidazol debe ser débil por la larga distancia del sustituyente. Por arriba de pH 4.8 y debajo de pH 8.9 se encuentra la especie neutra y por arriba de pH 8.9 existe la especie aniónica monodesprotonada.

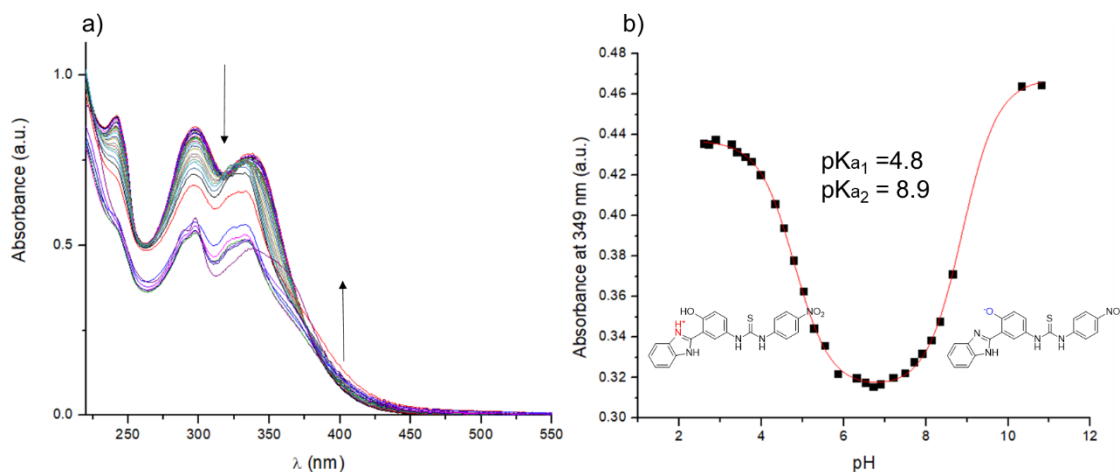


Figura 49. (a) Espectros de UV-Vis de 7 en dependencia del pH (b) perfil de absorción a la longitud de onda 349 nm de pH para la tiourea 7 en mezcla agua + 40% (v/v) de metanol

5.2.2 Reconocimiento de aniones con la tiourea 7

Se hicieron pruebas de asociación de la tiourea **7** con distintos aniones (AcO⁻, F⁻, Cl⁻, H₂PO₄⁻) éstos con tetrabutilamonio, NBu₄⁺ como contraión y Me₄NOH en DMSO, un disolvente aprotico que no compite con el receptor por formar puentes de hidrogeno con aniones. Se empleo la espectroscopía UV-Vis y RMN ¹H, puesto que la tiourea **7** no fluoresce (ya que contiene en su estructura el grupo NO₂ que típicamente sirve como un apagador interno) no se hicieron pruebas de fluorescencia. Primero, se probó con el ion acetato (AcO⁻) mediante espectroscopia UV-Vis (figura 50a,b) que indica la existencia de dos procesos de reconocimiento a baja y alta concentración del acetato, reflejado claramente en el perfil de concentración del ion AcO⁻ vs. absorbancia a 342 nm (fig. 50c). En el primero, a bajas concentraciones de AcO⁻ la absorbancia crece fuertemente en el intervalo 400-500 nm con un punto isobéstico en 368 nm (figura 50a), lo que es característico para la desprotonación de los NH de la tiourea,⁸⁵ y en el segundo a

más altas concentraciones hay un ligero cambio opuesto (Figura 50b) que probablemente refleja una interacción débil del acetato con grupos NH y OH del receptor. El ajuste formal del perfil Absorbancia vs. Concentración de acetato para el primer proceso al hombro a 500 nm, que debe pertenecer a la forma desprotonada, (Figura 50d), permite calcular la constante de equilibrio formal $K_{\text{obs}} = (1.5 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

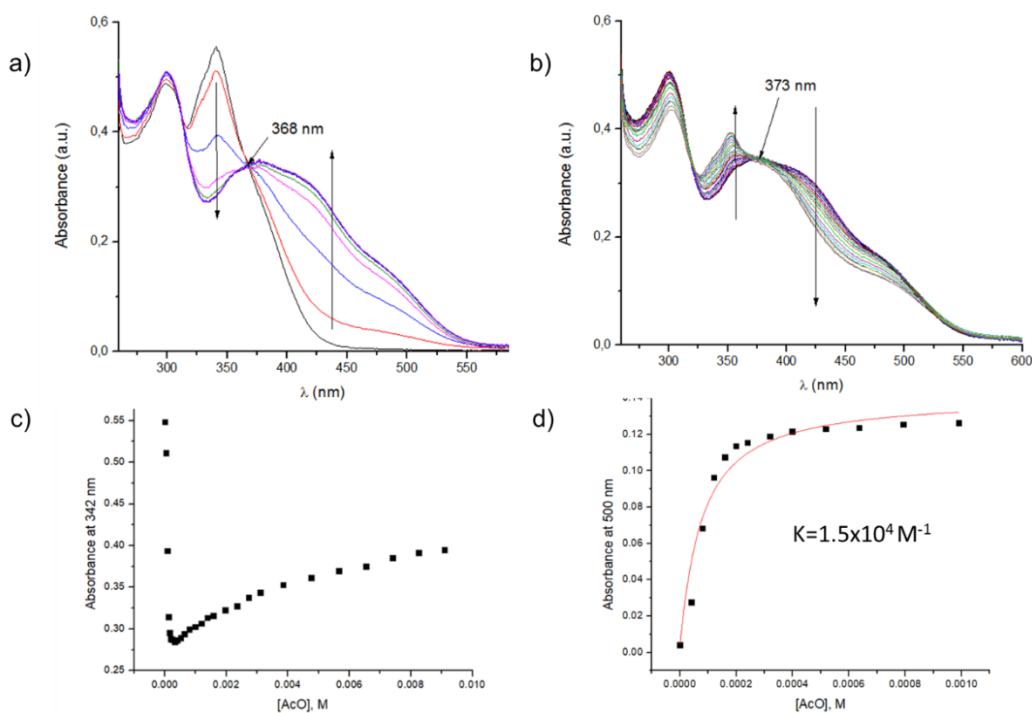


Figura 50. Titulación de tiourea 7 ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$) en DMSO con (a) $[\text{AcO}^-]$ $0-2.4 \times 10^{-4} \text{ M}$, (b) $[\text{AcO}^-]$ $3.2 \times 10^{-4} - 9.1 \times 10^{-3} \text{ M}$, (c) perfil de absorbancia vs. la concentración de AcO^- a 342 nm, (d) perfil de concentración a 500 nm

Para aclarar más la situación, hemos hecho la titulación con $(\text{NMe}_4)\text{OH}$, figura 51. También se observan dos procesos. A baja concentración de hidróxido (Fig. 51a), los cambios son muy parecidos a los de AcO^- , pero a alta concentración de OH^- crece otro máximo a 484 nm (Fig. 51b), característico para un anión de para-nitrofeniltiourea.⁸⁵

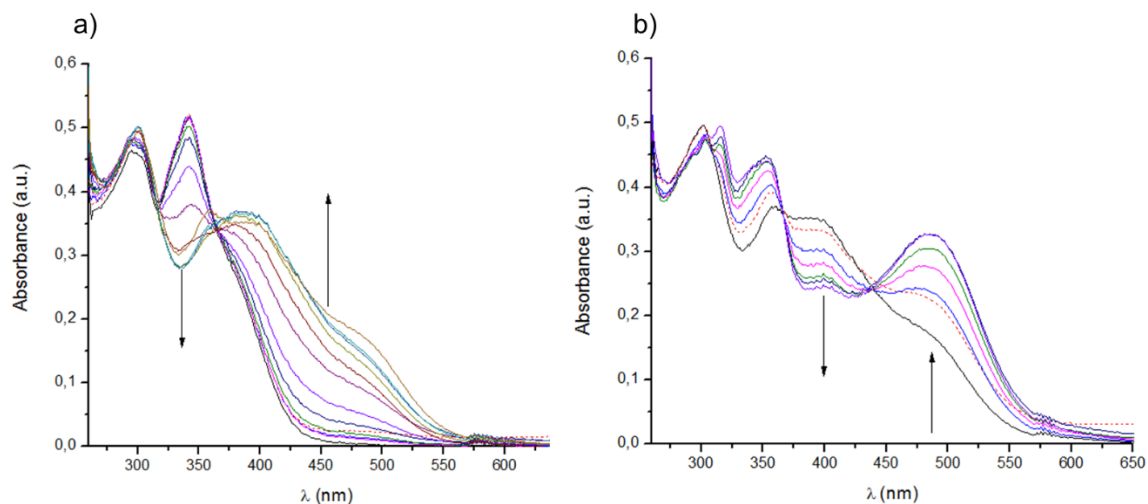


Figura 51. Titulación de 2×10^{-5} tiourea 7 en DMSO con una concentración variable de NMe_4OH , desde (a) $0-1.6 \times 10^{-4}$ M, hasta (b) $2 \times 10^{-4} - 4.2 \times 10^{-4}$ M

La similitud de los cambios espectrales en las figuras 50a y 51a indica que el acetato y el NMe_4OH desprotonan al receptor, pero en el caso de acetato de manera incompleta. La desprotonación también es evidente en los espectros de RMN ^1H de 7 porque la adición de un equivalente de acetato (figura 52) elimina las señales de todos los protones de OH y NH y desplaza las señales de los protones aromáticos a campo alto.

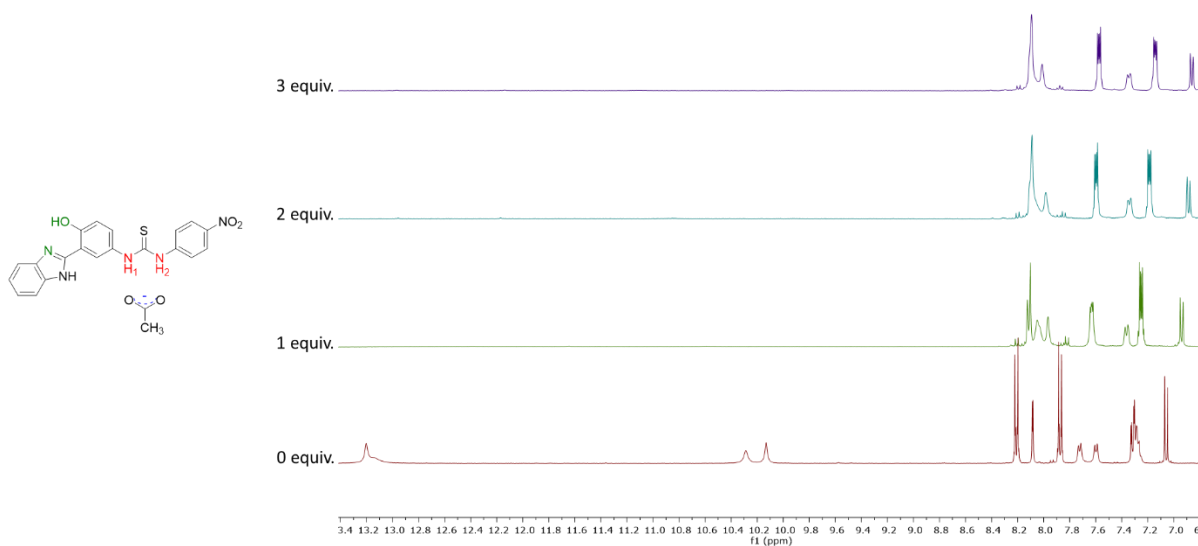


Figura 52. Apilado de espectros de RMN ^1H para la [tiourea 7]= 10 mM con $\text{NBu}_4^+\text{AcO}^-$ (10-30 mM) en DMSO-d_6

Por el tipo de cambios que se presentan en UV-Vis se deduce que, las concentraciones bajas de hidróxido y de acetato no desprotonan por completo el grupo tiourea (el máximo a 500 nm aparece solo como el hombro), sin embargo, pueden desprotonar los grupos fenólico y benzimidazólico ya que desaparecen sus señales en el espectro RMN. Esto está en acuerdo cualitativamente con los valores de pK_a de estos grupos en DMSO que crecen en el siguiente orden: benzimidazol (pK_a 16.4) < fenol (pK_a 18.0) < difenilurea (pK_a 19.5).⁸⁶ El crecimiento de la absorbancia arriba de 400 nm en presencia de acetato o bajas concentraciones de hidróxido que se ve como desprotonación incompleta del grupo tiourea en realidad puede ser el resultado de un equilibrio tautomérico entre las formas mono-desprotonadas de **7** por grupos OH o NH (figura 53) generando una fracción de la forma desprotonada por el grupo tiourea cual es responsable por observación del hombro a 500 nm.

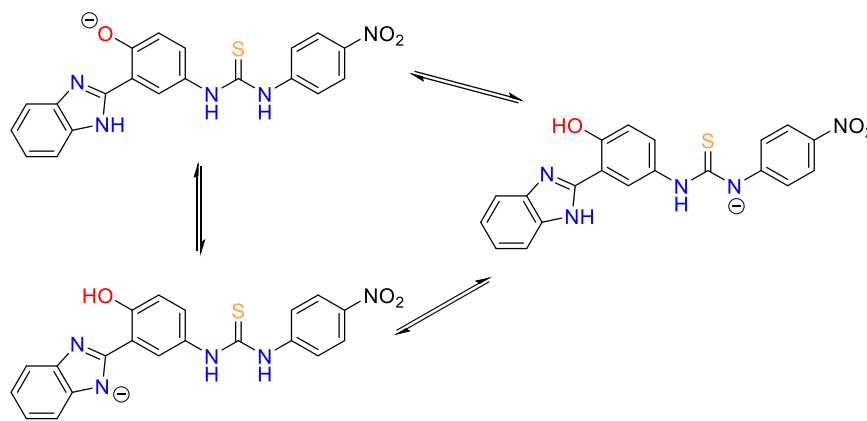


Figura 53. Equilibrios tautoméricos en la forma desprotonada de **7**.

Para el ion fluoruro, el cual es mucho más básico que acetato en DMSO (el pK_a de HF es 15.0 y de AcOH 12.6)⁸⁶ observamos para la titulación por UV-Vis un comportamiento similar al hidróxido (figura 54a), el espectro con línea punteada en azul indica que la concentración de ion fluoruro y del receptor son las mismas $[F]:[R]=1:1$, y al final de la titulación se ve que la concentración del ion fluoruro es 8 veces mayor que la concentración del receptor $[F]:[R]=8:1$. Cabe mencionar que es posible detectar fluoruro a una concentración tan baja como 5 μM por el cambio de color (Figura 54b).

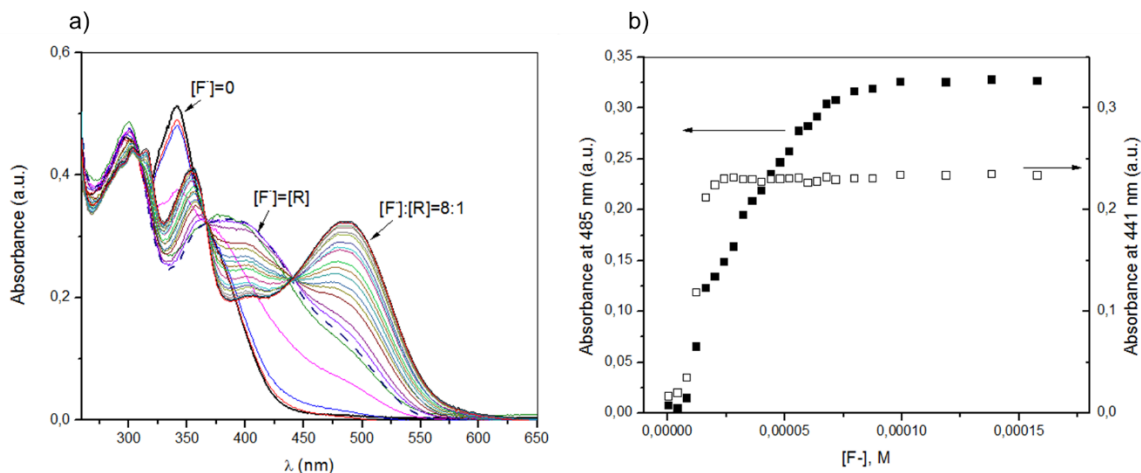


Figura 54. (a) Titulación de la [tiourea 7]= 2×10^{-5} M con NBu_4^+F^- (4-909 μM) en DMSO, seguida por espectrofotometría UV-Vis y (b) perfil de absorbancia vs. concentración para la tiourea 7 a 485 nm (izquierda) y 441 nm (derecha) con el ion fluoruro

En el caso del muy poco básico ion cloruro ($\text{NBu}_4^+\text{Cl}^-$) (pK_a de HCl es 1.8) mediante la titulación por UV-Vis se observa un cambio espectral no significativo. Para las pruebas realizadas por RMN ^1H , se observa que existe un desplazamiento de las señales de los NH que corresponden a la tiourea, para el NH_1 el desplazamiento va de 10.13 hasta 10.58 ppm, y para el NH_2 el desplazamiento va de 10.29 a 11.08 ppm. La constante calculada $K=42 \text{ M}^{-1}$ sugiere la formación de un complejo por puentes de hidrógeno (figura 55).

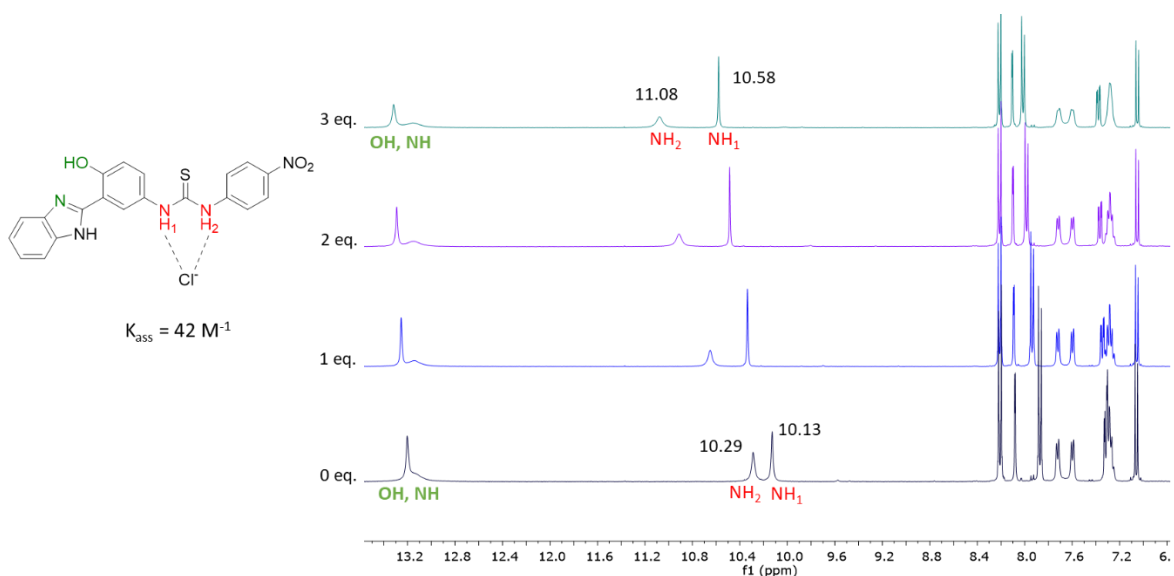


Figura 55. Apilado de espectros de RMN ^1H para la [tiourea 7]= 10 mM con $\text{NBu}_4^+\text{Cl}^-$ (10-30 mM) en DMSO-d_6 .

Una de las ventajas del estudio mediante RMN ^1H es que nos proporciona información estructural. En el caso de los protones aromáticos, la asignación de los mismos se muestra en la figura 56. En la parte inferior (figura 56b) se muestra la parte del espectro que incluye a los protones que corresponden a los aromáticos de la tiourea **7** libre, es decir, sin complejar, donde se puede observar que los protones **H₇**, **H₉** y **H₁₀** se encuentran dentro de un mismo conjunto de señales que está alrededor de 7.30 ppm. Cuando lo comparamos con el espectro superior (figura 56a), el cual tiene un exceso del ion cloruro (2 equiv.), se observa que el conjunto de señales se convierte en señales más definidas, es decir, en un multiplete en 7.28 ppm para los protones **H₉** y **H₁₀** y un doble de dobles en 7.37 ppm que corresponde al protón señalado como **H₇** del fragmento hidroxifenilo, el desplazamiento de **H₇** a campo más bajo puede ser debido a la cercanía que existe entre el protón **H₇** con el puente de hidrógeno que se forma entre los NH de la tiourea con el ion cloruro. Las demás señales se conservan y solo los protones orto **H₃** y **H₄** del grupo nitrofenilo se desplazan a campo bajo aún más fuertemente que **H₇** indicando eventualmente su contribución en la complejación con cloruro mediante puentes de hidrógeno.

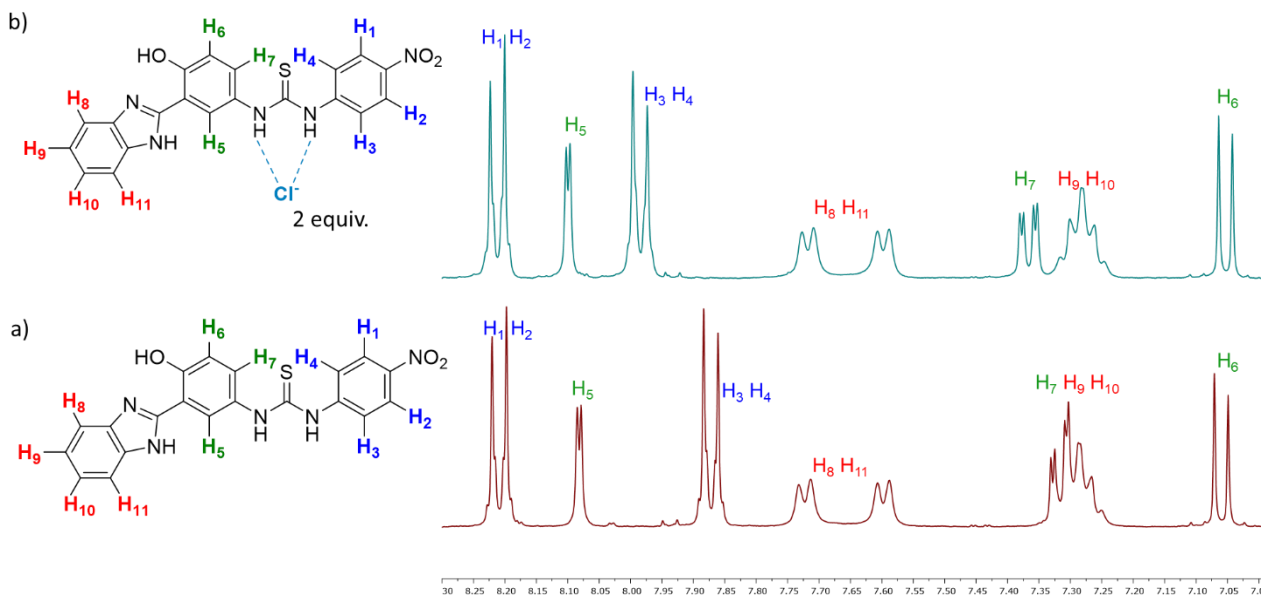


Figura 56. Asignación de protones en los espectros de RMN ^1H para la [tiourea **7]= 10 mM con DMSO- d_6 como disolvente para (a) la tiourea libre y (b) la tiourea con el ion $\text{NBu}_4^+\text{Cl}^-$ 1:2**

En cuanto al anión dihidrogenofosfato, el apilado de espectros de RMN ^1H para la tiourea **7** y H_2PO_4^- muestra que la desprotonación es inmediata en el caso de los hidrógenos de los NH de la tiourea así como los protones del OH y NH pertenecientes al benzimidazol, ya que a partir de la adición de un equivalente del anión desaparecen las señales de los protones correspondientes a los NH de la tiourea (figura 57), en el caso de los protones aromáticos se observan desplazamientos de señales inespecíficos.

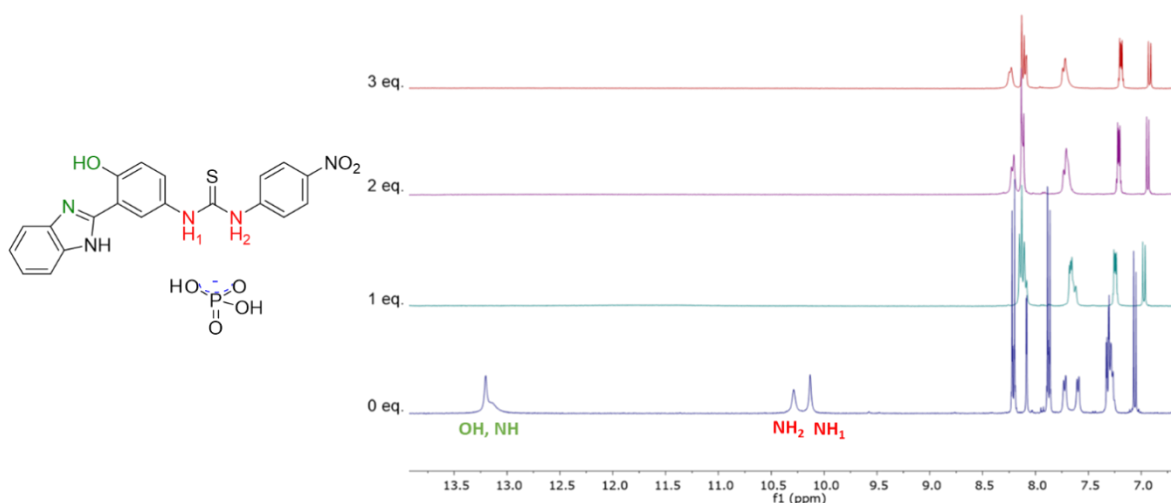


Figura 57. Espectros de la titulación seguida por RMN ^1H para la [tiourea **9**]= 10 mM con H_2PO_4^- (10-30 mM) en DMSO-d_6 .

5.2.3 Estudio de la tiourea **7** con Zn(II) mediante RMN ^1H

Las pruebas de complejación de **7** con cationes metálicos divalentes (Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb, Hg) por espectroscopía de UV-Vis en 40% (v/v) MeOH acuoso a pH 7 mostraron una interacción débil y la formación de precipitados. Se realizó un estudio de RMN ^1H en DMSO-d_6 para la tiourea **7** con la sal $\text{Zn}(\text{OTf})_2$. De donde se puede concluir que la interacción aun en medio no-acuoso es muy débil ya que el desplazamiento de los protones que corresponden al NH y OH del benzimidazol es insignificante.

También se observa que dada la débil interacción (debido a que se encuentra en DMSO como disolvente en forma de ligante neutro) solo se ven afectados los protones H_8 y H_{11} con un desplazamiento casi nulo y un visible ensanchamiento de las señales de NH y OH del hidroxifenilbenzimidazol (figura 58).

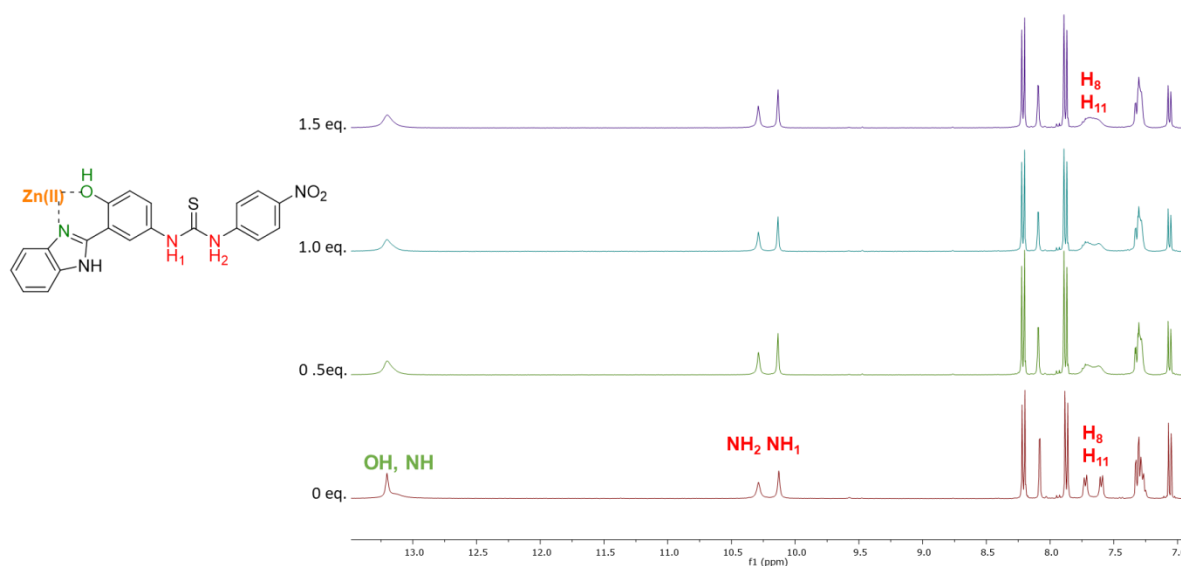


Figura 58. Espectros de la titulación seguida por RMN 1H de la [tiourea 7]= 10 mM con $Zn(OTf)_2$ (5-15 mM) en $DMSO-d_6$

5.2.4 Reconocimiento de iones metálicos y aniones para la tiourea 6

Por otro lado, la tiourea **6** al no tener el fragmento NO_2 , presenta buenas propiedades de fluorescencia, por lo que se hicieron los estudios correspondientes. además de estudios por espectroscopía de RMN 1H de reconocimiento de aniones, todos con tetrabutilamonio como contraión.

Para el caso particular del ion acetato, el cambio en el espectro UV-Vis es muy ligero y comprueba la ausencia de la desprotonación. En la figura 59a,b se muestran los espectros de emisión para la titulación de la tiourea **6** con $NBu_4^+AcO^-$, donde se observa primero una disminución de la fluorescencia y posteriormente un aumento de fluorescencia en 500 nm. El ajuste de estos datos con HypSpec muestra la formación de complejos de estequiometría 1:1 y 1:2 con valores de $K_1 = 2.7 \times 10^6 M^{-1}$ y $K_2 = 6800 M^{-1}$ para la formación de complejos con uno y dos aniones de acetato.

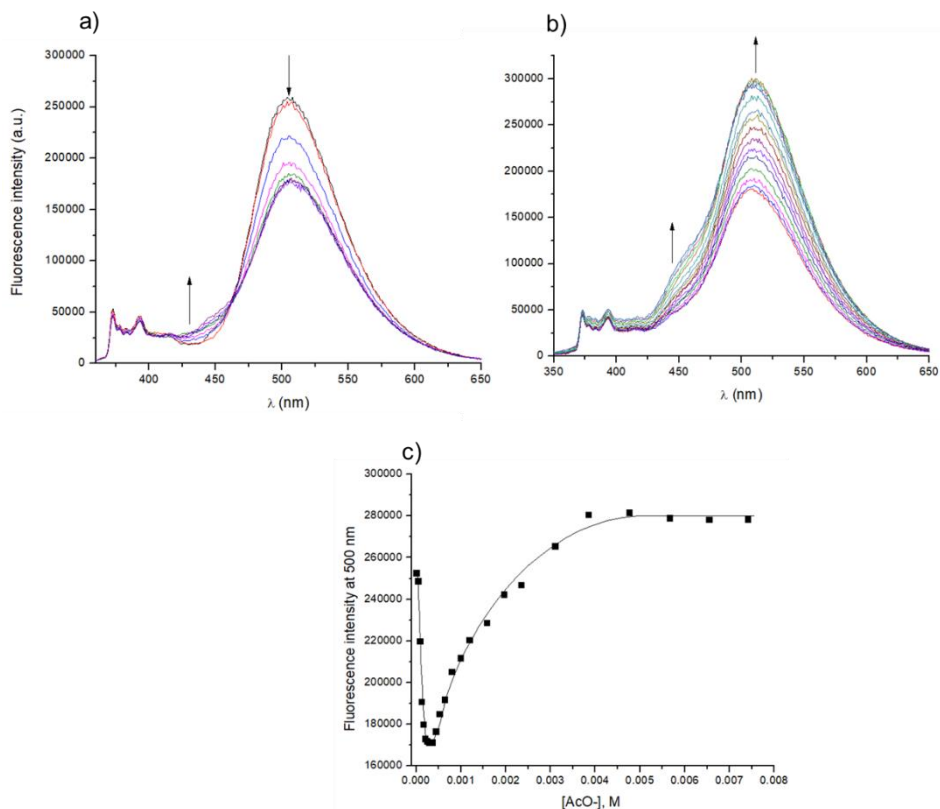


Figura 59. Espectros de emisión para la titulación de [tiourea 6] = 2×10^{-5} M con $\text{NBu}_4^+\text{AcO}^-$ en DMSO, (a) acetato $0-2.8 \times 10^{-4}$ M, (b) acetato $3.5 \times 10^{-4} - 7.42 \times 10^{-3}$ M, (c) perfil de intensidad de emisión vs. concentración para la emisión a 500 nm.

En la figura 60 se muestran los espectros de RMN ^1H para la titulación de la tiourea **6** con acetato donde se observa que las señales para los NH de la tiourea libre están en 9.70 y 9.64 ppm y posteriormente al tener un exceso del ion AcO^- ambas señales se convierten en una sola señal que se ensancha con un desplazamiento químico de 12.11 ppm. El ensanchamiento de dichas señales se puede atribuir a que el equilibrio dinámico entre el receptor libre y acomplexado está en escala de tiempo intermedio para espectroscopia de RMN, es decir el tiempo de vida del complejo no es suficientemente largo para observar señales de las formas libre y acomplexada por separado con su ancho normal, pero tampoco es suficientemente corto para observar un señal promedio estrecho.

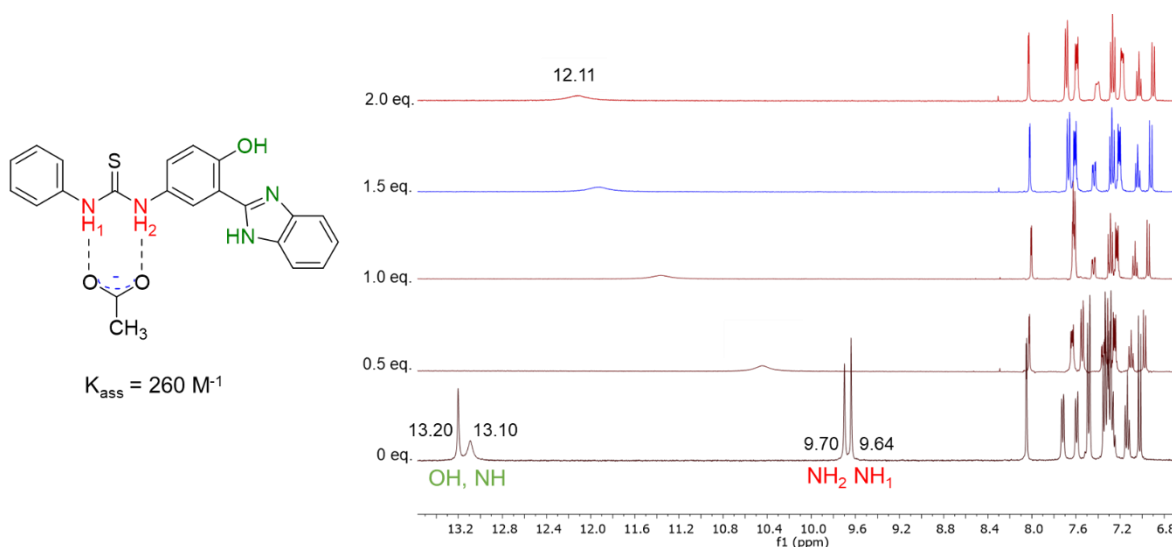


Figura 60. Espectros de la titulación seguida por RMN ^1H para la [tiourea **6]= 10 mM con $\text{NBu}_4^+\text{AcO}^-$ (5-20 mM) en DMSO-d_6 .**

El desplazamiento de las señales a campo bajo indica la formación de un complejo por enlaces de hidrógeno (ver estructura en la figura 60) y el análisis numérico de los resultados da un valor de la constante de asociación de 260 M^{-1} . Esta constante es mucho menor que las constantes estimadas de los datos obtenidos por fluorescencia. Además, las señales de los protones del grupo hidroxibenzimidazol desaparecen desde la primera adición del acetato. Esto indica que los cambios en fluorescencia no están asociados a la complejación del acetato por el grupo tiourea y reflejan la interacción con los grupos OH y NH del hidroxifenilbenzimidazol que probablemente interactúan con anión más fuertemente por ser más ácidos que NH de urea (ver arriba).

La interacción de la tiourea **6** con el ión fluoruro fue acompañada por un fuerte aumento de la fluorescencia; sin embargo, mostró un perfil de concentración del anión inesperadamente complicado que no se ajusta a un modelo de interacción sencillo 1:1 y probablemente refleja una agregación del receptor inducida por fluoruro.

Otro de los aniones probados fue el H_2PO_4^- donde en el estudio por RMN ^1H se observa que hay un desplazamiento de los protones de los NH de la tiourea y un ensanchamiento conforme se aumenta la concentración de aniones H_2PO_4^- , mientras que las señales de NH y OH del benzimidazol desaparecen casi desde la primer adición del anión H_2PO_4^- (figura 61).

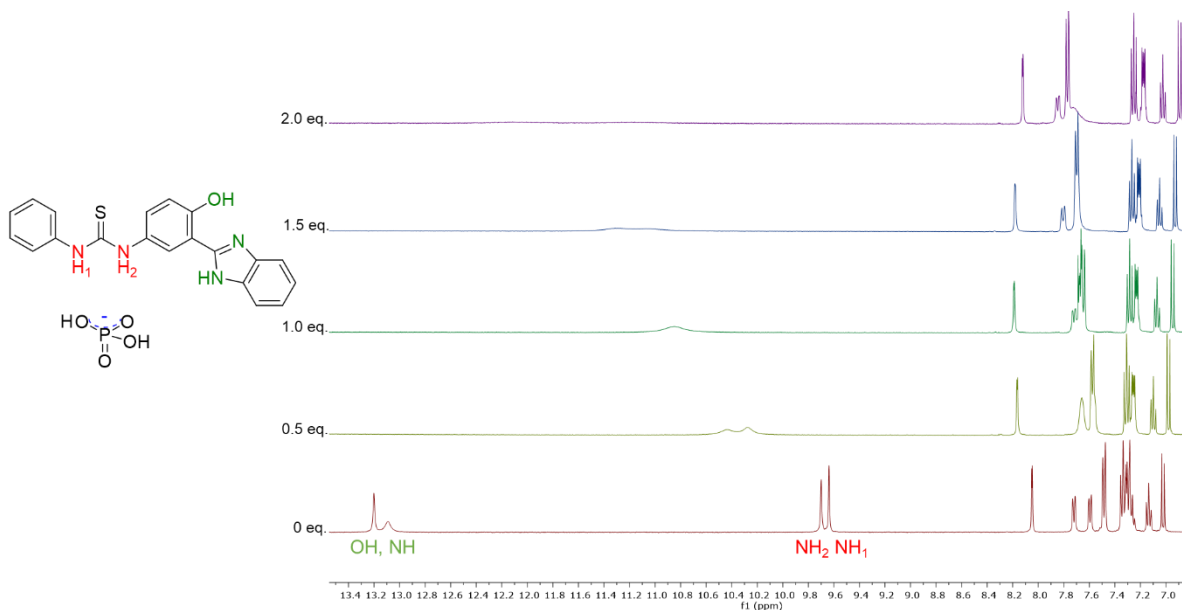


Figura 61. Espectros de RMN ^1H para la titulación de la [tiourea 6]= 10 mM con el anión H_2PO_4^- (5-20 mM) en DMSO-d_6

En el apilado de espectros que incluye la parte de las señales de protones aromáticos no es posible ver con mucho detalle las señales que involucran a los protones que se asocian con el anión fosfato, por lo que se presentan en la figura 62 una ampliación. Se puede observar que el desplazamiento que ocurre en los protones de los NH de la tiourea va desde 9.70 y 9.64 ppm a 12.07 y 11.15 ppm en la última adición que equivale a 2 equiv. del anión fosfato con respecto a la tiourea 6. Por otro lado, en el caso de los protones que corresponden al OH y NH del benzimidazol, se observa que aun en la primera adición del anión fosfato (que equivale a 0.5 equiv. del anión con respecto a la tiourea 6) se ve un desplazamiento así como un ensanchamiento de la señal que va desde 13.20 y 13.10 ppm a 13.68 ppm con un ensanchamiento de la señal y su posterior desaparición, lo que sugeriría

una desprotonación. El ajuste numérico de estos datos permite estimar la constante de asociación $K_{\text{ass}} = 920 \text{ M}^{-1}$.

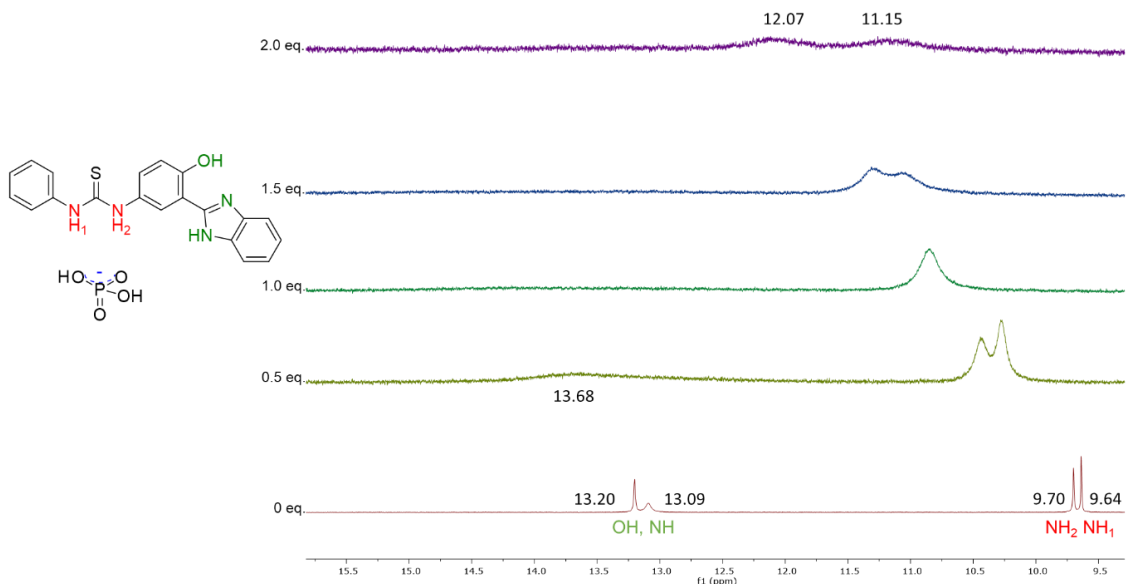


Figura 62. Ampliación de los espectros de RMN ^1H para las señales de NH_1 , NH_2 , NH y OH para la $[\text{tiourea } 6] = 10 \text{ mM}$ con el anión H_2PO_4^- (5-20 mM) en DMSO-d_6

Asimismo, para la titulación seguida por fluorescencia, en la figura 63 se ve que hay un aumento en la intensidad de la fluorescencia conforme incrementa la concentración de dihidrogenofosfato. El ajuste de este perfil da la constante de estabilidad $K = 630 \text{ M}^{-1}$ cercana a la constante determinada por RMN ^1H .

Figura 63. Espectros de emisión para la titulación de la $[\text{tiourea } 6] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ con el anión dihidrogenofosfato (4-740 μM)

Se hizo el estudio de la titulación para la tiourea **6** con el ion metálico Zn(II), donde se observa que no hay desplazamiento alguno de las señales de los NH de la tiourea y tampoco para los NH y OH pertenecientes al benzimidazol, los cuales solo sufren un ensanchamiento, por lo que podría considerarse que la interacción entre Zn(II) y **6** es débil (figura 64).

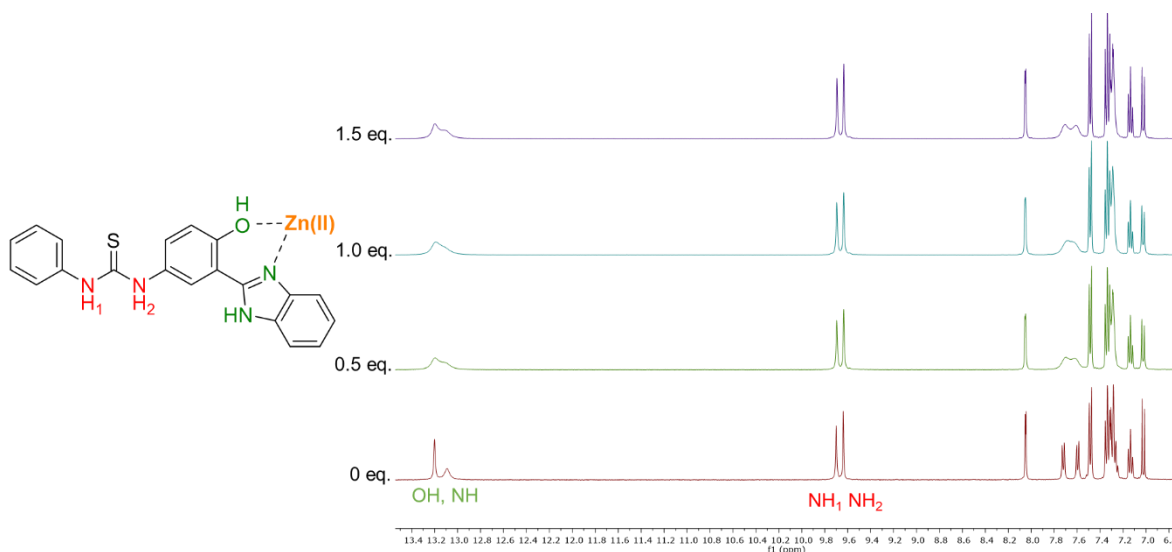


Figura 64. Espectros de RMN ¹H para la titulación de la [tiourea **6**]= 10 mM con Zn(OTf)₂ c en DMSO-d₆

Por otro lado, se realizó un estudio más detallado de la parte aromática de los espectros, haciendo una comparación entre el espectro inicial (figura 65a) al que se le asignaron las señales para los protones de la tiourea **6** libre y la tiourea **6** con 1.5 equiv. de Zn(II) (figura 65b), en donde estructuralmente se observa que los protones cercanos al sitio de complejación son los que más se ven afectados, es decir, los protones H₆ y H₉ del benzimidazol.

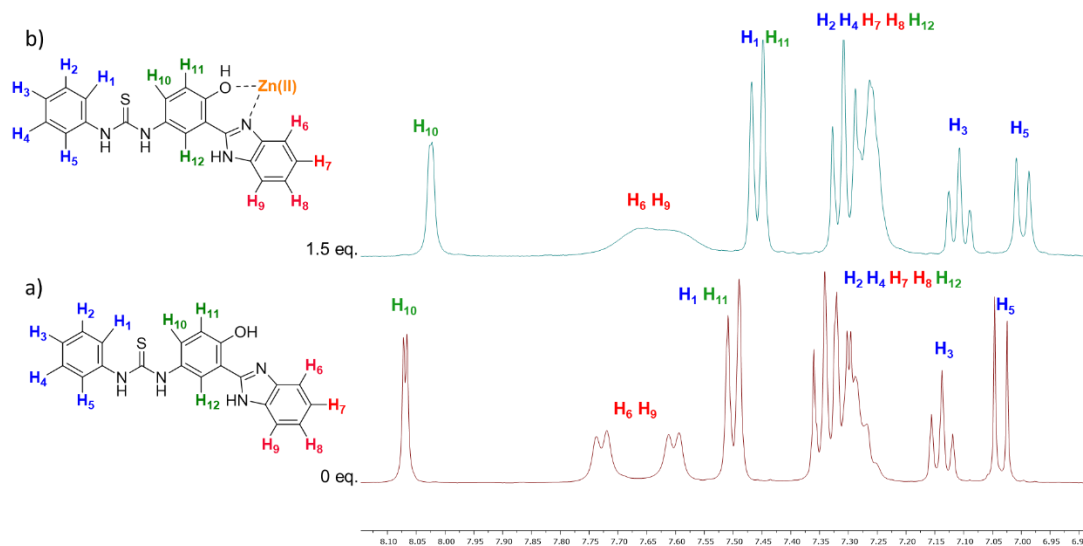


Figura 65. Asignación de señales de protón en (a) El espectro de RMN ^1H para [tiourea 6]= 10 mM y (b) espectro de tiourea 6 con 1.5 equiv. de Zn(II) en DMSO- d_6 .

La interacción débil con Zn(II) se confirmó posteriormente con su estudio por fluorescencia, donde se observó un efecto casi nulo para la complejación de la tiourea 6 con el Zn(II). Este mismo estudio de fluorescencia se hizo para otros iones metálicos con la tiourea 6 ya que cuenta con propiedades fluorescentes a diferencia de la tiourea 7. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 6 con sus respectivas constantes de asociación K_{eq} .

Tabla 6. Efecto en la fluorescencia para distintos iones metálicos con la tiourea 6 y su K_{eq}

M^{n+}	Efecto en la fluorescencia	K_{eq} [M^{-1}]
Eu(III)	Aumento por 10%	NC
Sn(IV)	Disminución por 10%	6×10^3
Cu(II)	Apagamiento completo	8×10^3
Zn(II)	Sin efecto	NC

Adicionalmente se hicieron pruebas de manera conjunta de fluorescencia para el anión acetato con el ion Zn(II), esto debido a que, los experimentos realizados para la tiourea 6 únicamente con el ion metálico Zn(II) mostraron que no existía respuesta

alguna, pero, para el caso del anión acetato hubo un cambio en la intensidad de la fluorescencia. Como se observa en la figura 66, en presencia de acetato los cationes de Zn(II) producen un cambio en la intensidad de la fluorescencia de **6**, sin embargo, el efecto es demasiado leve para permitir una estimación de la constante de asociación.

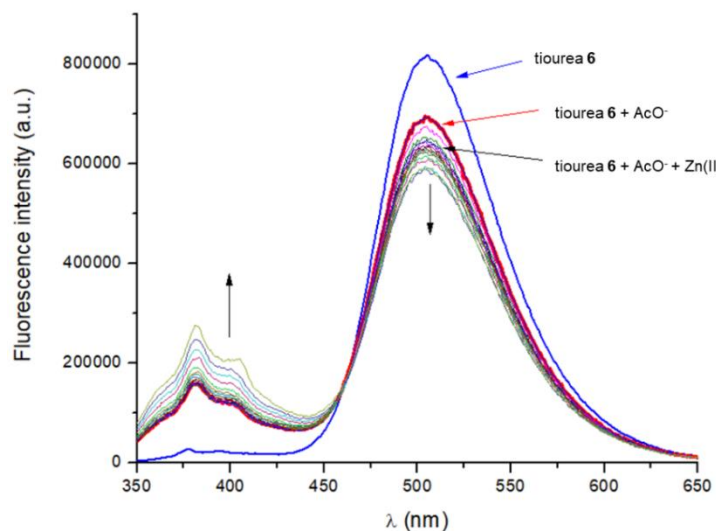


Figura 66. Espectros de emisión para la titulación de la $[tiourea\ 6]= 2 \times 10^{-5}\ M + [AcO^-]= 5 \times 10^{-4}\ M$ y adiciones de $Zn(OTf)_2$

Lo mismo se hizo para Cu(II), donde se ve que conforme aumentan las adiciones de Cu(II) hay una disminución en la intensidad de la fluorescencia (figura 67).

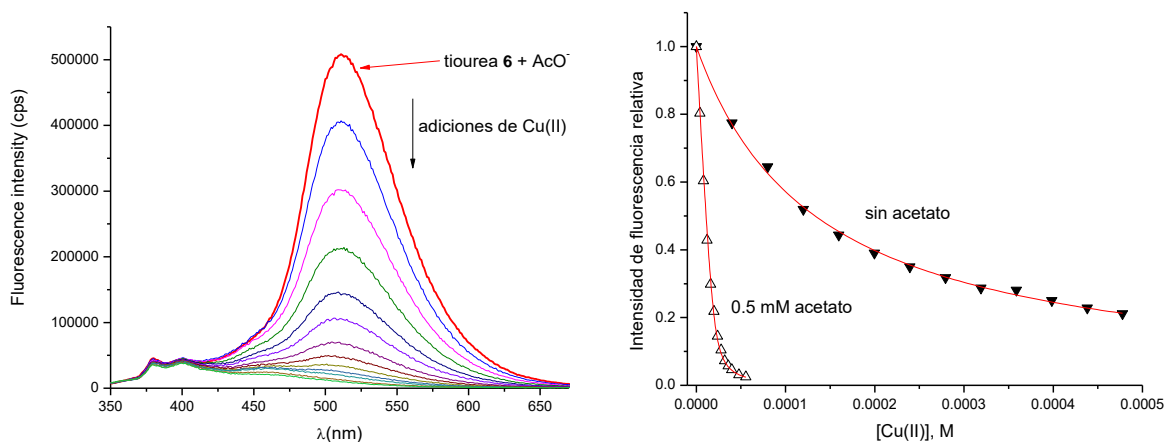


Figura 67. (a) Espectros de emisión para la titulación de la $[tiourea\ 6]= 2 \times 10^{-5}\ M$ y $[NBu_4^+AcO^-]= 5 \times 10^{-4}\ M$ y adiciones consecutivas de $Cu(OTf)_2$ (4-56 μM) (b) perfiles de intensidad de la fluorescencia vs. concentración de Cu(II) con y sin acetato.

Los cambios en la fluorescencia de **6** inducidos por Cu(II) con y sin acetato son iguales, pero en presencia de acetato la interacción es mucho más fuerte (figura 67b) con una constante de asociación $K_{\text{ass}} 9.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, cien veces mayor que sin acetato lo que podría sugerir que el AcO^- influye en la interacción del Cu con el receptor tiourea **6**, es decir, existe un efecto de cooperatividad positiva.

5.2.5 Estudios para la interacción de la urea **5** con aniones

Finalmente se hicieron pruebas para la urea **5**, la cual es la menos ácida y al no contar con el fragmento NO_2 tiene mejores propiedades fluorescentes.

En el caso del ión fluoruro se observa saturación y un aumento de la fluorescencia (figura 68a) que se ajusta a una constante sobresaliente del orden de 10^7 M^{-1} (figura 68b, la constante es demasiado grande para calcularla con precisión mejor de un orden de magnitud).

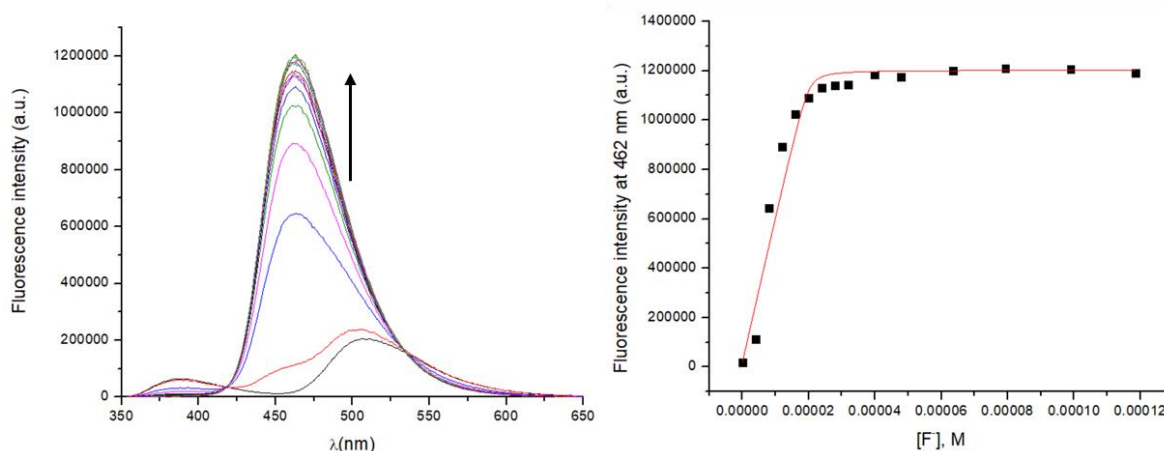


Figura 68. (a) Espectros de emisión para la titulación de la [urea 5]= $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ y NBu_4^+F^- (4-234 μM) en DMSO $\lambda_{\text{excitación}} 343 \text{ nm}$. (b) perfil de intensidad de la fluorescencia vs. concentración para la titulación

De manera conjunta se realizó la titulación mediante la técnica de RMN ^1H (figura 69), donde podemos observar que al agregar medio equivalente del ion fluoruro, desaparecen los protones tanto del OH, como el de NH del benzimidazol, pero del lado de la urea existe un desplazamiento de los NH que va de 8.48 y 8.68 a 8.61 y

8.9 ppm indicando la formación de un complejo por enlaces de hidrógeno a alta concentración de fluoruro. El perfil del desplazamiento vs. concentración del fluoruro es lineal hasta la concentración de 13 mM, que significa la interacción débil. Es imposible calcular la constante de asociación de estos datos que no debe ser mayor de 10 M^{-1} .

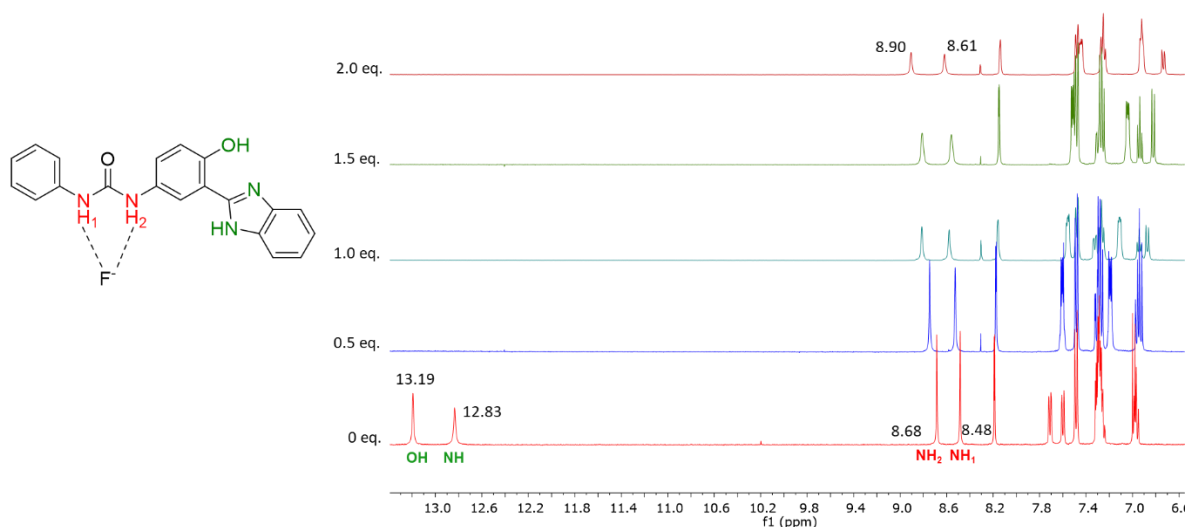


Figura 69. Titulación seguida por RMN ^1H para la [urea 5] = 10 mM con NBu_4^+F^- (5-20 mM) en DMSO-d_6

Con la ayuda del programa MNova y haciendo la integración de las señales, se hizo la asignación de los protones aromáticos de la urea **5** libre, antes de la titulación y con 1 equivalente de anión fluoruro, donde se observa que, debido a la interacción que existe, todas señales aromáticas van a campo alto y algunas de las señales se separan, por ejemplo, H_5 y H_{12} (figura 70). El desplazamiento al campo alto se interpreta como el efecto inductivo por parte del anion, que aumenta la carga negativa sobre anillos aromáticos y induce mayor protección de protones.⁸⁵

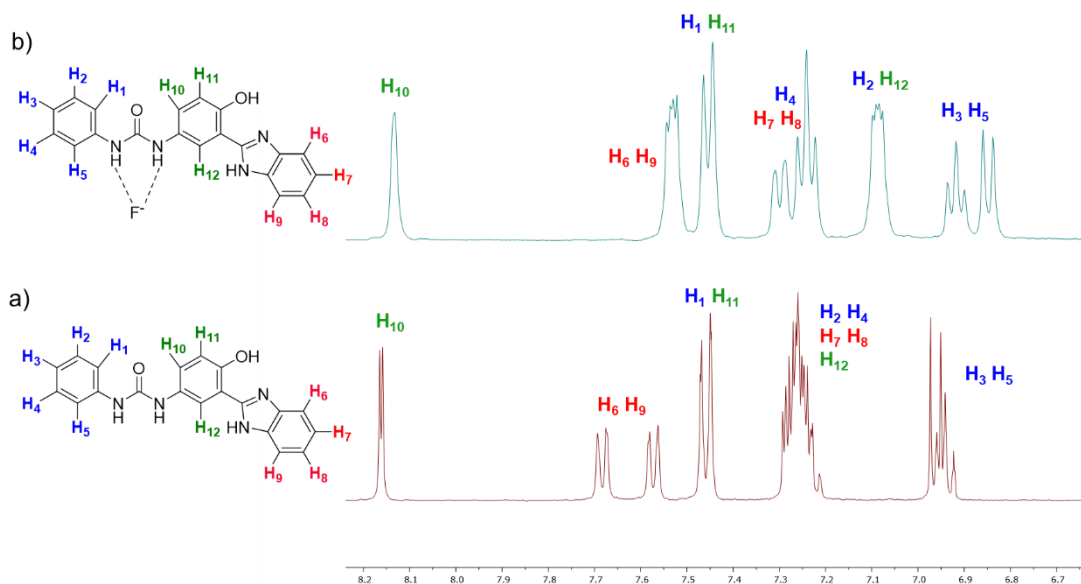


Figura 70. Asignación de señales de protón en (a) espectro inicial de RMN ¹H para [urea 5]= 10 mM sin asociarse y (b) espectro de urea 5 con 1.0 equiv. de NBu₄⁺F⁻ en DMSO-d₆.

En el estudio de la titulación realizado por fluorescencia para la urea 5 y el NBu₄⁺AcO⁻ se observa un comportamiento parecido a lo de fluoruro (comparar figuras 71 y 68), pero con una constante de estabilidad $K=6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ mucho más baja. Además, se observa una disminución de fluorescencia a altas concentraciones de acetato probablemente por un proceso de apagamiento no específico.

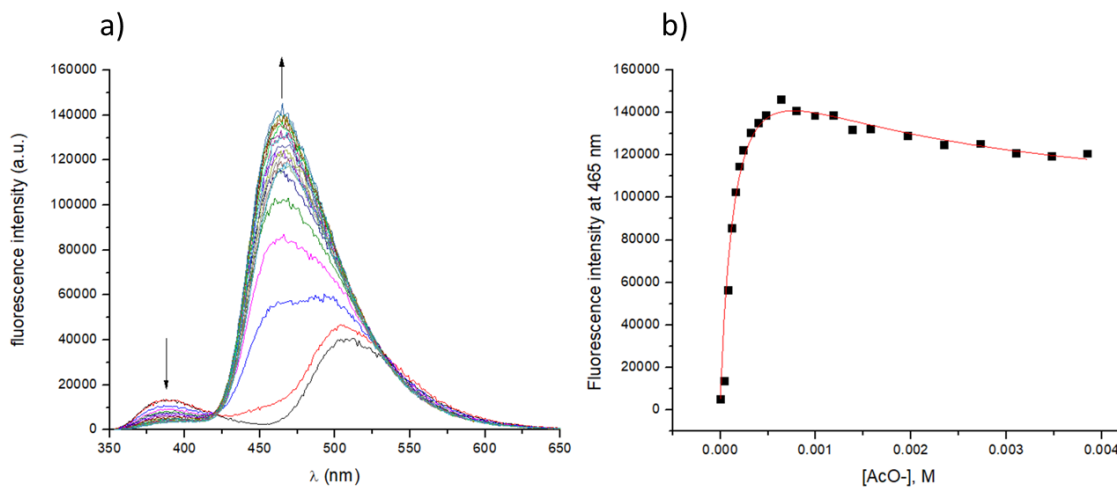


Figura 71. (a) Espectros de emisión para la titulación de la [urea 5]= $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, $\lambda_{\text{excitación}} = 343 \text{ nm}$ (b) perfil de intensidad de la fluorescencia vs. concentración para la titulación por fluorescencia para la urea 5 y NBu₄⁺AcO⁻ (0.4 mM - 4 mM) en DMSO

De la figura 72 se observa un desplazamiento de los protones de los NH de la urea que va de 8.68 y 8.48, hasta 11.32 y 11.21 ppm, lo que indica que hay una asociación y la formación de puente de hidrógeno con el anión acetato. De igual manera H_6 y H_9 se ven afectados lo que sugiere que el ion AcO^- también interactúa con el benzimidazol.

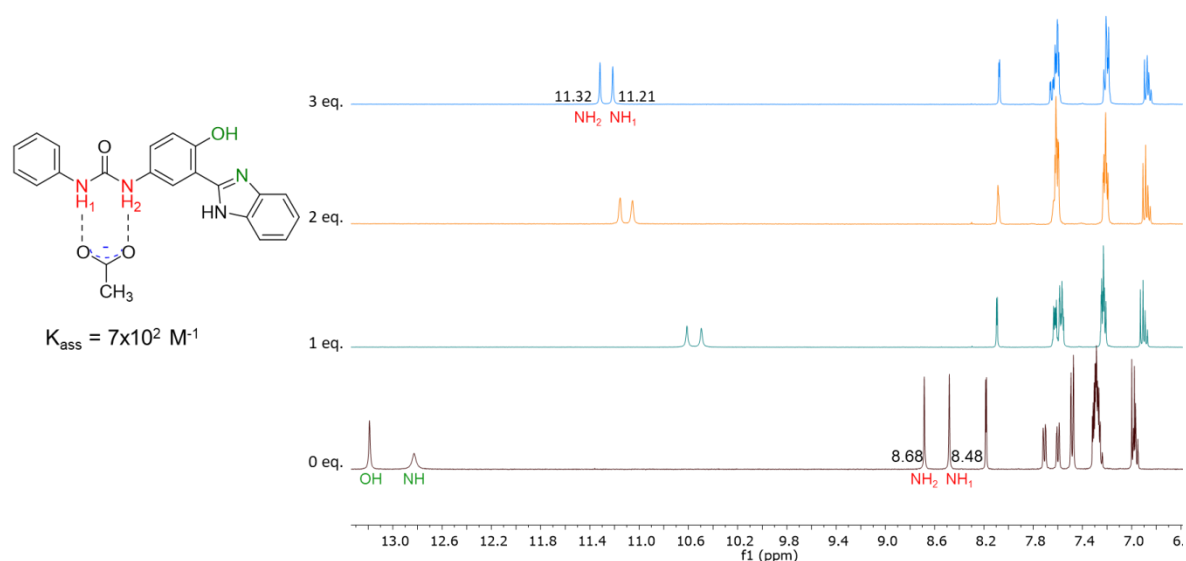


Figura 72. Apilado de espectros para la titulación de RMN 1H para la [urea 5]= 10 mM con $NBu_4^+AcO^-$ (10-30 mM) en $DMSO-d_6$

La constante de asociación calculada de los datos de RMN ($K_{ass}=700 M^{-1}$) es más baja que la constante calculada por fluorescencia, pero la diferencia no es tan grande como en el caso de F^- .

La Tabla 7 presenta un resumen de las constantes de estabilidad de los complejos de los receptores **5** – **7** con diferentes aniones obtenidas por dos diferentes técnicas: RMN 1H y fluorescencia. La interacción predominante con el receptor más ácido **7** es la desprotonación y solo con un anión no-básico Cl^- se forma un complejo por puentes de hidrógeno, pero de baja estabilidad. Por otro lado, los receptores **5** y **6** no muestran afinidad detectable con Cl^- , pero presentan alta (a veces muy alta), afinidad a los aniones más básicos. Las mediciones por RMN 1H basadas en el desplazamiento de señales de NH de (tio)urea siempre corresponden a la formación de complejos por puentes de hidrógeno con estos grupos funcionales. Las

mediciones por fluorescencia pueden reflejar esta misma interacción, pero además un cambio en la intensidad de fluorescencia puede ser el resultado de la interacción del anión con los otros dos grupos donadores de protones, es decir, el OH y NH de fenol y benzimidazol, que son más ácidos que el NH de la urea (ver arriba). Es razonable suponer que en los casos cuando las constantes de estabilidad determinadas por ambas técnicas son muy diferentes (F^- con **5**, AcO^- con **6** y AcO^- con **5**) las constantes típicamente más grandes determinadas por fluorescencia reflejan las interacciones de aniones con estos grupos más ácidos. De los resultados por RMN 1H observamos que en todos estos casos las señales de OH y NH desaparecen en presencia de aniones.

Tabla 7. Constantes de estabilidad (M^{-1}) de complejos de receptores **5 – 7 con aniones en DMSO determinados por fluorescencia y por RMN 1H**

	AcO^-		F^-		$H_2PO_4^-$		Cl^-	
	fluorescencia	RMN 1H	fluorescencia	RMN 1H	fluorescencia	RMN 1H	fluorescencia	RMN 1H
5	6.0×10^3	7.0×10^2	9.0×10^6	<10				
6	2.7×10^6	2.6×10^2			6.3×10^2	9.2×10^2		
7	desprotonación		desprotonación		desprotonación			42

5.2.6 Estudio de la interacción de la urea **5** con distintos cationes metálicos

Se estudió también la interacción del receptor más básico **5** con distintos cationes metálicos mediante fluorescencia, de donde podemos decir que no hubo mucho efecto, ya que el único que presentó una disminución de la fluorescencia fue el Cu(II), dichos estudios se realizaron en DMSO (tabla 8).

Tabla 8. Constantes de estabilidad de complejos metálicos de **5 en DMSO**

M^{n+}	Efecto en la fluorescencia	K_{eq}
Eu(III)	Sin efecto	NC
Sn(IV)	Sin efecto	NC
Cu(II)	Disminución	1.1×10^4
Zn(II)	Sin efecto	NC

Además, se hicieron estudios de cooperatividad para la urea usando simultáneamente cationes metálicos con el ion acetato. En todos los casos la adición del acetato (la concentración de $\text{NBu}_4^+\text{AcO}^-$ 0.5mM, es decir, 25 veces mayor que la de la [urea **5**]= 0.02 mM) incrementó dramáticamente la interacción del catión metálico con **5**, lo que se puede atribuir a la desprotonación del ligante con el anión, lo que facilita la coordinación del metal.

En la figura 73 se demuestra el efecto de acetato a la interacción con $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$.

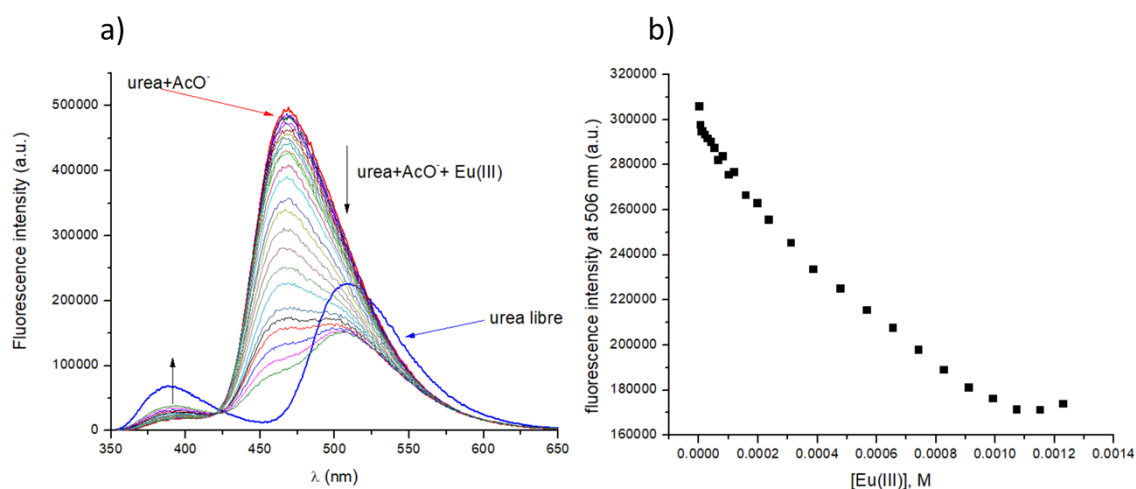


Figura 73. (a) Espectros de emisión para la titulación de la [urea **5]= 2×10^{-5} M con AcO^- 0.5 mM y aumento de la concentración de $\text{Eu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ ($4 \mu\text{M}$ -1 mM), en DMSO, $\lambda_{\text{excitación}}$ 343 nm (b) perfil de concentración para la titulación por fluorescencia para la urea **5** con el ion Eu(III)**

La complejación de **5** con Eu(III) procede con una constante de estabilidad relativamente grande $1.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ y extinción de la fluorescencia. También, con el ion Cu(II) , conforme aumenta la concentración de $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ la intensidad de la fluorescencia comienza a disminuir hasta la extinción completa, y la constante de asociación calculada $K = 2.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ es cien veces más grande que en ausencia del anión (figura 74 y Tabla 8).

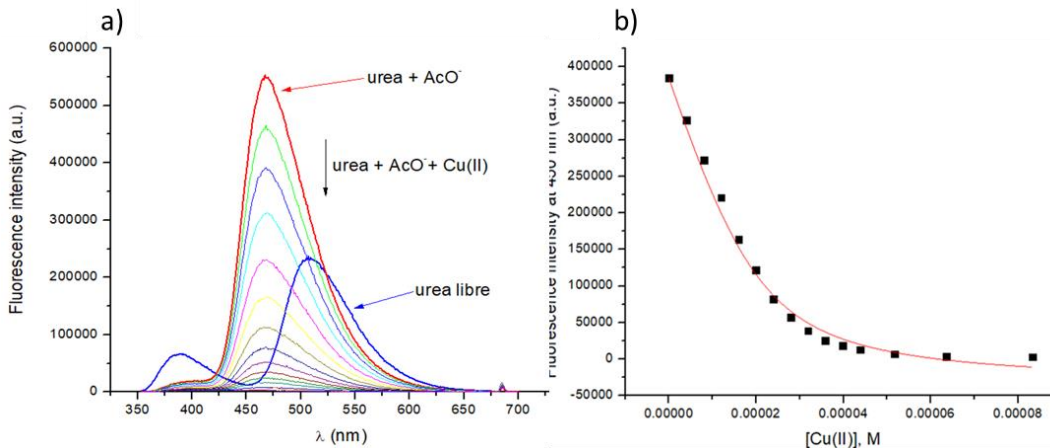


Figura 74. (a) Espectros de emisión para la titulación de la [urea 5] = 2×10^{-5} M con AcO^- 0.5 mM y aumento de la concentración de $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ (4 - 83 μM), en DMSO, $\lambda_{\text{excitación}}$ 343 nm (b) perfil de concentración para la titulación por fluorescencia para la urea 5 con el ion $\text{Cu}(\text{II})$

Para iones metálicos como es el caso de $\text{Zn}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ y Me_2SnCl_2 (figuras 75 y 76), con constantes de $K = 1.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y $K = 1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, respectivamente, se observa que posterior a la adición del ión metálico hay una disminución de la banda que está a 470 nm que corresponde a la urea con AcO^- y por otro lado un aumento de la banda que aparece a 425 nm. El espectro final a la saturación con el metal representa el espectro de emisión del complejo metal-5.

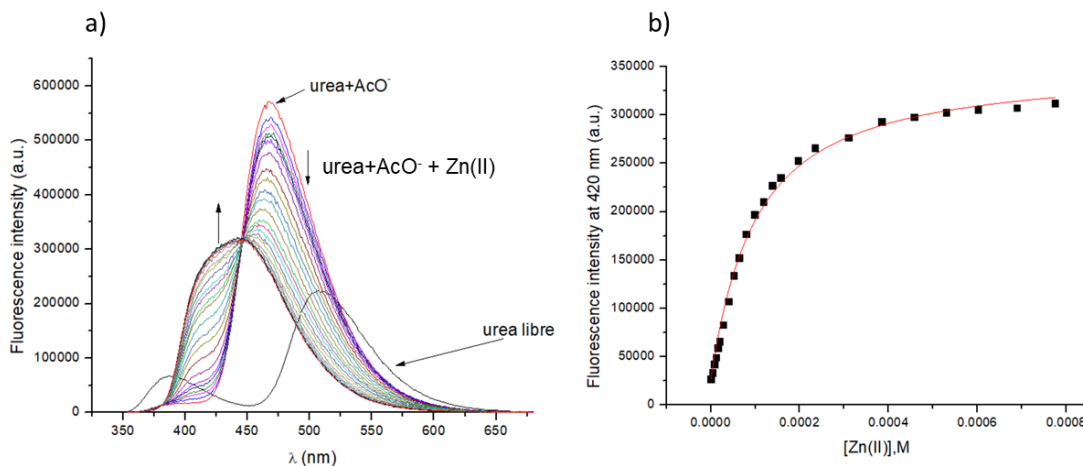


Figura 75. (a) Espectros de emisión para la titulación de la [urea 5] = 2×10^{-5} M con AcO^- 0.5 mM y aumento de la concentración de $\text{Zn}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ (4 - 83 μM), en DMSO, $\lambda_{\text{excitación}}$ 343 nm (b) perfil de concentración para la titulación por fluorescencia para la urea 5 con el ion $\text{Zn}(\text{II})$,

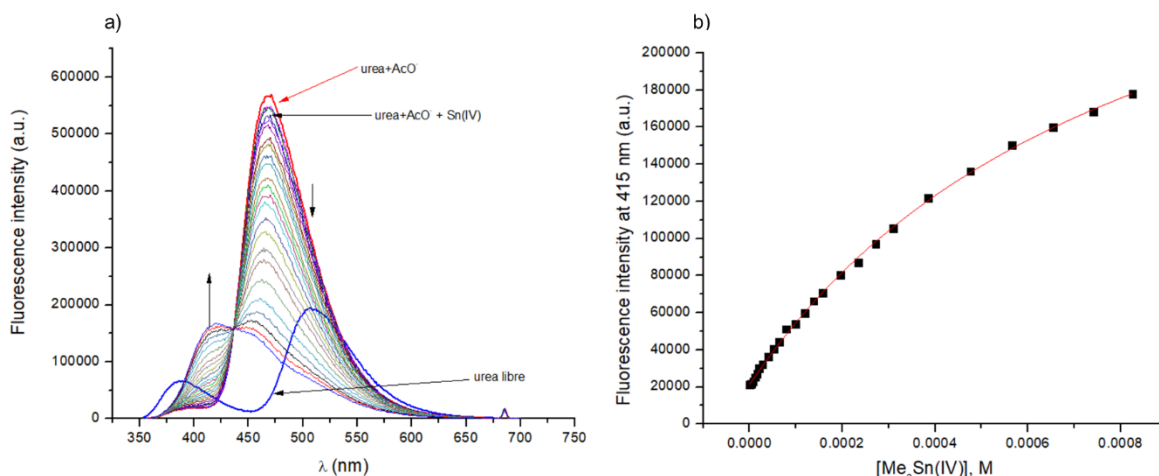


Figura 76. (a) Espectros de emisión para la titulación de la [urea 5]= 2×10^{-5} M con AcO^- 0.5 mM y aumento de la concentración de $\text{Me}_2\text{Sn(IV)}$ (4 - 825 μM), en DMSO, $\lambda_{\text{excitación}}$ 343 nm (b) perfil de concentración para la titulación por fluorescencia para la urea 5 con el ion $\text{Me}_2\text{Sn(IV)}$.

Los estudios de los receptores **5-7** todavía están en una etapa preliminar que no permite hacer conclusiones definitivas; sin embargo, ya en ésta etapa algunos aspectos de su funcionamiento están claros.

El receptor **7** por su alta acidez no presenta interacción con metales y en su interacción con aniones básicos (acetato, fluoruro, fosfato) predomina el proceso de desprotonación. Puede servir como receptor para cloruro, pero en DMSO, que es un solvente polar, la afinidad hacia cloruro es muy baja. Con este receptor tiene sentido continuar los estudios de reconocimiento de aniones en un medio de menor polaridad, por ejemplo, acetonitrilo que fortalece las interacciones por puentes de hidrógeno y es menos favorable para la desprotonación.

El receptor **6** se comporta de manera inesperadamente complicada. En algunos casos no se pueden atribuir los cambios espectrales inducidos por aniones y cationes a ningún modelo razonable. Además, no presenta buenas respuestas ópticas para poder funcionar como un sensor eficiente.

Por otro lado, el receptor **5** es el más prometedor como un sensor bifuncional, ya que presenta fuertes cambios en la fluorescencia tanto en presencia de aniones como de cationes metálicos junto con aniones. Por ejemplo, el análisis de la parte lineal inicial del perfil de concentración de F^- en la Figura 68b indica que este anión puede detectarse a la concentración tan baja como 1×10^{-6} M por un aumento de fluorescencia a 462 nm. Asimismo la concentración del catión de Zn(II) puede medirse con un límite de detección de $0.6 \mu\text{M}$ o 6×10^{-7} M (calculado como $3\sigma/m$, donde σ es la desviación estándar del blanco y m es la pendiente de la curva de calibración) con el mismo receptor **5** en presencia de 0.5 mM de acetato por su efecto en la intensidad de fluorescencia a 420 nm, figura 77.

Figura 77. La curva de calibración para la determinación de $\text{Zn}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ en DMSO, con el receptor **5** en presencia de 0.5 mM de $\text{NBu}_4^+\text{AcO}^-$ (la extensión de la parte inicial del perfil en la figura 70b) que sigue a la ecuación lineal $I_{420} = (28900 \pm 400) + (2030 \pm 20)[\text{Zn(II)}] (\mu\text{M})$.

La cooperatividad de las interacciones con cationes y aniones observada con el receptor **5** es interesante con respecto a la posibilidad del uso del receptor **5** para la construcción de una compuerta lógica, que es una de las direcciones novedosas en el uso de receptores moleculares.⁸⁷ Por ejemplo, los resultados con el anión acetato y catión Zn(II) presentan un comportamiento de una de las compuertas básicas AND (figura 78). Los datos experimentales de la figura 75a muestran que a longitud de onda de 421 nm el receptor libre presenta fluorescencia baja, la cual no está

afectada por las adiciones de acetato y Zn(II) por separado, pero muestra un fuerte aumento al añadirlos juntos. En otras palabras, el sistema produce una señal solo cuando ambos componentes están presentes.

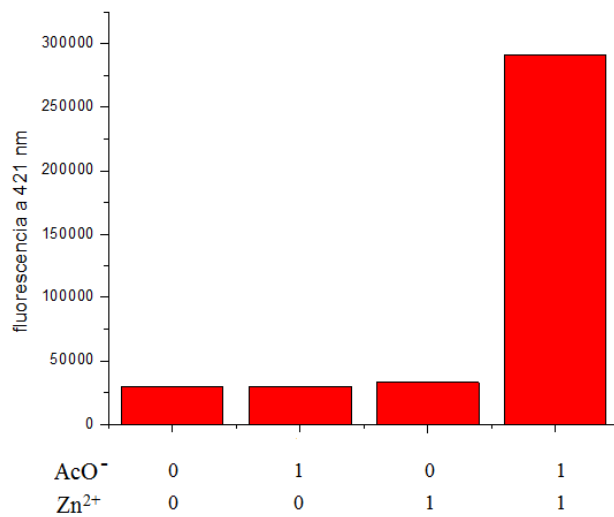


Figura 78. Señales de emisión de salida para el receptor 5 como compuerta lógica AND; 0 significa ausencia del componente y 1 es la presencia de 0.5 mM del componente. El receptor se usa a concentración de 2×10^{-5} M en DMSO.

6 Conclusiones

La 3-hidroxiquinolona **3** acuosa forma un complejo aniónico con el ácido fenilborónico promovido por un efecto micelar de un tensoactivo catiónico. El proceso está acompañado por un fuerte desplazamiento del máximo de fluorescencia de **3** gracias a eliminación de la posibilidad del ESIPT con la observación de un punto isoemisivo que permite el diseño del método ratiométrico de determinación de polioles por el método del desplazamiento de indicador.

El método desarrollado tiene selectividad entre azúcares hacia fructosa y nucleótidos comparando con nucleósidos, y permite la estimación de la cantidad del azúcar a simple vista (*naked eye*) gracias al cambio de color de la emisión entre verde y azul. Además, una característica importante del nuevo sensor es un rango dinámico inusualmente amplio que incluye la variación de la concentración del analito hasta 2 órdenes de magnitud. Esta fuerte extensión del intervalo dinámico lineal en el método ratiométrico es una mejora útil, la cual parece haber sido ignorada hasta ahora ya que no existen antecedentes que demuestren lo contrario.

La estabilidad de los complejos de 3-hidroxiquinolona N-metilada **4** con cationes metálicos es intermedia entre la de 3-hidroxipirona y 3-hidroxipiridinona que son ligantes conocidos de estructuras similares. La complejación de **4** con metales de transición [Cu(II), Fe(II/III), Ni(II), Co(II) y Cd(II)] así como Eu(III) y Pb(II) extingue la fluorescencia mientras que Zn(II) y metales del bloque *p* ligeros [Al(III), Ga(III), Be(II), Me₂Sn(IV)] aumentan la fluorescencia. La intensidad de la fluorescencia con el último grupo de metales muestra una tendencia en la que, por lo general, solo los complejos ML presentan un aumento de la fluorescencia, pero los complejos de tipo ML₂ tienen una fluorescencia menor que el ligante libre debido a la transferencia electrónica intramolecular entre ligantes coordinados, que es imposible en complejos ML.

Los estudios preliminares con nuevos receptores bifuncionales que contienen en sus estructuras el grupo 2-(2'-hidroxifenil)-benzimidazol, un fluoróforo con ES IPT, con la capacidad de complejación con metales, y un grupo diaril(tio)urea con capacidad de complejación de aniones, comprueban la posibilidad de la elaboración de nuevos sensores ópticos para la detección de cationes y aniones con el mismo sensor. Algunos de estos receptores tienen el compartimiento de compuertas lógicas.

7 Procedimiento experimental

7.1 Aspectos generales

Los disolventes empleados en todas las reacciones son grado reactivo. Los componentes de las disoluciones buffer (CHES, MOPS, MES, así como HTAB, HTAC, HTAH, SDS, TWEEN-20, TritonX-100), fueron usados como fueron suministrados, al igual que las materias primas. La concentración micelar crítica CMC de HTAB fue determinada por la variación de la tensión superficial de aire/disolución acuosa de tensión superficial como función de la concentración de los tensoactivos.

La purificación de todos los compuestos se llevó a cabo mediante cristalización o cromatografía flash con sílica gel 60 (0.40-0.63 mm, 230-400 mesh), también se utilizó alumina y disolventes grado técnico, el monitoreo de las reacciones se hizo por cromatografía en capa fina (TLC) sobre cromatofolios de sílica gel F254, y en caso de ser necesario de óxido de aluminio, utilizando como agente revelador luz UV.

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C fueron obtenidos a 300 y 75 MHz, respectivamente, en un espectrómetro Varian Inova (300 MHz), Bruker Avance. La determinación se hizo con DMSO- d_6 como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm. La multiplicidad de las señales en espectros de RMN ^1H se indica con las abreviaturas (s) simple, (d) doblete, (t) triplete, (c) cuadruplete, (m) multiplete y (a) ancha.

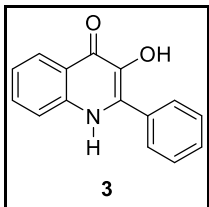
Las titulaciones y los espectros medidos por UV-Vis se realizaron en un espectrofotómetro de arreglo de diodos de Thermo Scientific Evolution diodearray, equipado con un recirculador a una temperatura constante de 25 ± 0.1 °C. Las titulaciones y los espectros obtenidos por fluorescencia se hicieron en el equipo se midieron en un espectrofluorómetro de HORIBA, FluoroMax.

Todos los errores relativos para los ajustes de K están por debajo de $\pm 20\%$

Todos los errores relativos para la medición del pH son de ± 0.01

7.2 Métodos de síntesis

Para la obtención de los antranilatos precursores, así como para las hidroxiquinolonas **3** y **4** se siguió la ruta de síntesis reportada por Hradil y colaboradores.²⁷



2-fenil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona (3).

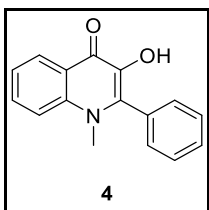
RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.64(br. s, 1H, NH), 8.17 (d, J $\frac{1}{4}$ 7.8 Hz, 1H), 7.81(d, J $\frac{1}{4}$ 7.1 Hz, 2H), 7.74 (d, J $\frac{1}{4}$ 8.4 Hz, 1H), 7.61–7.52 (m, 4H), 7.28(t, J $\frac{1}{4}$ 7.8 Hz, 1H);

RMN ¹³C (75 MHz; DMSO-d₆) δ 170.5, 138.5, 138.3, 132.8, 132.1, 131.1, 129.7, 129.7, 128.8, 124.9, 122.5, 122.3, 118.9.

Anal. calc. para C₁₅H₁₁NO₂ DMF: C 69.66, H 5.85, N 9.03; encontrado C 69.71, H 5.23, N 9.34.

MS (FAB, m/z) 237 [M]⁺

Pto. de fusión 276–279 °C



1-metil-2-fenil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona (4).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8.15 (d, J $\frac{1}{4}$ 8.5 Hz, 2H), 7.81(d, J $\frac{1}{4}$ 7 Hz, 2H), 7.72 (d, J $\frac{1}{4}$ 8 Hz, 1H), 7.57(m, 4H), 7.27 (t, J $\frac{1}{4}$ 7 Hz, 1H), 3.52 (s, 3H);

RMN ¹³C (75 MHz; DMSO-d₆) δ 187.3, 178.7, 169.2, 138.9, 138.8, 136.8, 132.4, 131.23, 129.8, 129, 128.6, 125.1, 123.2, 22.1, 117.0, 37.0

Anal. calc. para C₁₆H₁₃NO₂: C 76.48, H5. 21, N 5.57; encontrado: C 74. 24, H 6. 65, N5. 10.

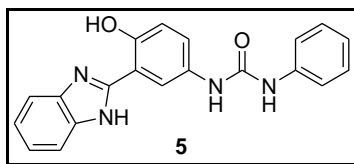
MS (FAB,m/z) 251 [M]⁺

Pto. de fusión 273–276 °C.

Para la obtención del 4-amino-2-benzimidazol-1-fenol se siguió la ruta reportada por Barni y colaboradores.⁸⁸

Procedimiento general para la síntesis de ureas y tioureas.

En un matraz de fondo redondo provisto de una barra magnética, a temperatura ambiente, en agitación y bajo atmosfera de nitrógeno, se colocó la 4-amino-2-benzimidazol-1-fenol (0.21 mmol, 1 equiv.) con el isocianato/isotiocianato correspondiente (0.23 mmol, 1.1 equiv.) con THF como disolvente (previamente secado con malla molecular), al término de 18 horas se detuvo la agitación y el precipitado resultante se filtró a vacío y se cristalizó en MeOH.



1-(3-(1H-benzoimidazol-2-il)-4-hidroxfenil)-3-fenilurea

(5)

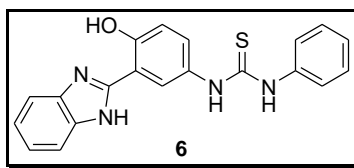
300 mg del benzimidazol (1.3 mmol, 1 equiv.) y 175 mg de fenilisocianato (1.46 mmol, 1.1 equiv.). Se obtuvieron 234 mg de un sólido blanco con un rendimiento de 51%.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 6.94-7.01 (m, 2H), 7.23-7.34 (m, 5H), 7.46-7.51 (m, 2H), 7.66 (dd, J₁= 33 Hz, J₂=6 Hz, 2H), 8.48 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 12.83 (s, 1H), 13.19 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 112.32, 117.21, 117.31, 117.36, 117.95, 118.34, 121.72, 122.81, 123.81, 124.15, 128.66, 128.98, 131.17, 139.92, 151.50, 152.99, 153.54, 153.56.

EM-TOF: [m/z, (%)] = [345.13, (80)] [M]⁺, [346.13, (20)] [M+2]⁺, [101.00, (50)] [M-244⁺]

Pto. de fusión: por arriba de 400 °C



1-(3-(1H-benzoimidazol-2-il)-4-hidroxiifenil)-3-

feniltiourea (6)

600 mg del benzimidazol (2.66 mmol, 1 equiv.) y 0.56 mL de fenilisotiocianato (2.93 mmol, 1.1 equiv.). Se obtuvieron 416 mg de un sólido color salmón pálido con un rendimiento de 43%.

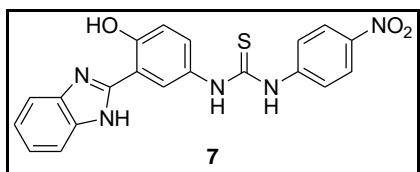
rendimiento de 43%.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.02-7.07 (m, 1H), 7.10-7.18 (m, 1H), 7.23-7.37(m, 5H), 7.46-7.53 (m, 2H), 7.67 (dd, J₁= 36 Hz, J₂=6 Hz, 2H), 8.08 (d, J= 2.43 Hz, 1H)9.68 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 13.14 (s, 1H), 13.24 (s, 1H).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ 111.65, 112.40, 117.23, 118.03, 122.52, 123.39, 124.18, 124.27, 124.60, 128.44, 130.00, 130.67, 133.25, 139.56, 140.90, 151.37, 155.94, 180.67.

EM-TOF: [m/z, (%)] = [689.26, (39)] [2M] [345.13, (80)] [M]⁺, [346.13, (20)] [M+2]⁺, [101.00, (50)] [M-259.44⁺]

Pto. de fusión: descomposición a 310 °C



1-(3-(1H-benzoimidazol-2-il)-4-hidroxiifenil)-3-(4-

nitrofenil)tiourea (7)

300 mg del benzimidazol (1.3 mmol, 1 equiv.) y 0.28 mL de fenilisotiocianato (1.46 mmol, 1.1 equiv.). Se obtuvieron 265 mg de un sólido amarillo, con un rendimiento de 50%.

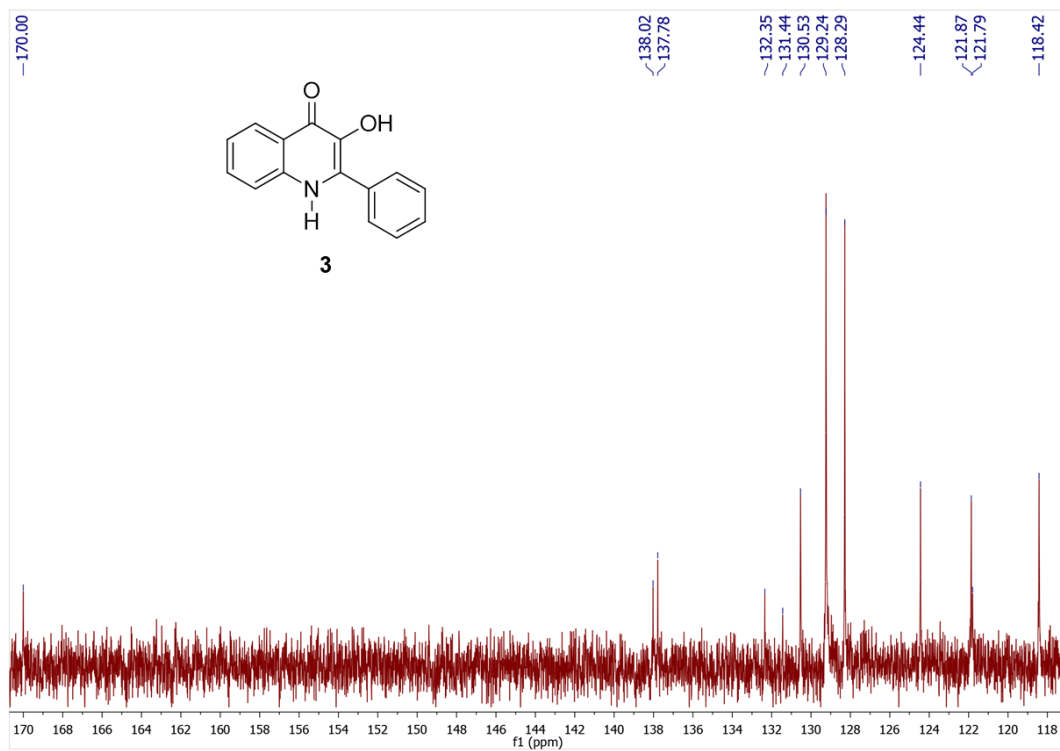
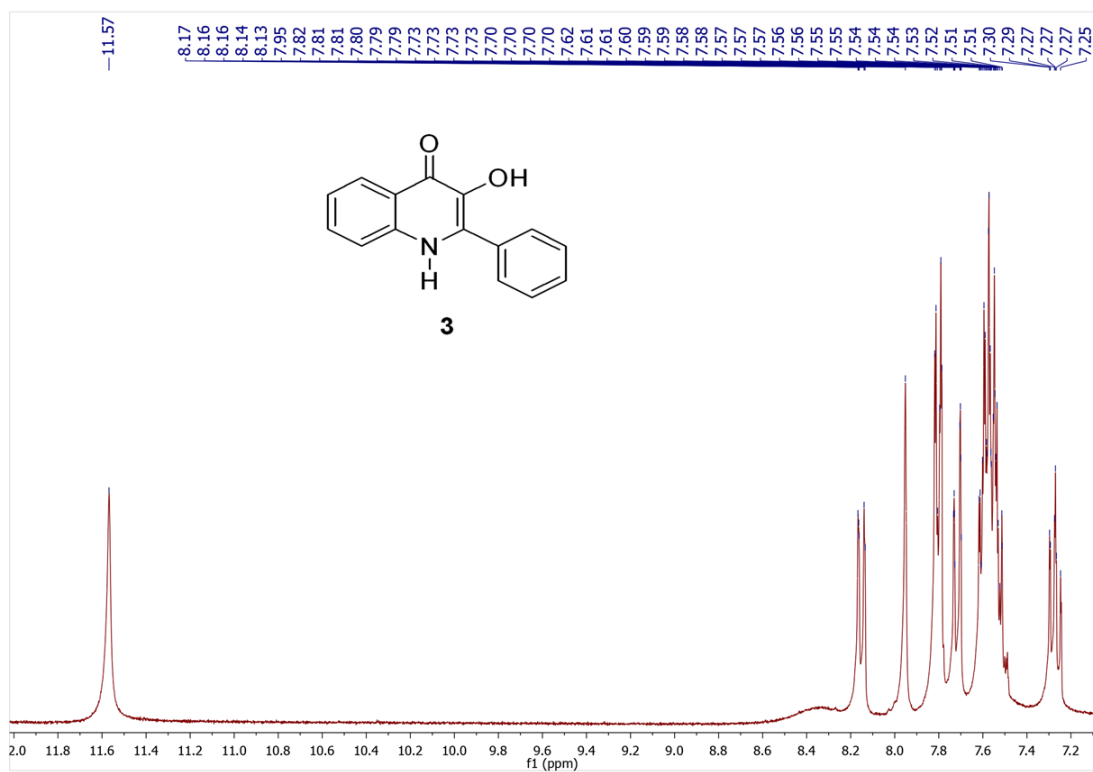
RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.06 (d, $J=6.54$ Hz, 1H) 7.22-7.35 (m, 3 H) 7.66 (dd, $J_1= 5.73$ Hz, $J_2=38.43$), 7.84-7.91 (m, 2H), 8.08 (d, $J= 1.83$ Hz, 1H), 8.24-8.18 (m, 2H) 10.13 (s, NH), 10.29 (s, NH), 13.19 (m, NH,OH).

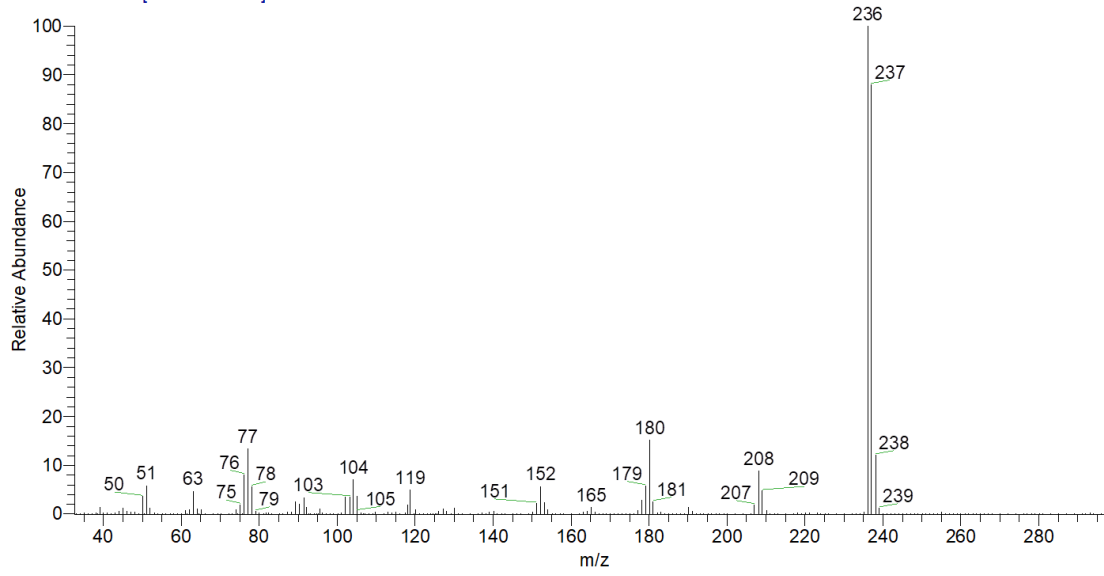
RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 111.67, 112.43, 112.59, 117.44, 118.03, 122.05, 122.60, 123.39, 124.00, 124.30, 126.44, 129.64, 130.21, 142.45, 146.43, 151.21, 156.16, 180.34.

EM-TOF: [m/z, (%)] = [406.09, (100)] [M^+], [407.10, (26)] [$\text{M}+2$] $^+$, [371.01, (6)] [308.98, (10)] [292.99, (12)] [268.05, (22)] [226.09, (8)]

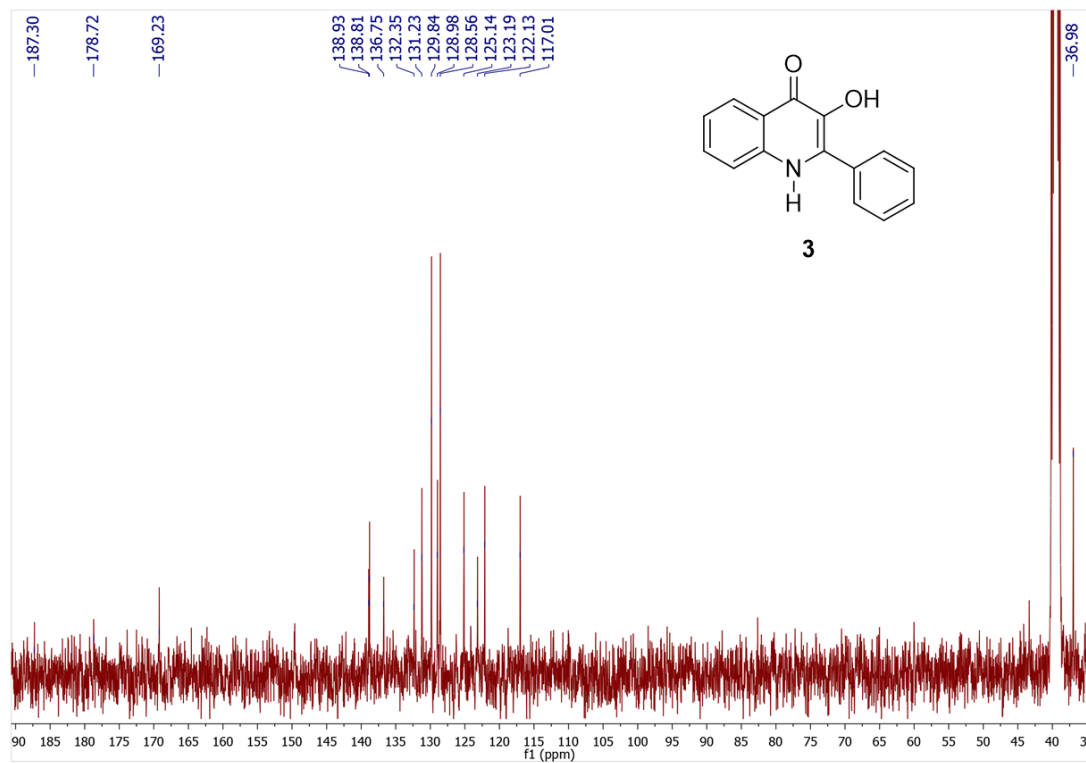
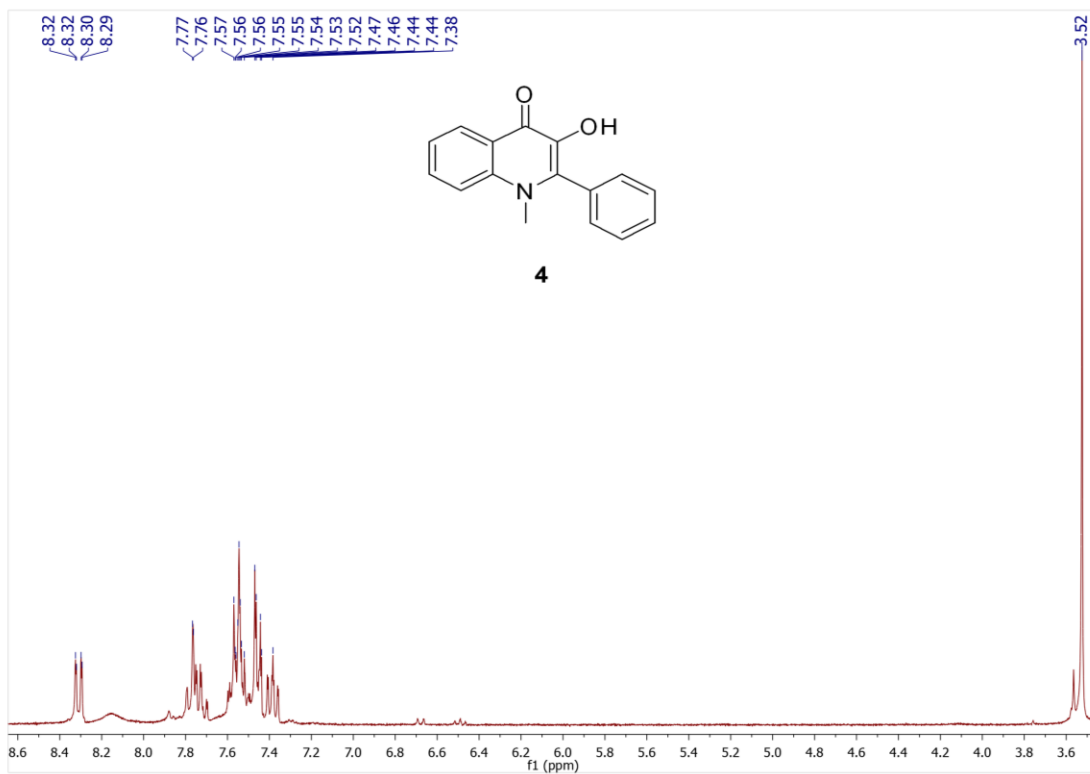
Pto. de fusión: descomposición a 265 °C

Espectro de RMN ¹H de 2-fenil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona (**3**)





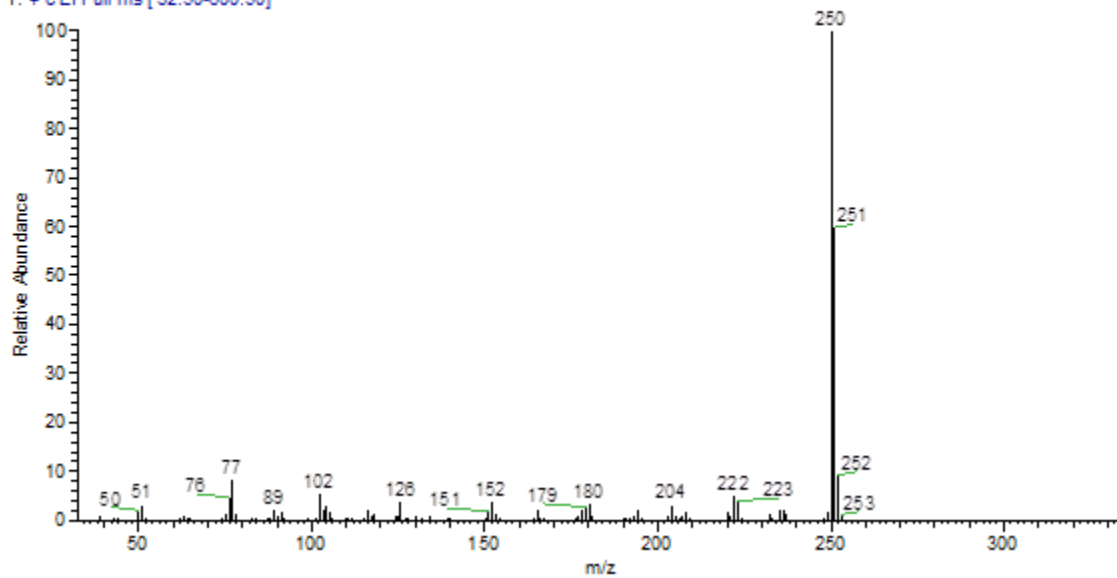
Espectro de RMN ¹H de 1-metil-2-fenil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona (**4**)



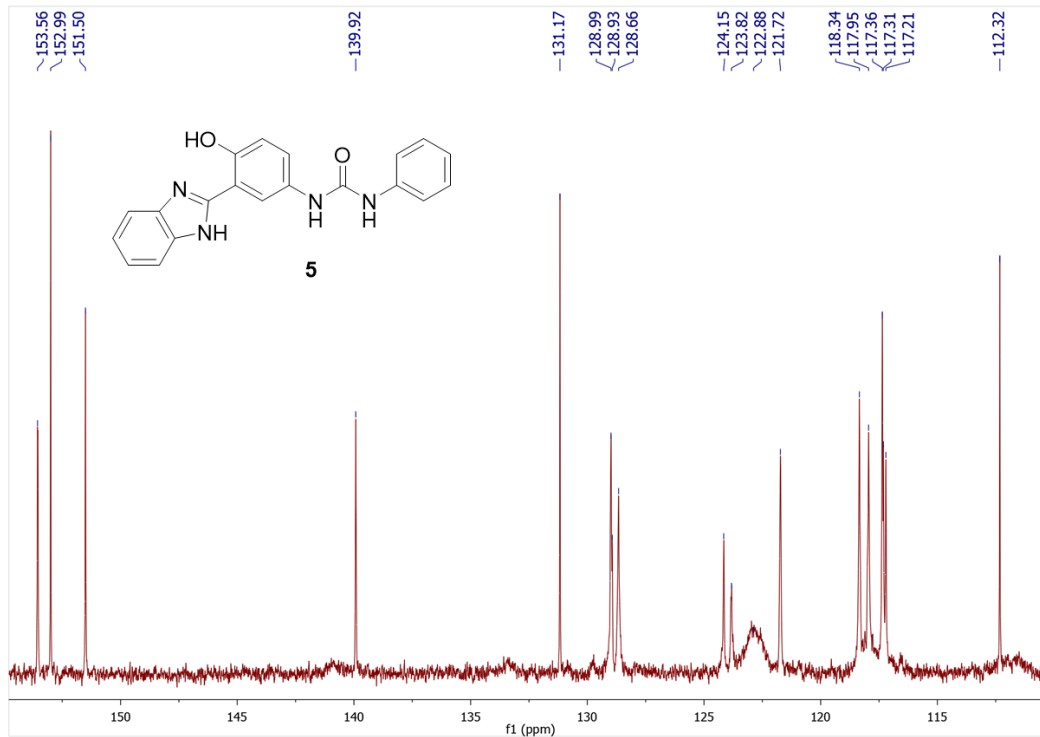
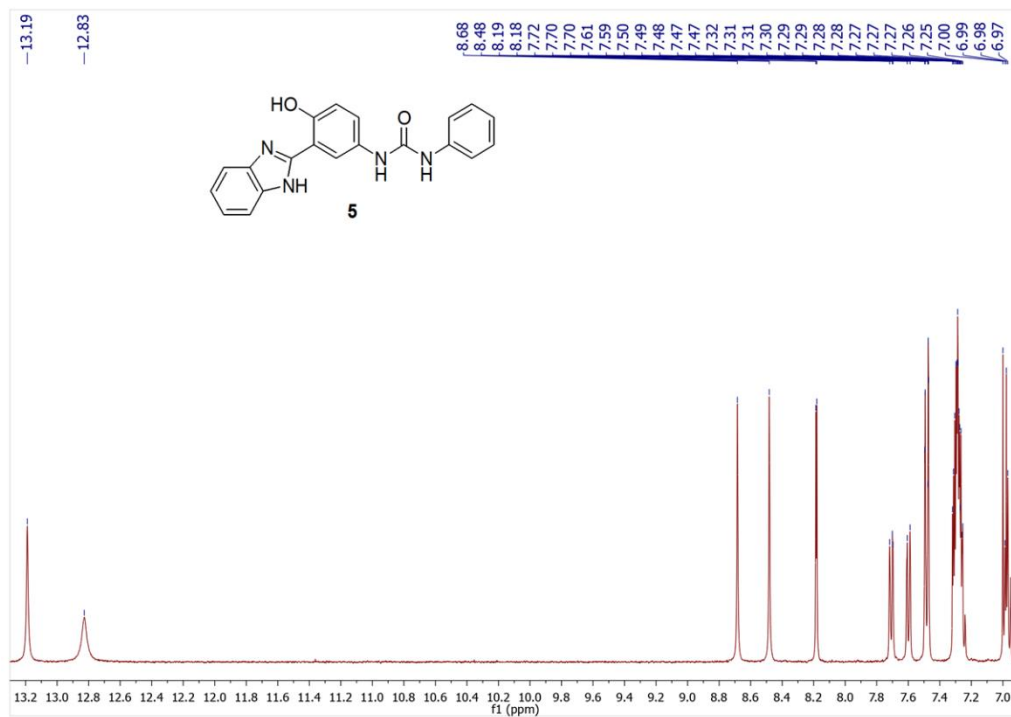
szComment

HQ2_1_1#11-13 RT: 1.09-1.31 AV: 3 NL: 5.23E7

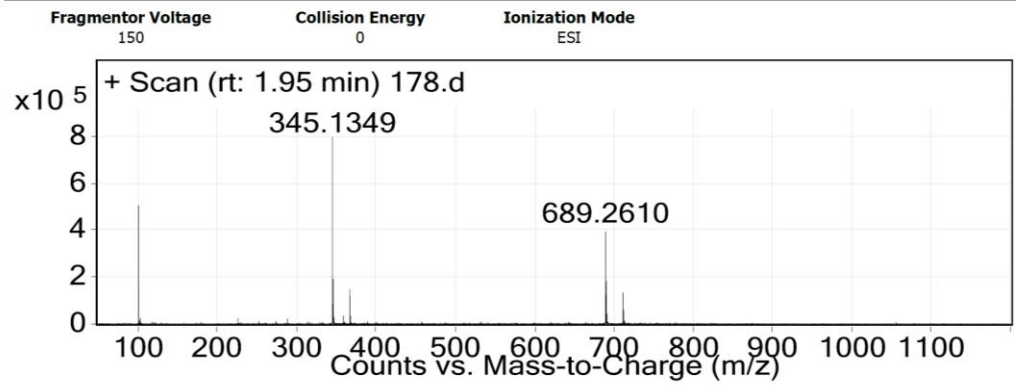
T: + e EI Full ms [32.50-800.50]



Espectros de RMN ¹H y masas de 1-(3-(1H-benzoimidazol-2-il)-4-hidroxifenil)-3-fenilurea (**5**)



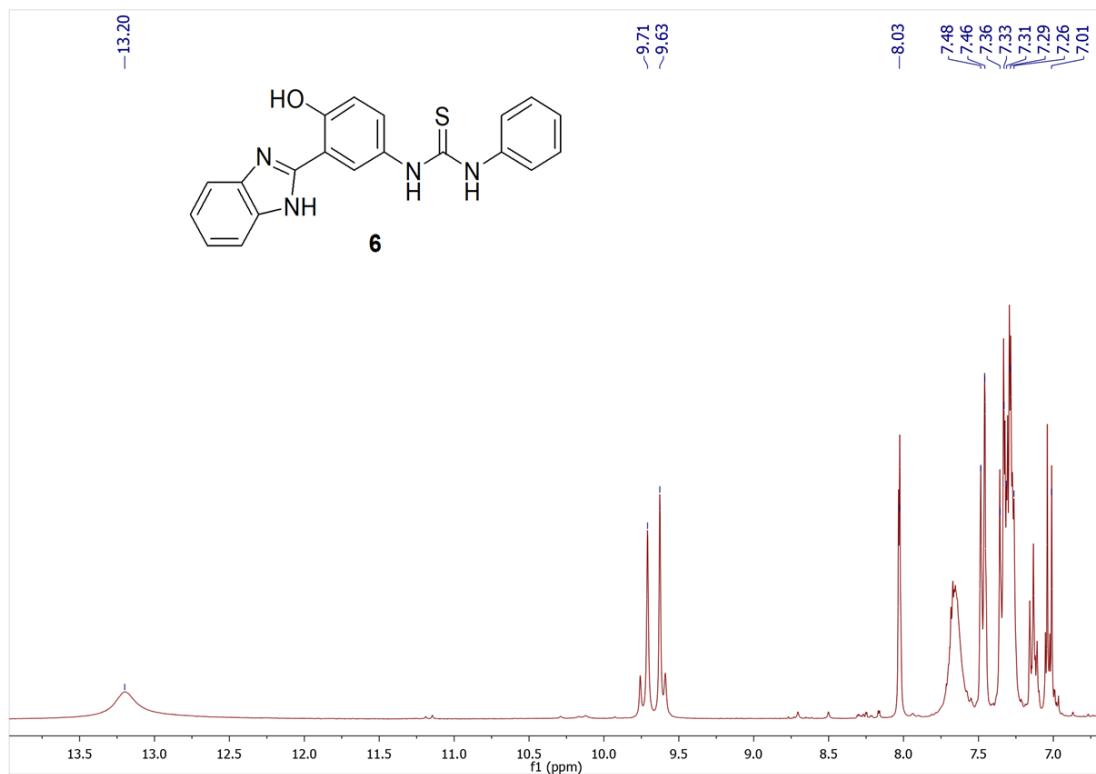
User Spectra



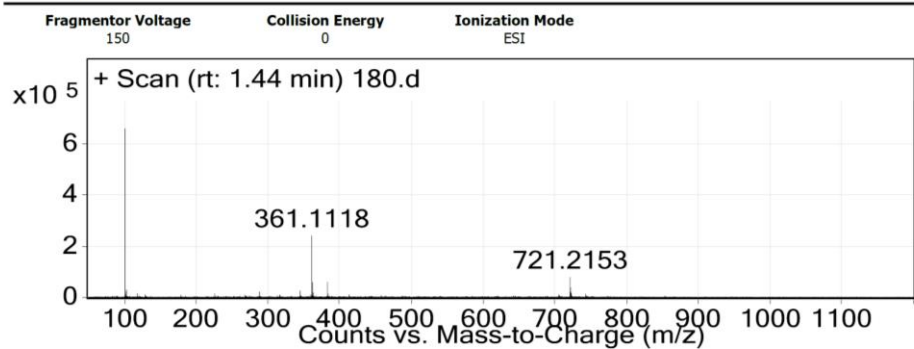
Peak List

<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund
101.0033		505500.92
345.1349	1	818690.17
346.1372	1	200008.28
367.1159		151895.28
689.261	1	393605.15
690.264	1	185064.95
691.2655	1	43617.01
711.2424	1	135502.02
712.2447	1	59792.12

Espectros de RMN ¹H y masas de 1-(3-(1H-benzoimidazol-2-il)-4-hidroxifenil)-3-feniltiourea (**6**)

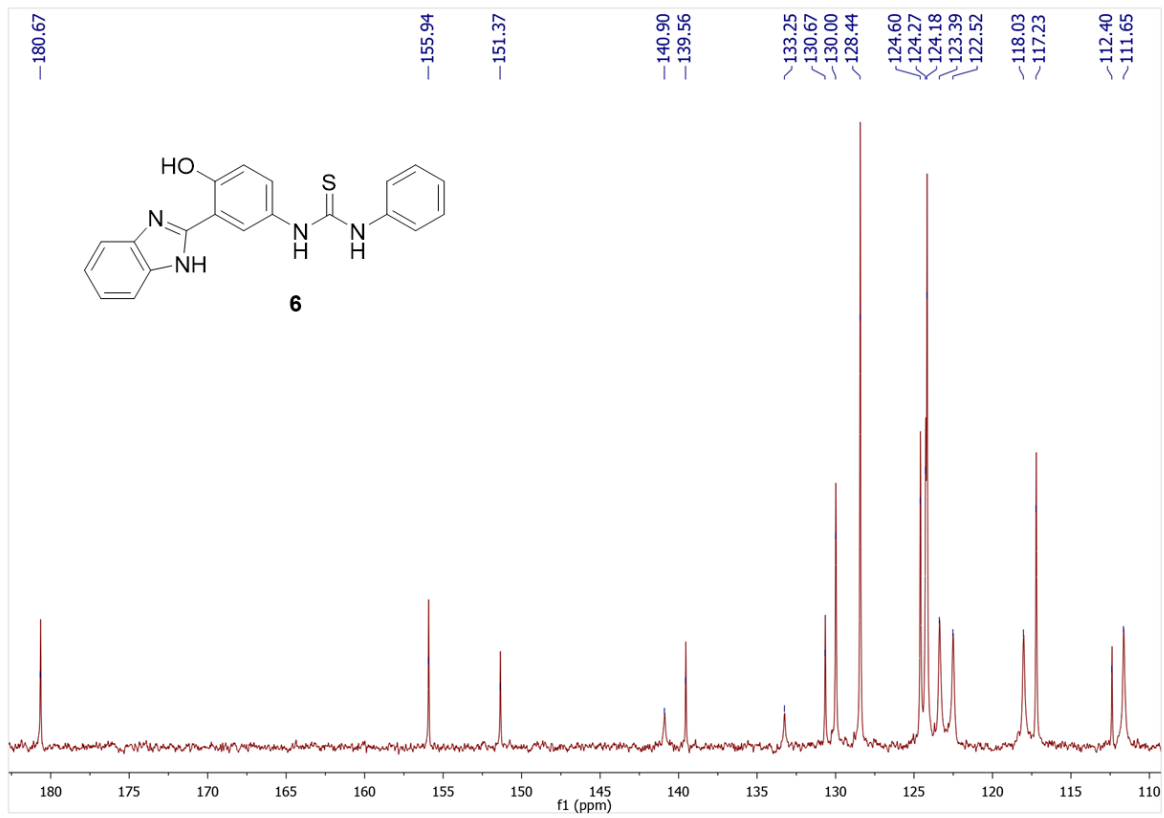


User Spectra

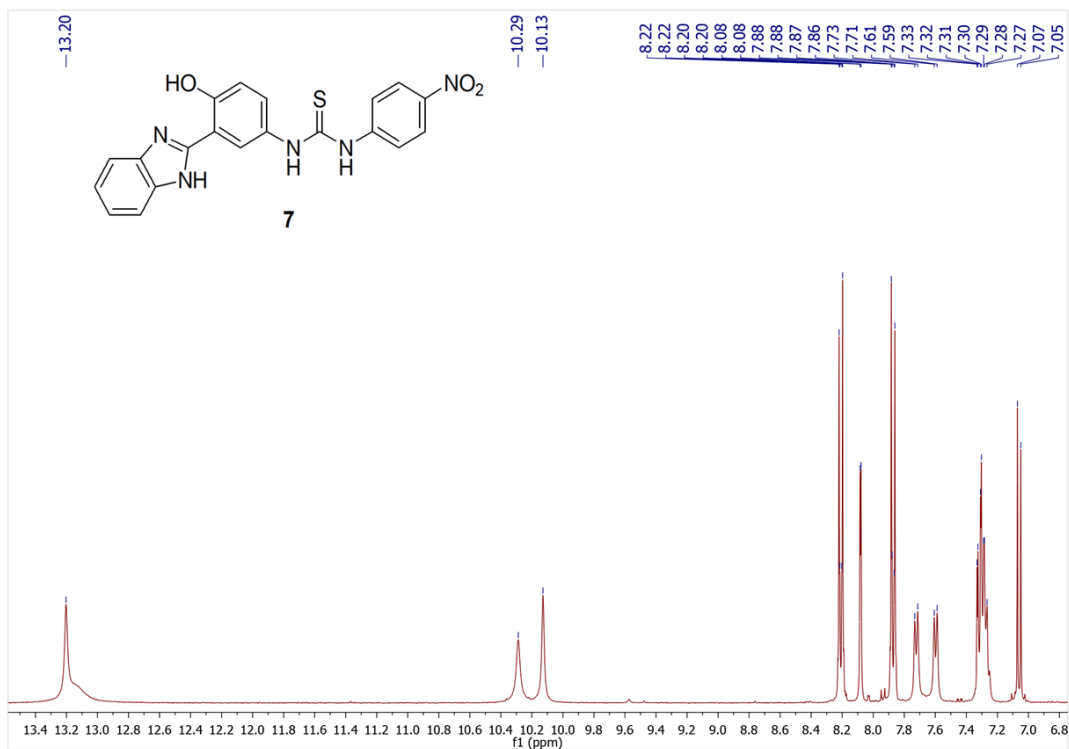


Peak List

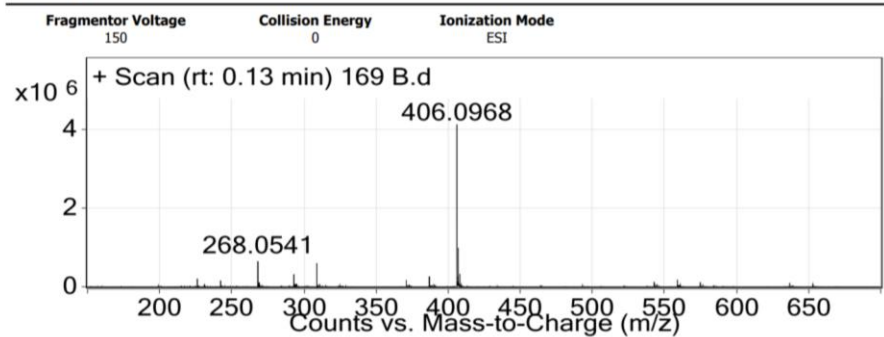
m/z	z	Abund
101.0037		660949.26
361.1118	1	243696.01
362.1147	1	58783.85
383.0932		59515.22
721.2153	1	80510.21
722.2177	1	39106.08



Espectro de RMN ¹H de 1-(3-(1H-benzoimidazol-2-il)-4-hidroxifenil)-3-(4-nitrofenil)tiourea (**7**)

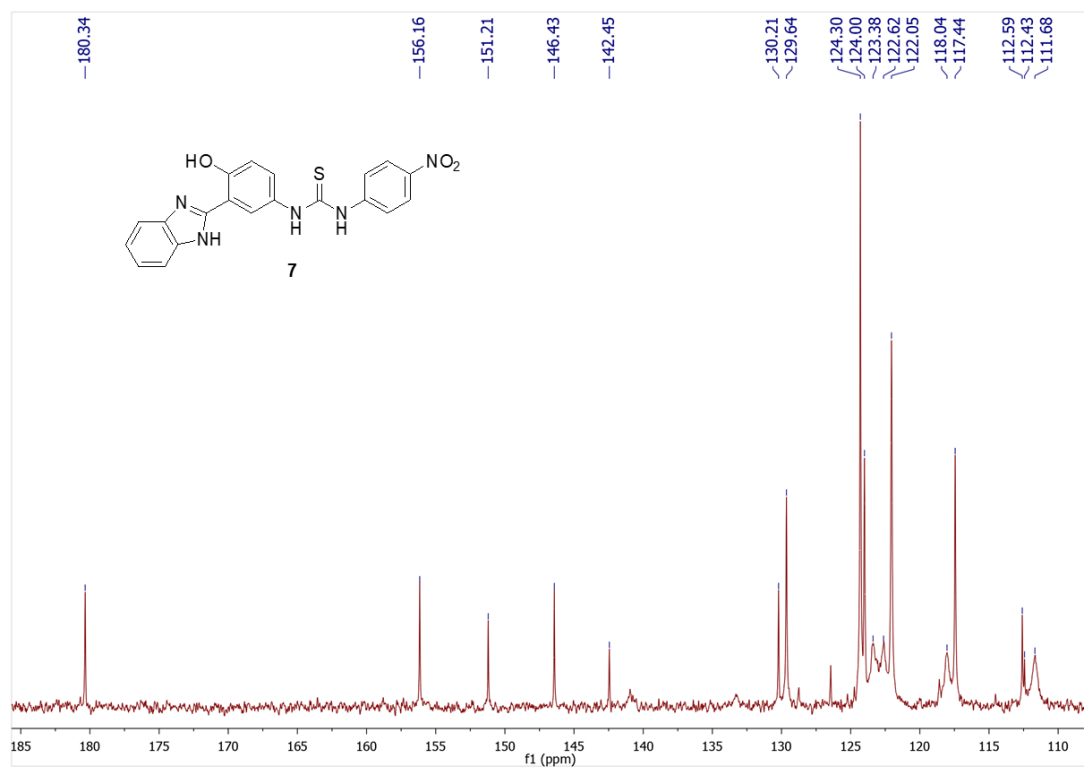


User Spectra



Peak List

m/z	z	Abund
118.1226		243233.97
268.0541		667317.03
292.9973		318186.54
308.9751		625564.47
386.9887		265265.36
406.0968	1	4136642.39
406.2612		266941.94
407.0999	1	991949.72
408.0969	1	325360.46



8 Apéndices

8.1 Análisis mecánico cuántico de las propiedades fluorescentes de los complejos de Al³⁺ con el ligante 4.

Por otro lado, en colaboración con nosotros el Dr. Arturo Jiménez realizó el análisis mecánico cuántico de las propiedades fluorescentes de los complejos de Al³⁺ con el ligante 4.

Para tener una mejor idea de la naturaleza de este fenómeno, las propiedades electrónicas de los complejos 1:1 y 1:2 de Al³⁺ con el ligante 4 fueron analizadas teóricamente. Las estructuras calculadas para los complejos ML y ML₂ en la figura 79, fueron obtenidas a partir de la estructura cristalina de 4 reportada anteriormente⁴⁷ y asumiendo que el modo de complejación del ion metálico es tal como para 2. La estructura calculada para AlL₂⁺ puede compararse con las estructuras reportadas para los complejos de Al(III) con la misma composición, pero con HL = 1.^{73, 89}. En lo que respecta al anillo de piridinona de 4, la complejación de los iones de Al(III) en el complejo 1:1 modifica fuertemente su geometría; se observó una estructura tipo pironio⁷³ con distancias de enlace de C₁–C₂ = 1.44 Å, C₂–C₃ = 1.43 Å, C₃–C₄ = 1.42 Å, C₄–N₅ = 1.43 Å, N₅–C₆ = 1.32 Å, C₆–C₁ = 1.49 Å, lo cual sugiere una pequeña alternación de longitud de enlace (BLA por sus siglas en inglés: *bond-length alternation*, que se define como la diferencia entre enlaces cortos y largos en una molécula conjugada). Así, esta polarización molecular a través del ion metálico, concuerda con la conservación de la aromaticidad en la piridinona. Sin embargo, dichos BLAs observados en el complejo 1:1 no se preservan en el complejo 1:2, donde el anillo de piridinona cita para distancias de C₁–C₂ = 1.43 Å, C₂–C₃ = 1.39 Å, C₃–C₄ = 1.43 Å, C₄–N₅ = 1.40 Å, N₅–C₆ = 1.44 Å, C₆–C₁ = 1.38 Å, lo que sugiere una mayor alternación de longitud de onda. Una alternación pequeña o igual a cero, indica un comportamiento aromático o una deslocalización π-electrón y alternancia más grande apunta a un carácter de enlace simple y doble separado. Este resultado además sugiere un proceso de desactivación radiativa menos efectivo en el complejo 1:2, comparado con el

complejo 1:1. Además, la redistribución electrónica en el complejo 1:2 permite una fuerte variación en el ángulo N-diedro en la quinolinona, inhibiendo así el canal de desactivación radiativa de AlL_2^+ por un proceso de conversión interna.

Interesantemente, la geometría casi plana alrededor del átomo de nitrógeno en el ligante libre se conserva en el complejo ML (ángulos diedro entre $C_{Me}-N-C_{Ar}$ y $C_{Ar}-N-C_{Ar}$ 173.0° y 175.3° respectivamente), pero en el complejo ML_2 el átomo de nitrógeno se vuelve más piramidal con el ángulo diedro de 137.4° . Por lo tanto, la densidad de carga total del ion metálico Al(III) induce una fuerte polarización del ligante, alterando así el proceso de transferencia interna de carga (ICT) y la disminución del tiempo de vida de la fluorescencia en el complejo 1:2, como se sugirió previamente.⁷¹

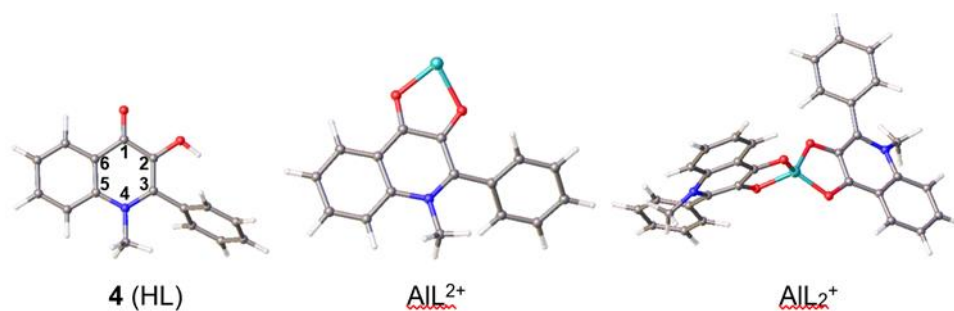


Figura 79. Estructura cristalina de **4** y estructuras simuladas de sus complejos con Al^{3+} .

TD-DFT provee un buen punto de referencia en la determinación de propiedades espectroscópicas debido a la descripción precisa de la energía potencial de superficies del estado basal y excitado. A pesar de eso, en la mayoría de los casos, los resultados convencionales de TD-DFT en una descripción de un estado excitado en términos de varias excitaciones electrónicas individuales de un orbital virtual ocupado. Por otro lado, todas las contribuciones de una excitación electrónica dada pueden ser clarificadas por un análisis de Transición Natural Orbital (TNO)⁹⁰, el cual provee una representación de orbital compacto de la transición electrónica a través de una configuración única de una interacción *hole* y *electrón* en un estado particular. Consecuentemente, el proceso de transferencia de electrón fotoinducida

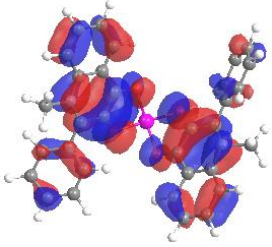
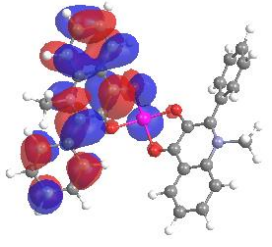
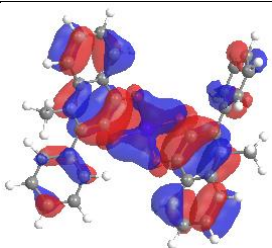
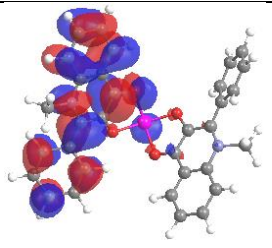
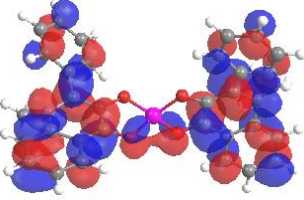
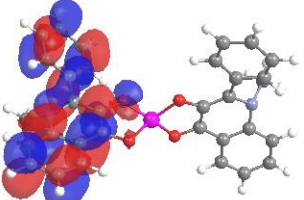
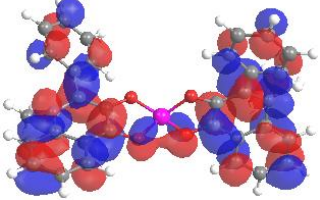
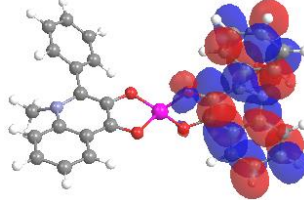
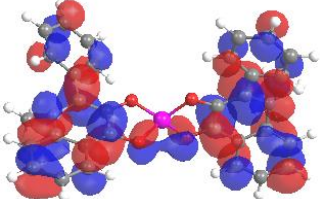
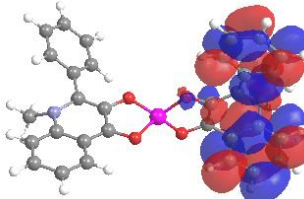
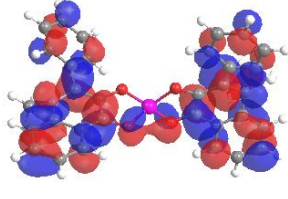
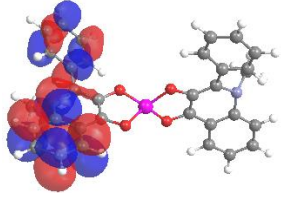
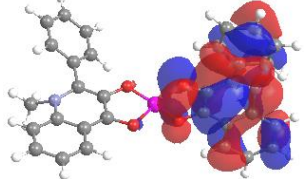
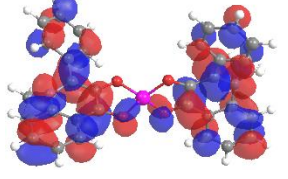
no está representado por un simple cambio en la ocupación orbital molecular elemental, pero en una distribución *hole-electrón*.

La figura 80 muestra la distribución de TNO para **4** (HL), Al(L)^{2+} y Al(L)_2^+ . Para el ligante HL el *hole* se distribuye alrededor de la parte de la hidroxiquinolina, mientras que el *electrón* es principalmente distribuido alrededor de la unidad de fenilo con una contribución de la hidroxiquinolina, confiriendo una distribución homogénea para la transición electrónica.

Los parámetros para cada transición electrónica son mostrados en la figura 80, los cuales proveen los valores de la longitud de onda en nanómetros, la fuerza del oscilador (f) y el coeficiente TNO (w) representando la extensión a la cual la excitación electrónica puede ser escrita como una única excitación. Además, la banda de mínima energía observada experimentalmente alrededor de 500 nm puede ser adscrita los niveles HOMO-LUMO por simple comparación con el espectro calculado de **4**. Un patrón similar es observado para las configuraciones del HOMO-1-LUMO, pero en el caso de la configuración HOMO-LUMO+1 tanto como el *hole* y el *electron*, están localizados a través de la molécula dando lugar a una banda de absorción de mayor energía. Una distribución de tipo *hole-electron* similar es observada para los complejos, sin embargo, en el caso de $[\text{Al(L)}]$ (figura 80, entradas C-D) el *hole* TNO está mayormente distribuido en el ion metálico Al y el ligante **4**, mientras que el *electron* está distribuido únicamente en el ligante **4**, confiriendo así un carácter de transferencia de carga de metal a ligante (MLCT) a esta transición electrónica con una alta probabilidad de desactivación radiativa $S_1 \rightarrow S_0$. Interesantemente, este efecto no se observa para $[\text{Al(L)}_2]$ (figura 80, entradas E-M) y únicamente se observa la contribución del metal para la transición de absorción, $S_0 \rightarrow S_1$. La transición de emisión de baja energía ($S_1 \rightarrow S_0$) involucra una fuerte redistribución de electron con carácter transferencia de carga inter-ligante (ILCT) promoviendo una desactivación no radiativa.⁹¹ en el caso de las transiciones de absorción, un claro proceso de MLCT ocurre con una polarización de electrón cuadrupolar del centro metálico a los ligantes como se muestra en la figura 80,

entrada E o una polarización dipolar como se muestra en las entradas F y G. Para las emisiones de transición de ILCT solo la polarización dipolar es observada para todas las configuraciones de *hole-electron* entre uno de los ligantes de todo el complejo y viceversa, figura 80, entradas H-M.

	Hole	Electron
A) HQ2 S_0 $E = 3.558 \text{ eV}$ $f = 0.069$ $w = 0.93$		
B) HQ2 S_1 $E = 3.632 \text{ eV}$ $f = 0.173$ $w = 0.98$		
C) [Al(HQ2)] S_0 $E = 3.230 \text{ eV}$ $f = 0.098$ $w = 0.88$		
D) [Al(HQ2)] $S_1 - MLCT$ $E = 3.269 \text{ eV}$ $f = 0.121$ $w = 0.96$		
E) [Al(HQ2)2] $S_0 - MLCT$ $E = 2.552 \text{ eV}$ $f = 0.056$ $w = 0.99$		

<p>F) [Al(HQ2)₂] S₀-MLCT <i>E</i> = 3.222 eV <i>f</i> = 0.136 <i>w</i> = 0.96</p>		
<p>G) [Al(HQ2)₂] S₀-MLCT <i>E</i> = 3.807 eV <i>f</i> = 0.003 <i>w</i> = 0.99</p>		
<p>H) [Al(HQ2)₂] S₁-ICT <i>E</i> = 1.889 eV <i>f</i> = 0.082 <i>w</i> = 0.94</p>		
<p>I) [Al(HQ2)₂] S₁-ICT <i>E</i> = 2.050 eV <i>f</i> = 0.075 <i>w</i> = 0.91</p>		
<p>J) [Al(HQ2)₂] S₁-ICT <i>E</i> = 2.361 eV <i>f</i> = 0.058 <i>w</i> = 0.92</p>		
<p>K) [Al(HQ2)₂] S₁-ICT <i>E</i> = 2.376 eV <i>f</i> = 0.076 <i>w</i> = 0.93</p>		
<p>L) [Al(HQ2)₂] S₁-ICT <i>E</i> = 2.889 eV <i>f</i> = 0.233 <i>w</i> = 0.93</p>		

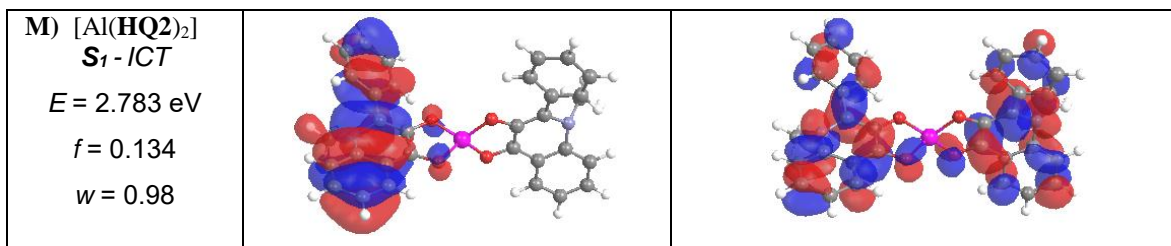


Figura 80. Transición Natural de Orbitales (TNOs) calculada por B3LYP/6-31+G(d,p) por 4 (HL), y B3LYP/LANL2DZ para [Al(L)²⁺] y [Al(L)₂⁺]. La columna izquierda muestra el estado electrónico basal (S₀) o excitado (S₁), el valor de la energía en eV, la fuerza del oscilador (*f*), el eigen valor TNO (*w*) y la ocupación OM.

Así, la figura 81 ilustra la propuesta del mecanismo de detección de la fluorescencia usando energías de transición TNO de 4 (HL) tras la coordinación con Al(III) con estequiometría 1:1 (AIL²⁺) y 1:2 (AIL₂⁺).

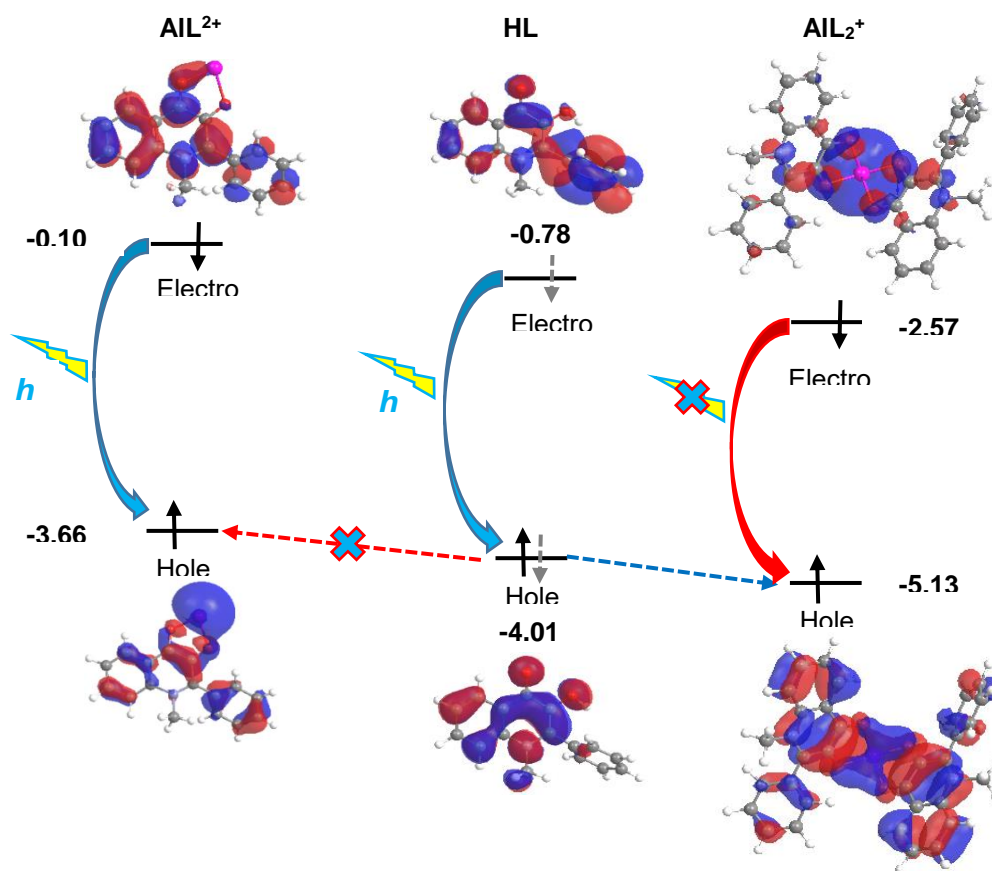


Figura 81. Representación esquemática del mecanismo de fluorescencia usando energías de transición TNO de 4 (HL) tras la coordinación Al³⁺ con estequiometría 1:1 (AIL²⁺) y 1:2 (AIL₂⁺)

(A. Jiménez, *personal communication*, noviembre de 2019).

8.2 Ecuaciones empleadas

Anexo I

Se conoce la constante de disociación ácida del ligante

$$K_a = \frac{[L^-][H^+]}{[LH]} \dots (1)$$

Despejando [LH] de ... (1)

$$[LH] = \frac{[L^-][H^+]}{K_a} \dots (1a)$$

Ahora la constante de equilibrio de formación del complejo metal/ligante 1:1 a partir del catión metálico y el ligante desprotonado, se define como

$$K_{ML} = \frac{[ML]}{[M][L^-]} \dots (2)$$

Mientras que la K_{ML}^{obs} corresponde a la constante de estabilidad experimental que considera la concentración total del ligante

$$K_{ML}^{obs} = \frac{[ML]}{[M]([L^-] + [LH])} \dots (3)$$

Sustituyendo [LH] de (1a) en la ecuación (3)

$$K_{ML}^{obs} = \frac{[ML]}{[M]([L^-] + \frac{[L^-][H^+]}{K_a})}$$

Simplificando (3) queda de la siguiente forma

$$K_{ML}^{obs} = \frac{[ML]}{[M][L^-] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_a}\right)} \dots (3)$$

Ahora se sustituye (2) en (3)

$$K_{ML}^{obs} = \frac{K_{ML}}{1 + \frac{[H^+]}{K_a}} \dots (4)$$

En condiciones cuando el ligante se encuentra principalmente en forma protonada, se cumple la relación $pH < pK_a$ y $[H^+]/K_a \gg 1$ y la ecuación (4) se transforma en

$$K_{ML} = K_{ML}^{obs} \frac{[H^+]}{K_a}$$

Aplicando las leyes de los logaritmos tenemos la siguiente expresión

$$\log K_{ML} = \log K_{obs} + pK_a^{HL} - pH$$

Ecuación de ajuste de las curvas de titulación en condiciones de alto exceso del titulante

$$y = (A + B \cdot C \cdot x) / (1 + C \cdot x)$$

Donde:

y = Absorbancia (o fluorescencia) observada

A = Absorbancia (o fluorescencia) inicial

B = Absorbancia (o fluorescencia) final

C = Constante de estabilidad

x = concentración total del ligante (titulante)

Esta ecuación se emplea cuando cumplen condiciones $x \gg$ concentración del receptor

Ecuación de ajuste de las curvas de titulación en condiciones sin exceso del titulante

$$y = A + 0.5 \cdot B \cdot (C + x + 1/K - ((C + x + 1/K)^2 - 4 \cdot C \cdot x)^{0.5})$$

Donde:

y = Absorbancia (o fluorescencia) observada

A = Absorbancia (o fluorescencia) inicial

B = $\epsilon_f - \epsilon_0$, la diferencia en absorptividad molar de complejo y receptor libre

C = Concentración total del receptor

K = la constante de estabilidad

x = concentración total del ligante (titulante)

Cálculo de la concentración de cada adición del analito en una titulación

$$conc.f = \frac{(conc.i \cdot vol_{at})}{(vol_{at} + vol_{cel})}$$

Donde:

conc.f: concentración del analito titulante en la celda

conc.i: concentración de la disolución stock inicial del analito

vol_{at}: volumen de analito titulante añadido

vol_{cel}: volumen inicial en la celda antes de adiciones del analito titulante)

Referencias

1. Valeur, B. Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition, *Coord. Chem. Rev.* 2000, 205 3–40.
2. Valeur B., *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, 2001, Paris, Francia, Wiley-VCH Verlag GmbH.
3. Sedgwick, A. C.; Wu, L.; Han, H.-H.; Bull, S. D.; He, X.-P.; James, T. D.; Sessler, J. L.; Tang, B Z.; Tian, H.; Yoon, J. Excited-state intramolecular proton-transfer (ESIPT) based fluorescence sensors and imaging agents, *Chem. Soc. Rev.*, 2018, 47, 8842—8880.
4. a) Wu, J.; Liu, W.; Ge, J.; Zhang, H.; Wang, P. New sensing mechanisms for design of fluorescent chemosensors emerging in recent years, *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 3483–3495; b) Zhao, J.; Ji, S.; Chen, Y.; Guo, H.; Yang, P. Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT): from principal photophysics to the development of new chromophores and applications in fluorescent molecular probes and luminescent materials, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012, 14, 8803–8817.
5. Tang, L.; Cai, M.; Zhou, P.; Zhao, J.; Zhong, K.; Hou, S.; Bian, Y. A highly selective and ratiometric fluorescent sensor for relay recognition of zinc(II) and sulfide ions based on modulation of excited-state intramolecular proton transfer, *RSC Adv.* 2013, 3, 16802–16809.
6. Shinkai, S.; Tsukagoshi, K.; Ishikawa, Y.; Kunitake, T. Molecular recognition of mono- and di-saccharides by phenylboronic acids in solvent extraction and as a monolayer, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1991, 15, 1039.
7. De Marchi, S.; Cecchin, E.; Basil, A.; Proto, G.; Donation, W.; Jengo, A.; Schinella, D.; Jus, A.; Villalta, D.; De Paoli, P.; Santini, G.; Tesio, F. Close Genetic Linkage between HLA and Renal Glycosuria, *Am. J. Nephrol.* 1984, 5, 280.
8. Baxter, P.; Goldhill, J.; Hardcastle, P. T.; Taylor, C. Enhanced intestinal glucose and alanine transport in cystic fibrosis, *J. Gut* 1990, 31, 817.

-
9. Yasuda, H.; Kurokawa, T.; Fuji, Y.; Yamashita, A.; Ishibashi, S. Decreased D-glucose transport across renal brush-border membrane vesicles from streptozotocin-induced diabetic rats, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1021*, 114.
 10. Landsberg, J. P.; McDonal, B.; Watt, F. Absence of aluminium in neuritic plaque cores in Alzheimer's disease *Nature* **1992**, *360*, 65-68.
 11. a) Hoch, M. Organotin compounds in the environment — an overview, *Appl. Geochem.* **2001**, *16* 719–743. b) Fent, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites, *Toxicology* **2004**, *205*, 223–240.
 12. Alzieu C., Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment, *Ocean Coast. Manage.* **1998**, *40*, 23–36.
 13. a) Berg, J. M.; Shi Y. The Galvanization of Biology: A Growing Appreciation for the Roles of Zinc, *Science*, **1996**, *271*, 1081–1085; (b) Assaf, S. Y.; Chung, S. H. Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity, *Nature* **1984**, *308*, 734–736.
 14. Walker, C. F.; Black, R. E.; Zinc and the risk for infectious disease, *Annu. Rev. Nutr.* **2004**, *24*, 255–275.
 15. Gryniewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R.Y.; A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3440.
 16. Verkman, A. S.; Sellers, M. C.; Chao, A. C.; Leung, T.; Ketcham, R. Synthesis and characterization of improved chloride-sensitive fluorescent indicator for biological applications, *Analytical Biochemistry* **1989**, *178*, 355-361.
 17. Nguyen, B. T.; Anslyn, E. V. Indicator–displacement assays, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3118–3127.
 18. James, T. D., et al., *Boronic acids in saccharide recognition*, Cambridge, **2006** UK, The Royal Society of Chemistry.
 19. Zhang, X.; Liu, G.; Ning, Z.; Xing, G. Boronic acid-based chemical sensors for saccharides, *Carbohydrate Research*, **2017**, *452*, 129-148
 20. Springsteen, G.; Wang, B. Alizarin Red S. as a general optical reporter for studying the binding of boronic acids with carbohydrates, *Chem. Commun.*, **2001**, 1608–1609.

-
21. Heeb, S.; Fletcher, M. P.; Chhabra, S. R.; Diggle, S. P.; Williams, P.; Cámara, M. Quinolones: from antibiotics to autoinducers, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2011**, *35*, 247–274.
22. Falkovskaia, E.; Sengupta P. K.; Kasha, M. Photophysical induction of dual fluorescence of quercetin and related hydroxyflavones upon intermolecular H-bonding to solvent matrix, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *297*, 109–114.
23. Arey, J.; Atkinson, R.; Zielinska, B; McElroy, P. A. Nitration of acephenanthrylene under simulated atmospheric conditions and in solution and the presence of nitroacephenanthrylene(s) in ambient particles, *Environ. Sci. Technol.*, **1989**, *23*, 321.
24. Klessinger, M.; Michl, J. Excited States and Photochemistry of Organic Molecules, VCH Publishers, Inc. New York **1995**, 537 pp.
25. Streng, W.H. Physical chemical characterization of drug substances, *Drug Discov. Today* **1997** *2*, 415.
26. Kamal, A.; Srinivasulu, V.; Sathish, M.; Tangella, Y.; Nayak, V. L.; Rao, M. P. N.; Shankaraiah N.; Nagesh, N. Palladium-Catalyzed Aryl C-H Activation and Tandem ortho-Hydroxylation/Alkoxylation of 2-Aryl Benzimidazoles: Cytotoxicity and DNA-Binding Studies, *Asian J. Org. Chem.* **2014**, 68–76.
27. Hradil, P.; Hlaváč, J.; Lemr, K. Preparation of 1,2-disubstituted-3-hydroxy 4(1H)-quinolinones and the influence of substitution on the course of cyclization, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1999**, *36*, 141–144.
28. Henary, M. M.; Fahrni, C. J. Excited State Intramolecular Proton Transfer and Metal Ion Complexation of 2-(2'-Hydroxyphenyl)benzazoles in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 5210–5220.
29. Holler, M. G.; Campo, L. F.; Brandelli, A.; Stefani, V. Synthesis and spectroscopic characterisation of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazole isothiocyanates as new fluorescent probes for proteins, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2002**, *149*, 217–225.

-
30. Wu, Y.; Peng, X.; Fan, J.; Gao, S.; Tian, M.; Zhao, J.; August, R. V. Fluorescence Sensing of Anions Based on Inhibition of Excited-State Intramolecular Proton Transfer, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 62–70.
31. Gunnlaugsson, T.; Davis, A. P.; Hussey, G. M.; Tierney, J.; Glynn, M. Design, synthesis and photophysical studies of simple fluorescent anion PET sensors using charge neutral thiourea receptors *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1856–1863.
32. Ríos Vázquez, S.; Pérez Lustres, J. L.; Rodríguez-Prieto, F.; Mosquera, M.; Ríos Rodríguez, M. C. Excited-state proton and charge transfer in protonated amino and methylated derivatives of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzimidazole, *Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*, 2475–2489.
33. Bilokin', M. D.; Shvadchak, V. V.; Yushchenko, D. A. G.; Duportail, Mély; Y.; Pivovarenko, V. G. Dual-fluorescence probe of environment basicity (hydrogen bond accepting ability) displaying no sensitivity to polarity, *J Fluoresc.* **2009**, *19*, 545–553.
34. Formica, M.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Micheloni, M. New fluorescent chemosensors for metal ions in solution, *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 170–192.
35. Segala, M.; Domingues, N. S. C., Krug, Livotto, P.R.; Stefani, V. Heterocyclic dyes displaying excited-state intramolecular proton-transfer reactions (ESIPT): computational study of the substitution effect on the electronic absorption spectra of 2-(2'-hydroxyphenyl)-1,3-benzoxazole derivatives, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, *9*, 1861.
36. Hillebrand, S.; Segala, M.; Buckup, T.; Correia, R.R.; Horowitz, F.; Stefani, V. First hyperpolarizability in proton-transfer benzoxazoles: computer-aided design, synthesis and study of a new model compound, *Chem. Phys.* **2001**, *273*, 1.
37. a) Costela, A.; Garcia-Moreno, I.; Mallavia, R.; Amat-Guerri, F.; Barroso, J.; Sastre, R. Proton-transfer lasers based on solid copolymers of modified 2-(2'-hydroxyphenyl)benzimidazoles with methacrylate monomers, *Opt. Commun.* **1998**, *152*, 89 b) Catalán, J.; Del Valle, J.C. Toward the photostability mechanism of intramolecular hydrogen bond systems. The photophysics of 1'-hydroxy-2'-acetonephthone, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4321.

-
38. a) Rodríguez-Prieto, F.; Penedo, J. C.; Mosquera, M. Solvent control of molecular structure and excited-state proton-transfer processes of 1-methyl-2-(2'-hydroxyphenyl)benzimidazole, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1998**, *94*, 2775 – 2782.
- b) Das, K.; Sarkar, N.; Ghosh, A. K.; Majumdar, D.; Nath, D. N.; Bhattacharyya, K. Excited-State Intramolecular Proton Transfer in 2-(2-Hydroxyphenyl)benzimidazole and -benzoxazole: Effect of Rotamerism and Hydrogen Bonding, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 9126 –9132.
39. Shaikh, M.; Choudhury, D.; Mohanty, A. C.; Bhasikuttan, W., Nau, M.; Pal, H. Modulation of Excited-State Proton Transfer of 2-(2'-Hydroxyphenyl)benzimidazole in a Macrocyclic Cucurbit[7]uril Host Cavity: Dual Emission Behavior and pK_a Shift, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 12362 – 12370.
40. Johnston, W. D.; Freiser, H. Structure and behavior of organic analytical reagents: Stability of chelates of 2-(o-hydroxyphenyl)-benzimidazole and analogous reagents, *Analyt. Chim. Acta*, **11**, 1954, 301-308
41. Tong, Y.; Zheng, S.; Chen, X. Structures, Photoluminescence and Theoretical Studies of Two Zn II Complexes with Substituted 2-(2-Hydroxyphenyl) benzimidazoles, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 3734–3741.
42. Buchtík, R.; Nemeč I.; Trávníček Z. A zinc(II) quinolinone complex (Et₃NH)[Zn(qui)Cl₂]: Synthesis, X-ray structure, spectral properties and in vitro cytotoxicity, *J. Mol. Struct.* **2014**, *1060*, 42–48.
43. Buchtík R., Trávníček Z., Vančo J., Herchel R., Dvořák Z. Synthesis, characterization, DNA interaction and cleavage, and in vitro cytotoxicity of copper(II) mixed-ligand complexes with 2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone. *Dalton Trans.* **2011**, *4*, 9404–9412.
44. Pivovarenko, V. G.; Bugera, O.; Humbert, N.; Klymchenko, A. S.; Yves, M. A Toolbox of Chromones and Quinolones for Measuring a Wide Range of ATP Concentrations, *Chem. Eur. J.* **2017**, 11927–11934.

-
45. Malešev, D.; Kuntić, V. Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions, *J. Serb. Chem. Soc.* **2007**, *72*, 921–939.
46. Davila, Y. A.; Sancho, M. I.; Almandoz, M. C.; Blanco, S. E. Structural and spectroscopic study of Al(III)–3-hydroxyflavone complex: Determination of the stability constants in water–methanol mixtures, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2012**, *95*, 1–7.
47. Jimenez-Sanchez, A.; Yatsimirsky, A.K.; Acid–base and coordination properties of 2-phenyl-3-hydroxy-4-quinolones in aqueous media, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 62116–62127.
48. Yushchenko, D. A.; Shvadchak, V. V.; Klymchenko, A. S.; Duportail, G.; Mely, Y.; Pivovarenko, V. G. 2-Aryl-3-hydroxyquinolones, a new class of dyes with solvent dependent dual emission due to excited state intramolecular proton transfer, *New J. Chem.* **2006**, *30*, 774–781.
49. Harris, W. R.; Raymond, K. N.; Weigl, F. L. Ferric ion sequestering agents. 6. The spectrophotometric and potentiometric evaluation of sulfonated tricatecholate ligands, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2667–2675.
50. Engelmann, M.D.; Hutcheson, R.; Cheng, I.F. Stability of Ferric Complexes with 3-Hydroxyflavone (Flavonol), 5,7-Dihydroxyflavone (Chrysin), and 3',4'-Dihydroxyflavone, *J. Agric, Food Chem.* **2005**, *53*, 2953.
51. Trejo-Huizar, K. E.; Jiménez-Sánchez, A.; Martínez-Aguirre, M. A.; Yatsimirsky, A. K. Fluorescence ratiometric sensing of polyols by phenylboronic acid complexes with ligands exhibiting excited-state intramolecular proton transfer in aqueous micellar media, *J. Lumin.* **2016**, *179*, 393–401.
52. E. Fuguet, C. Rafols, M. Roses, E. Bosch, Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems, *Analyt. Chim. Acta* **548** (2005) 95–100
53. Winefordner, J. D.; Long, G. L. Limit of Detection. A closer look at the IUPAC definition, *Analytical Chemistry* **1983**, *55*, 712-724.

-
54. Springsteen, G.; Wang, B.; A detailed examination of boronic acid–diol complexation, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5291-5300.
55. Kim, D. H.; Faull, K. F.; Norris, A. J.; Eckhert, C. D. Borate–nucleotide complex formation depends on charge and phosphorylation state, *J. Mass Spectrom.* **2004**; *39* 743–751)
56. Lim, N. C.; Freake, H. C.; Bruckner, C. Illuminating Zinc in Biological Systems, *Chem.–Eur. J.* **2005**, *11*, 38–49.
57. Burgess, M.; Rangel, M. Hydroxypyranones, Hydroxypyridinones, and their Complexes, Van Eldik (Ed.), Academic Press, Amsterdam, *Advances in Inorganic Chemistry* **2008**, *60*, 167-243.
58. Buglyó, P.; Bíró, L.; Nagy, I.; Szocs, B.; Farkas, E. Hydroxypyronate, thiohydroxypyronate and hydroxypyridinonate derivatives as potential Pb²⁺ sequestering agents, *Polyhedron* **2015**, *92*, 7–11.
59. Timoshnikova, V.A.; Klimentieva, V.I.; Polyakova, N.E.; Kontoghiorghes, G.J. Photoinduced transformation of iron chelator deferiprone: Possible implications in drug metabolism and toxicity, *J. Photochem. Photobiol., A* **2014**, *289*, 14–21.
60. Farkas, E.; Enyedy, E. A.; Zekany, L.; Deak, G. Interaction between iron (II) and hydroxamic acids: oxidation of iron(II) to iron (III) by desferrioxamine B under anaerobic conditions, *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *83*, 107–114.
61. pFe se define como el logFe_{fibre} cuando Fe_{Tot} = 10⁻⁶ M y L_{Tot} = 10⁻⁵ M a pH 7.4.
62. Davis, B. M.; Richens, J. L.; O’Shea, P. Label-Free Critical Micelle Concentration Determination of Bacterial Quorum Sensing Molecules, *Biophys. J.* **2011**, *101*, 245–254.
63. Diggle, S.P.; Matthijs, S.; Wright, V.J.; Fletcher, M.P.; Chhabra, S.R.; Lamont, I.L.; Kong, X.; Hider, R.C.; Cornelis, P.; Camara, M.; Williams, P. The pseudomonas aeruginosa 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 87–96.
- ⁶⁴Nurchi, V. M.; Crisponi, G.; Pivetta, T.; Donatoni, M.; Remelli, M. Potentiometric, spectrophotometric and calorimetric study on iron(III) and copper(II) complexes with 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridinone, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, *102*, 684–692

-
65. Buzfás, N.; Gajda, T.; Nagy, L.; Kuzmann, E.; Vertes, A.; Burger, K. Unusual coordination behavior of D-fructose towards dimethyltin(IV): metal-promoted deprotonation of alcoholic OH groups in aqueous solutions of low pH, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *274*, 167-176
66. Santana, F. A. De; Barbosa, J. T. P.; Matos, G. D.; Korn, M. G. A.; Ferreira, S. L. C. Direct determination of gallium in bauxite employing ICP OES using the reference element technique for interference elimination, *Microchem. J.* **2013**, *110*, 198–201.
67. Kasprzak, M. M.; Erxleben, A.; Ochocki, J. Properties and applications of flavonoid metal complexes, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 45853–45877.
68. Rurack, K. Flipping the light switch 'ON' — the design of sensor molecules that show cation-induced fluorescence enhancement with heavy and transition metal ions, *Spectrochim. Acta, Part A* **2001**, *57*, 2161–2195.
69. Protti, S.; Mezzetti, A.; Lapouge, C.; Cornard, J.-P. Photochemistry of metal complexes of 3-hydroxyflavone: towards a better understanding of the influence of solar light on the metal–soil organic matter interactions, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 109–119.
70. Blunden, S. J.; Smith, P. J. Synthesis and Spectroscopic Studies of Organotin Derivatives of 3-Hydroxyflavon, *J. Organomet. Chem.* **1982**, *226*, 157-163.
71. Mulon, J.-B.; Destandau, E.; Alain, V.; Bardez, E. How can aluminium(III) generate fluorescence? *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1749–1755.
72. Porter, L. J.; Markham, K. R. The Aluminium (III) Complexes of Hydroxy-flavones in Absolute Methanol. Part 1. Ligands containing Only One Chelating Site, *J. Chem. Soc. (C)*, **1970**, 344-349.
73. Boudet, A.-C.; Cornard, J.-P.; Merlin, J.-C.; Conformational and spectroscopic investigation of 3-hydroxyflavone–aluminium chelates, *Spectrochim. Acta, Part A* **2000**, *56*, 829–839.
74. Dangleterre, L.; Cornard, J.-P.; Lapouge, C. Spectroscopic and theoretical investigation of the solvent effects on Al(III)–hydroxyflavone complexes, *Polyhedron* **2008**, *27*, 1581–1590.

-
75. Valente, J. V.; Buntine, M. A.; Lincoln, S. F.; Ward, A. D. UV–Vis and fluorimetric Al³⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ complexation studies of two 3-hydroxyflavones and a 3-hydroxythioflavone, *Inorg. Chim. Acta* **2007**, *360*, 3380–3386.
76. Moncomble, A.; Falantin, C.; Cornard, J.-P., Electronic Spectroscopies Combined with Quantum Chemistry Calculations: Study of the Interactions of 3-Hydroxyflavone with Copper Ions, *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 8943–8951.
- 77 (a) Chhatwal, M.; Kumar, A.; Singh, V., Gupta, R. D.; Awasthia, S. K. Addressing of multiple-metal ions on a single platform, *Coordination Chemistry Reviews* **2015**, *292*, 30–55; (b) Schmittel, M.; Lin, H.-W. Quadruple-Channel Sensing: A Molecular Sensor with a Single Type of Receptor Site for Selective and Quantitative Multi-Ion Analysis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 893–896.
78. Bianchi, A.; Bowman-James, K.; Garcia-Espana, E. Supramolecular Chemistry of Anions, Wiley–VCH, New York, **1997**.
79. Roberts, S. M.; Molecular Recognition: Chemical and Biochemical Problems, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1989**.
80. Beyersmann, D.; Haase, H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells, *BioMetals* 2001, *14*, 331–341.
81. Festa, R. A.; Thiele, D. J. Copper: an Essential Metal in Biology, *Curr Biol.* **2011**, *21*, R877–R883.
82. Gad, S.C.; Pham, T. Magnesium, *Encyclopedia of Toxicology*, **2014**, *3*, 127-129
83. Gomez, D. E.; Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Monzani, E. Org. Urea vs. thiourea in anion recognition, *Biomol. Chem.* **2005**, *38*, 1495–1500.
- 84 C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters, *Chem. Rev.* 1991, *91*, 165-195.
85. Perez-Casas, C.; Yatsimirsky, A. K. Detailing Hydrogen Bonding and Deprotonation Equilibria between Anions and Urea/Thiourea Derivatives, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2275-2284.
- 86 Bordwell pKa data: <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/pkatable/index.htm>
- 87 Erbas-Cakmak, S.; Kolemen, S.; Sedgwick, A. C.; Gunnlaugsson, T.; James, T. J.; Yoon, J.; Akkaya, E. U. Molecular logic gates: the past, present and future, *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*, 2228-2248

-
88. Barni, E.; Savarino, P.; Marzona, M.; Piva, M. 2-(4-Alkylamido-2-hydroxyphenyl)benz-X-azoles as Intermediates for the Synthesis of Dyes [1], *J. Heterocyclic Chem.*, **1983**, *20*, 1517-1521.
89. Davila, Y.A.; Sancho, M.I.; Almandoz, M.C.; Blanco, S.E.; Structural and spectroscopic study of Al(III)–3-hydroxyflavone complex: Determination of the stability constants in water–methanol mixtures, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2012**, *95* 1–7.
90. Martin, R. L. Natural transition orbitals, *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 4775-4777.
91. a) Burel, L.; Mostafavi, M.; Murata, S.; Tachiya, M. Transient Effect in Fluorescence Quenching by Electron Transfer. 4. Long-Range Electron Transfer in a Nonpolar Solvent, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 5882–5888. b) Ito, A.; Fang, Z.; Brennaman, M. K.; Meyer, T. J. Long-range photoinduced electron transfer dynamics in rigid media, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, **2014**, 4880–4891. c) Ito, A.; Stewart, D. J.; Fang, Z.; Brennaman, M. K.; Meyer, T. J. Sensitization of ultra-long-range excited-state electron transfer by energy transfer in a polymerized film, *PNAS*, **2012**, *109*, 15132–15135.



Full Length Article

Fluorescence ratiometric sensing of polyols by phenylboronic acid complexes with ligands exhibiting excited-state intramolecular proton transfer in aqueous micellar media



Karla Elisa Trejo-Huizar, Arturo Jiménez-Sánchez, Mayte A. Martínez-Aguirre, Anatoly K. Yatsimirsky*

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 March 2016

Received in revised form

20 June 2016

Accepted 2 July 2016

Available online 7 July 2016

Keywords:

Ratiometric sensing

ESIPT

3-hydroxy-4-quinolone

Micellar medium

ABSTRACT

2-Phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone possessing dual fluorescence due to excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) forms stable complex with phenylboronic acid with blue shifted emission maximum in micellar medium of a cationic surfactant even though the compound lacks required for complexation with boronic acids *cis*-diol structure. No complexation is observed in the presence of neutral or anionic surfactants. Titrations of this complex with polyols including sugars and nucleotides at pH 8 displace free quinolone showing ratiometric response, which allows determination of polyols with detection limits 0.05–1 mM and unusually wide linear dynamic ranges. Another ESIPT dye 2-(2'-hydroxyphenyl)-1H-benzimidazole also lacking *cis*-diol structure forms equally stable complex with phenylboronic acid and allows ratiometric determination of polyols with similar characteristics. The results of this study demonstrate that blocking ESIPT of signaling molecule by complexation of the receptor with the proton donor group eliminates the low energy emission from tautomeric form but strongly enhances the high energy emission typical for "normal" form of signaling molecule creating a possibility of ratiometric sensing.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Boronic acid–diol complexation is one of the most successful approaches to recognition of saccharides and other polyols [1]. Among other sensing techniques the fluorometric detection is very popular due to its high sensitivity [2]. However, some known disadvantages of fluorometry such as strong dependence of the signal intensity on instrumental parameters and possible photodegradation of the fluorophore pose serious limitations on practical applicability of these methods. These problems are largely eliminated by using ratiometric technique where instead of absolute fluorescence intensity one measures the ratio of the signals at two wavelengths, which also eliminates the necessity to keep the exact concentration of the receptor used for the calibration plot. The ratiometric method is especially important for biological samples e.g. for intracellular monitoring of analytes when the exact concentration of the sensor is unknown and the sensor may be involved in several non-specific interactions affecting the absolute

fluorescence intensity [3,4]. In a recent review [5] the fluorescence compounds possessing such features as internal charge transfer (ICT), excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT), fluorescence resonance energy transfer (FRET), throughbond energy transfer (TBET), and monomer–excimer formation were identified as most useful for development of ratiometric sensors.

The ratiometric boronic acid based sensors for polyols are rare and in many cases are based on weak complexation induced signals. They involve a boronic acid fluorescent sensor obtained by condensation of 3-nitronaphthalic anhydride with 3-aminophenylboronic acid, [6] related system for catecholamine sensing, [7] 6-aminoquinolinium boronic acid probes, [8] near-infrared photonic crystal materials, [9] amphiphilic sensor containing a pyrene unit (excimer based ratiometric method), [10] fluorescent probe based on gold nanoclusters and alizarin red–boronic acid complex [11]. In a search for more efficient systems we explore here a possible use of complexes of phenylboronic acid (PBA) with 2-phenyl-3-hydroxy-4-quinolones (1), recently reported ESIPT–based dual emission probes for solvent polarity [12], in an indicator displacement mode. Although these compounds lack classical *cis*-diol structure required for tight boronic acid

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223813; fax: +52 55 5616 2010.

E-mail address: anatoli@unam.mx (A.K. Yatsimirsky).

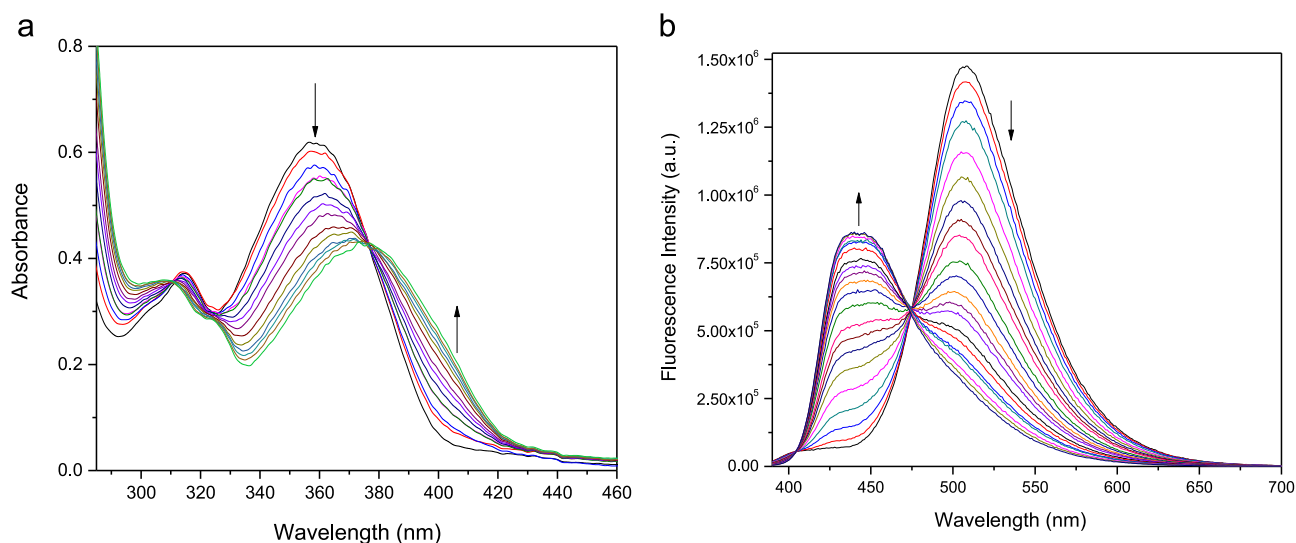
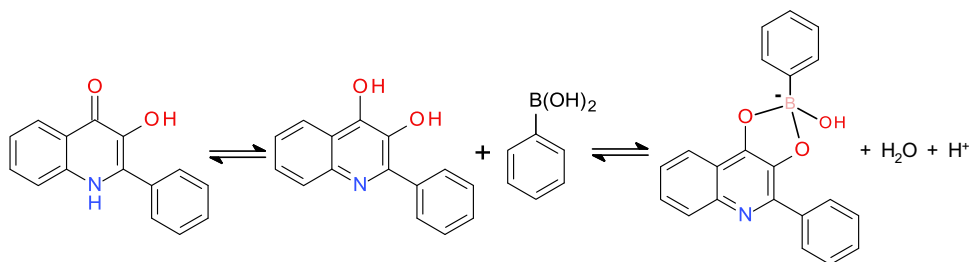


Fig. 1. (a) UV-visible spectra of 80 μM **1a** in 5 mM HTAB at pH 8 and variable concentration of PBA (0–1 mM). (b) Fluorescence spectra (excitation at 377 nm) of 40 μM **1a** in 5 mM HTAB at pH 8 and variable concentration of PBA (0–1 mM). Arrows show directions of the spectral changes on increase in PBA concentration.



Scheme 1. Reaction between **1a** and phenylboronic acid.

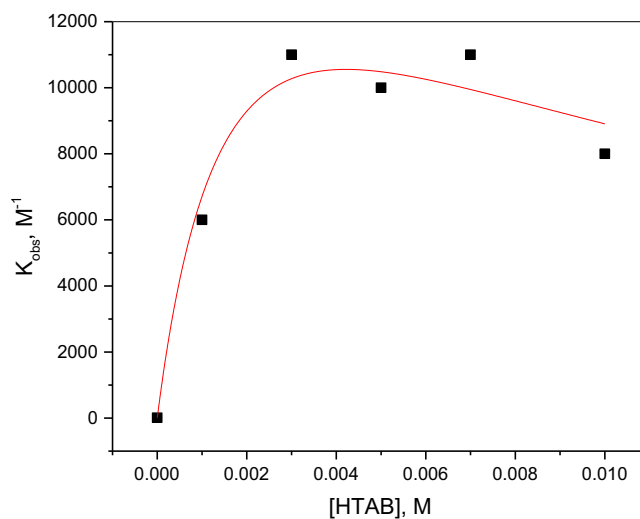
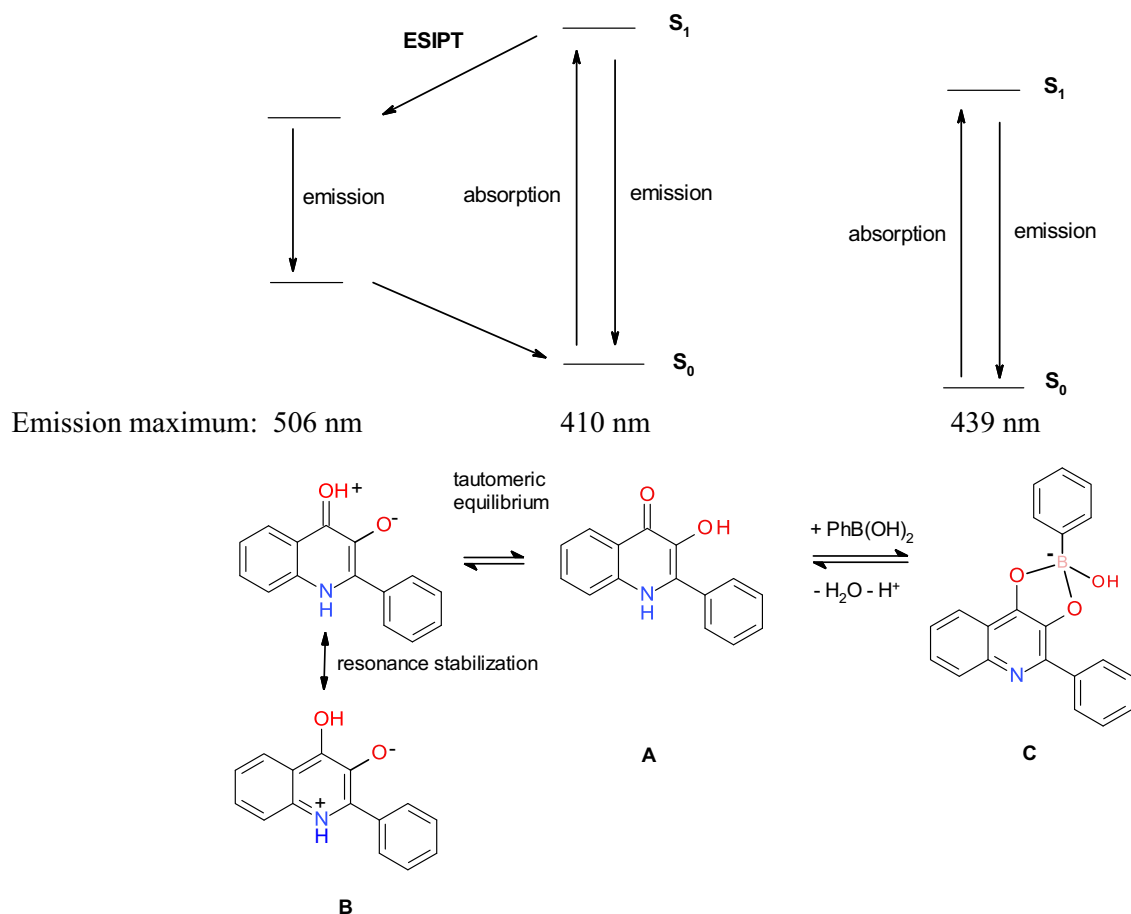


Fig. 2. Equilibrium constants K_{obs} [M^{-1}] for reaction of **1a** with PBA at pH 8 and variable HTAB concentration.

complexation we found that cationic surfactants strongly promote the formation of boronate complex with **1a** accompanied with a significant shift in the emission maximum, which is a prerequisite for application of ratiometric technique. Previously we reported optical, acid–base and coordination properties of **1** in water and aqueous micellar solutions [13].

Independently we observed strong complexation of PBA with 2-(2'-hydroxyphenyl)-1H-benzimidazole (**2**), a compound with known ESIPT properties already employed for ratiometric detection of metal ions [4,14]. The micellar effect on the complex stability in this case was small, but the optical properties of the system were greatly improved in the micellar medium.



Scheme 2. Interrelation between emission maxima and structures of tautomeric forms and the boronate complex of **1a**.

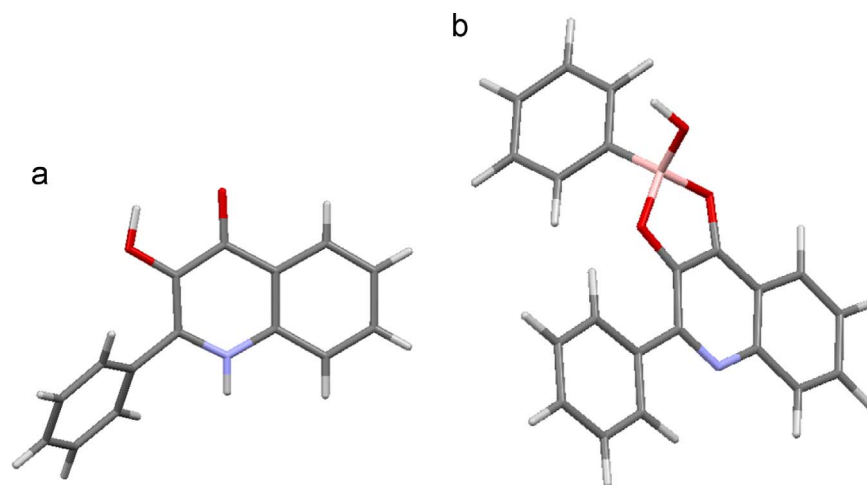


Fig. 3. Structures of **1a** [25] (a) and its complex with PBA (b). PBA complex was optimized using DFT at the PBE0/G-31 + G(d,p) level of theory.

2. Experimental section

2.1. Materials and physical measurements

Commercially available starting materials, components of buffer solutions (CHES, MOPS, MES), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), hexadecyltrimethylammonium chloride (HTAC), hexadecyltrimethylammonium hydrogen sulfate (HTAH), sodium

dodecyl sulfate (SDS), TWEEN-20, Triton X-100, compound **2** and flavonol (**3**) were used as supplied. The critical micelle concentration of HTAB was determined by variation of air/aqueous solution surface tension as a function of surfactant concentrations. Compounds **1a,b** were synthesized as previously described [15]. Infrared spectra were determined on an FTIR/FIR spectrometer 400 Perkin-Elmer 1600 series. Elemental analyzes were carried out on a Perkin-Elmer 2400 CHNS Elemental Analyzer. Melting points

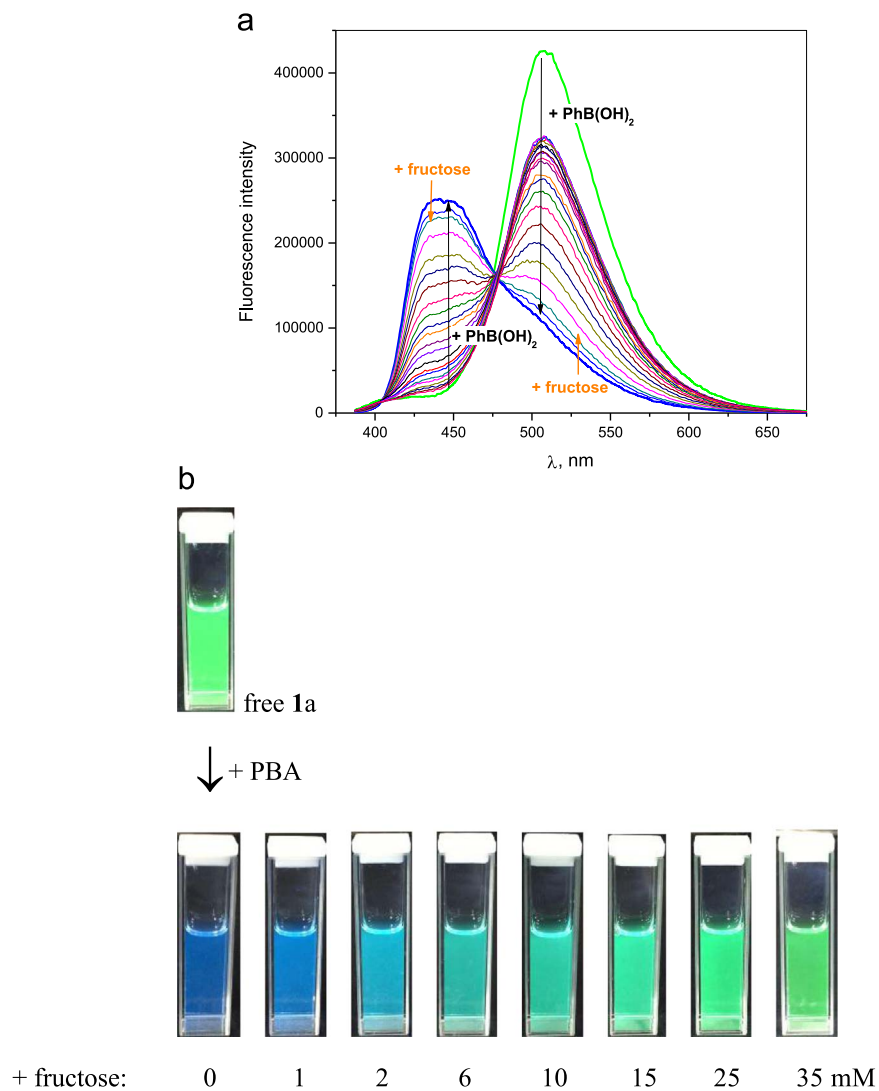


Fig. 4. (a) Fluorescence titration spectra of a mixture of 40 μ M **1a** with 0.5 mM PBA in 5 mM HTAB at pH 8 and variable concentration of fructose. Green line is the initial spectrum of free **1a** and blue line is the spectrum after addition of PBA. (b) Visual changes in fluorescence on additions of PBA and then fructose. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

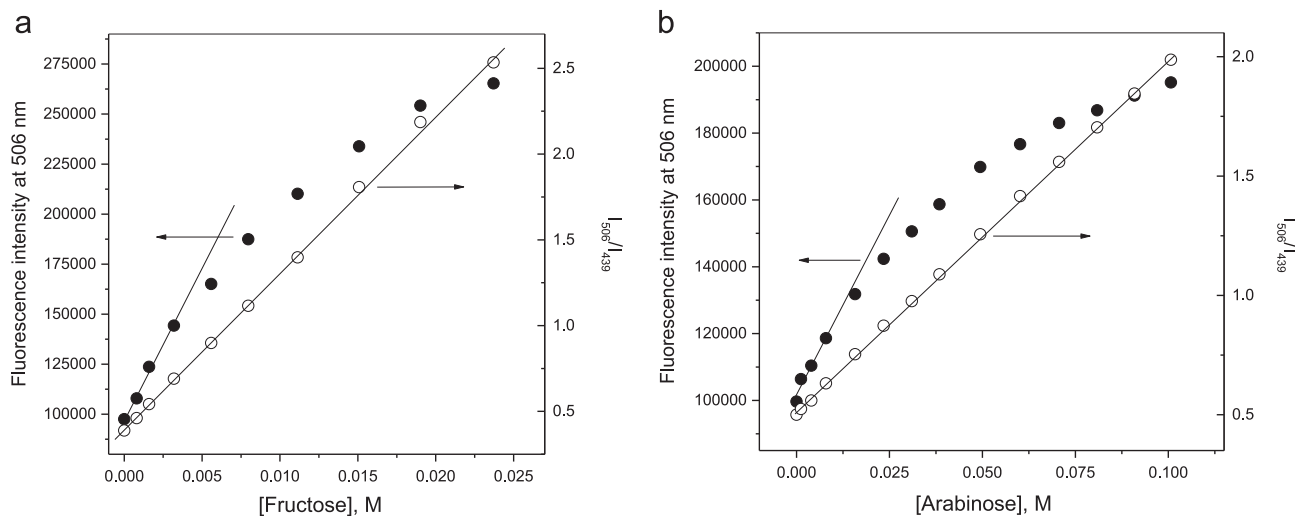


Fig. 5. Titration plots of PBA-**1a** complex at low fructose (a) and arabinose (b) concentrations as a fluorescence intensity (solid circles) or the ratio of intensities (open circles) at 512 and 439 nm (I_{512}/I_{439}) vs. the analyte concentration.

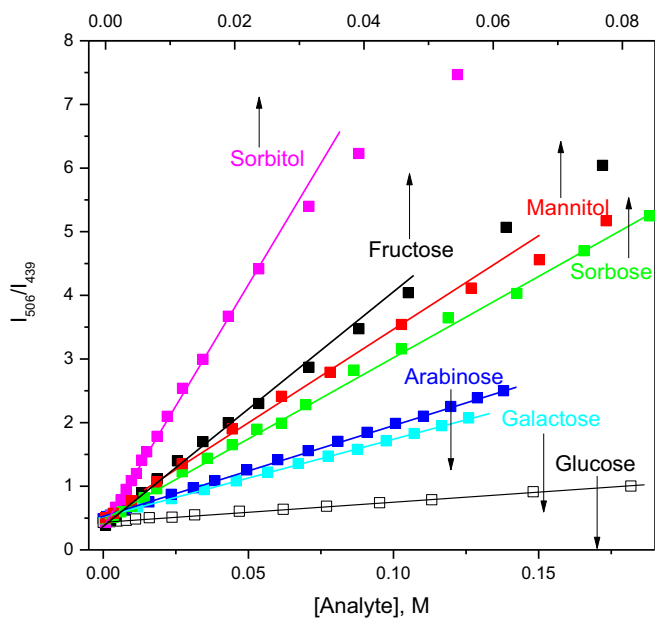


Fig. 6. Ratiometric (I_{506}/I_{439}) titration plots of PBA-1a complex by different polyols (for reaction conditions see the capture to Fig. 4).

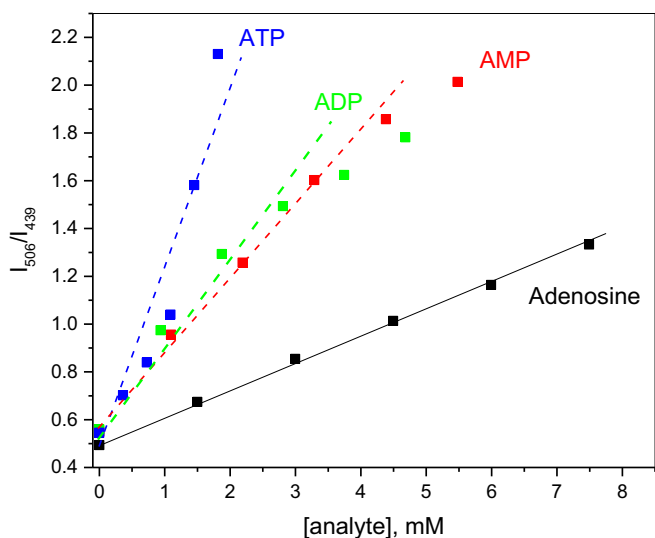


Fig. 7. Titration plots of 40 μ M **1a** with 0.5 mM phenylboronic acid in 5 mM HTAB at pH 8 for ATP, ADP, AMP and adenosine; ATP induced precipitation above 2 mM.

were measured on an Electrothermal 9200 apparatus. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at room temperature on a 300 MHz Varian unity spectrometer. Chemical shifts (ppm) are relative to $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. Mass spectrometry (MS-FAB+) was obtained by using a Thermo-Electron DFS. Fluorescence and UV-vis absorption spectra were measured on a FluoroMax spectrofluorometer from HORIBA Scientific and Thermo Scientific Evolution diode array UV-vis spectrophotometer, respectively, equipped with a thermostated cell compartment (recirculating water bath at 25 ± 0.1 °C).

2-Phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (1a). ^1H NMR (300 MHz; DMSO-d_6 ; Me_4Si): 11.64 (br. s, 1 H, NH), 8.17 (d, J 7.8 Hz, 1 H, H-5), 7.81 (d, J 7.1 Hz, 2 H, H-12), 7.74 (d, J 8.4 Hz, 1 H, H-8), 7.61–7.52 (m, 4 H, H-7, H-13, H-14), 7.28 (t, J 7.8 Hz, 1 H, H-6); ^{13}C NMR (75 MHz; DMSO-d_6 ; Me_4Si): 170.5, 138.5, 138.3, 132.8, 132.1, 131.1, 129.7, 129.7, 128.8, 124.9, 122.5, 122.3 and 118.9. IR (max/ cm^{-1}) 3197 (O–H stretching), 2922, 2850, 2808 (C–H stretching), 1645 (C–O stretching). Anal. calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ DMF: C 69.66, H 5.85, N 9.03;

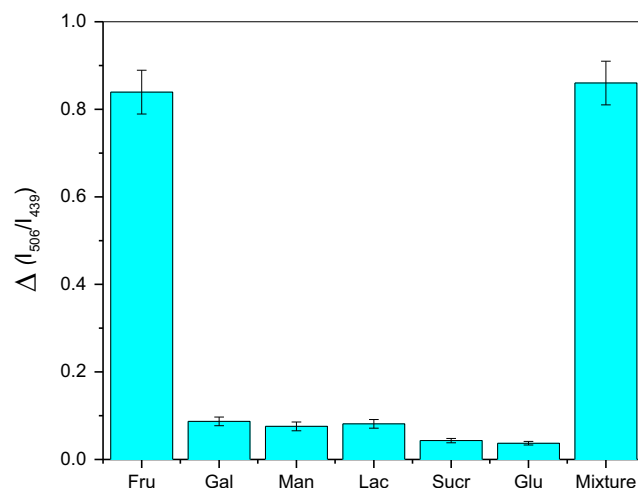


Fig. 8. Ratiometric signal expressed as an increase in the ratio of fluorescence intensities at 506 and 440 nm ($\Delta(I_{506}/I_{439})$) of PBA-1a complex in the presence of 10 mM of different saccharides (where Fru is fructose, Gal is galactose, Man is mannose, Lac is lactose, Sucr is sucrose and Glu is glucose). The last right column shows the signal observed in the mixture of 10 mM fructose and 10-fold excess of maltose, sucrose, glucose and starch. For reaction conditions see the capture to Fig. 4.

found: C 69.71, H 5.23, N 9.34. MS (FAB, m/z) 237 $[\text{M}]^+$; m.p. 276–279 °C.

1-Methyl-2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (1b). ^1H NMR (300 MHz; DMSO-d_6 ; Me_4Si): 8.15 (d, J 8.5 Hz, 2 H, ArH), 7.81 (d, J 7 Hz, 2 H, ArOH), 7.72 (d, J 8 Hz, 1 H, ArH), 7.57 (m, 4 H, ArH, ArOH), 7.27 (t, J 7 Hz, 1 H, ArOH), 3.55 (s, 3 H, N- CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz; DMSO-d_6 ; Me_4Si): 169.7, 139.4, 139.3, 137.3, 132.8, 131.7, 130.3, 129.5, 129.0, 125.6, 123.65, 122.6, 117.5 and 37.5. IR (max/ cm^{-1}) 3387 (O–H stretching), 2925, 2862, 2811 (C–H stretching), 1693 (C–O stretching). Anal. calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_2$: C 76.48, H 5.21, N 5.57; found: C 74.24, H 6.65, N 5.10. MS (FAB, m/z) 251 $[\text{M}]^+$; m.p. 273–276 °C.

2.2. Spectrophotometric and fluorometric titrations

All titration experiments were performed at 25 °C and ionic strength 0.05 M created by buffer. The majority of experiments were performed in micellar medium of 5 mM HTAB. The critical micelle concentration of HTAB under titration conditions (0.82 mM) was a little bit smaller than in pure water (0.89 mM) due to an ionic strength effect. An aliquot of 1 mM stock solution of **1** or **2** in acetonitrile was added to a 50 mM MOPS, MES or CHES aqueous buffered solution in appropriate pH intervals, allowing equilibration for 15 min before titrations. The final content of acetonitrile was always less than 0.5%. The program HypSpec version 1.1.33 was used to calculate all equilibrium constants.

3. Results and discussion

3.1. Interaction of 3-hydroxyquinolones with phenylboronic acid and the micellar effect

3-Hydroxyquinolones like structurally related 3-hydroxypyridones [16] and 3-hydroxyflavones [17] strongly bind metal ions, [13] but complexation with boric or boronic acids was never observed for compounds of all these types, lacking classical *cis*-diol structure required for formation of stable boronate esters. Indeed compounds **1a,b** do not interact with phenylboronic acid (PBA) in water or water-organic mixtures in pH range 7–10,

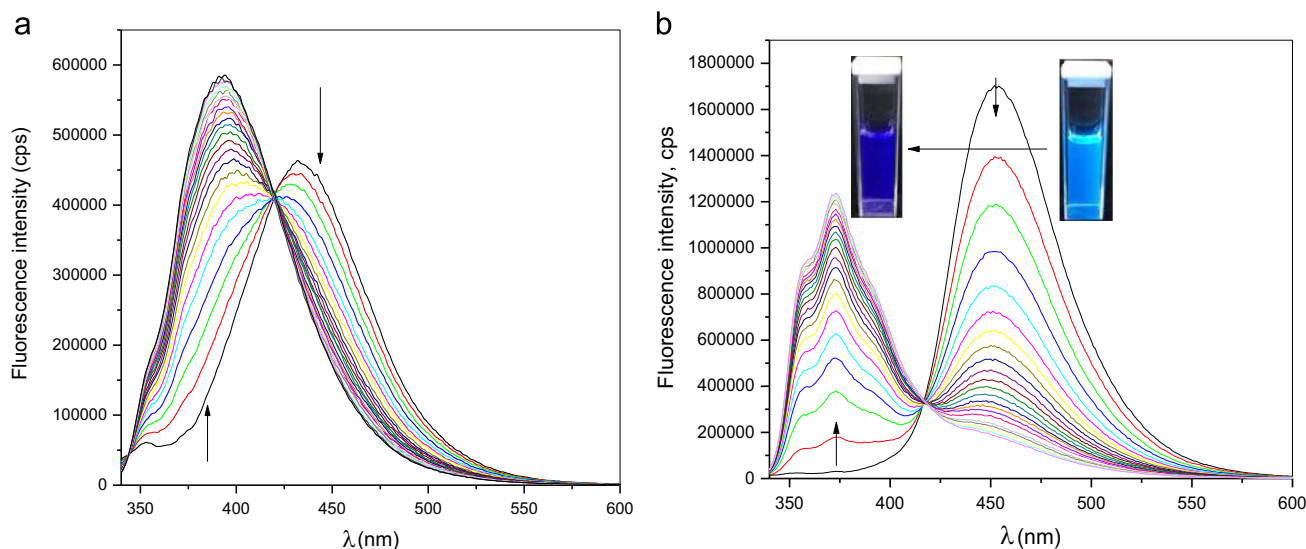
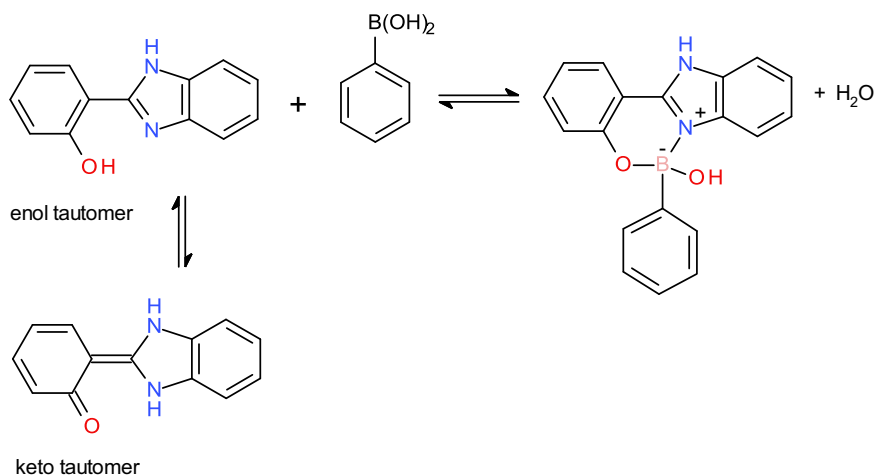


Fig. 9. Fluorescence spectra (excitation at 330 nm) of 2.8 μM **2** in water (a) and in 5 mM HTAB (b) at pH 7.4 and variable concentration of PBA (0–0.6 mM). Arrows show directions of the spectral changes on increase in PBA concentration.



Scheme 3. Complex formation with PBA and tautomeric equilibria of **2**.

however in the presence of cationic surfactant hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) **1a** forms a remarkably stable complex with PBA with observed stability constant $K_{\text{obs}} = 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ at pH 8.0 (for comparison $K_{\text{obs}} = 310 \text{ M}^{-1}$ and $2.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ for such strong polyol ligands as fructose and catechol respectively at the same pH) [18]. The course of spectrophotometric and fluorescence titrations of **1a** by PBA is shown in Fig. 1a,b. In accordance with reported pK_{a} values of **1a** in micellar HTAB solution ($\text{pK}_{\text{a}1} = 9.1$ (OH) and $\text{pK}_{\text{a}2} = 10.4$ (NH)) [13] at pH 8.0 the predominant form of the compound is the neutral species. The interaction with PBA proceeds as a simple 1:1 reversible reaction maintaining several isosbestic points in the UV–vis titration and the fitting of the titration profile with HypSpec program gives mentioned above stability constant. In the fluorescence titration, the maximum at 506 nm belonging to emission from the tautomeric form with proton transferred from 3-OH group to 4-carbonyl group [12] disappears and a new maximum at 440 nm close to maximum at 410 nm belonging to “normal” structure appears. Such behavior agrees with binding of PBA through

esterification of the 3-OH group eliminating the possibility of tautomeric equilibrium.

At the same time **1b** does not interact with phenylboronic acid even in the presence of HTAB. Also there is no interaction under any conditions with flavonol **3** containing O instead of NH group. This indicates that the presence of NH group is essential for the complex formation. We believe that the key factor is the ability of **1a** to generate a tautomeric form with a *cis*-diol structure via proton transfer from NH group to 4-carbonyl group, which subsequently binds the boronic acid in a usual manner (Scheme 1).

The deprotonation occurring during the reaction in the Scheme 1 agrees also with the trend in K_{obs} as a function of pH ($K_{\text{obs}} = 3.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ at pH 7 and $7.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ at pH 10, both smaller than at intermediate pH 8), with expected for this type of equilibrium optimum at pH between pK_{a} values of **1a** and PBA [19]. The $\text{pK}_{\text{a}} = 9.00 \pm 0.01$ for PBA in 5 mM HTAB was determined by spectrophotometric titration (see Fig. S1 in Supplementary Material). Titration of **1a** with stronger 4-chlorophenylboronic and 4-nitrophenylboronic acids showed expectedly higher binding constants 3.7×10^4 and $2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ at pH 8, however the

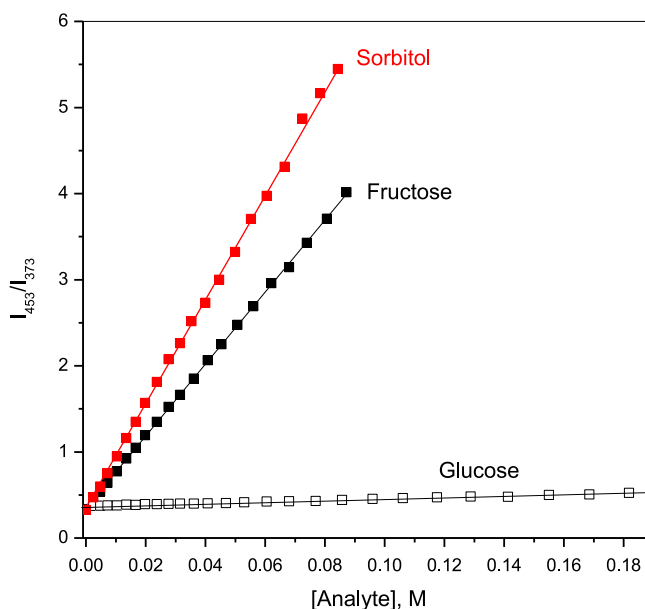


Fig. 10. Ratiometric (I_{453}/I_{373}) titration plots of PBA-2 complex by different polyols (2.8 μM **2**, 0.2 mM PBA, 5 mM HTAB, pH 7.4).

nitrophenylboronic acid induced only the quenching of **1a** fluorescence at both emission maxima (see Fig. S2 in Supplementary Material).

A strong promotional effect of HTAB on the reaction requires a very efficient micellar stabilization of the reaction product. Neither anionic (SDS) no neutral (Tween 20, Brij and Triton X-100) surfactants promote interaction of PBA with **1a**. Testing HTAX surfactants with different counterions $X = \text{Br}, \text{Cl}, \text{HSO}_4^-$ showed the independence of the micellar effect on the type of counterion at 5 mM surfactant concentration. We were able to estimate only an upper limit of $K_{\text{obs}} < 10 \text{ M}^{-1}$ in the absence of HTAB and therefore the micellar effect certainly surpasses the factor of 10^3 which is in the extreme upper zone of known micellar effects on reaction rates and equilibria [20].

To get a deeper insight into this large effect the equilibrium constants for the reaction in Scheme 1 were determined at variable HTAB concentration, Fig. 2. The point at $[\text{HTAB}] = 0$ is an estimate of the upper limit of $K_{\text{obs}} = 10 \text{ M}^{-1}$.

The theoretical profile has the form of Eq. (1) where K_0 is the equilibrium constant in water, K_A , K_B and K_P are the binding constants of reactants A and B, and the product P to the micelles and S is the surfactant [21].

$$K_{\text{obs}} = K_0(1 + K_P[S]) / \{(1 + K_A[S])(1 + K_B[S])\} \quad (1)$$

The Eq. (1) predicts that K_{obs} reaches the maximum at surfactant concentration $[S] = 1/(K_A K_B)^{1/2}$. Indeed a maximum around 5 mM HTAB is observed. The fitting of the results to the Eq. (1) in principle allows one to determine the binding constants of all reaction components to the micelles; however the fitting with three adjustable parameters is rather unreliable. For this reason the binding of **1a** to HTAB micelles was determined separately by spectroscopic titration of **1a** by HTAB. Figs. S3 and S4 (Supplementary material) show the fluorescence and UV-vis spectra of **1a** at pH 8 at increased concentrations of HTAB and analysis of these results allowed us to estimate the binding constant $K_A = 400 \text{ M}^{-1}$ for **1a**.

With this value of K_A used as a fixed parameter fitting of the results in Fig. 2 to the equation (1) gives $K_B = 140 \text{ M}^{-1}$ for PBA and $K_P = 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for the reaction product. Theoretically predicted optimum HTAB concentration as $1/(K_A K_B)^{1/2} = 4.2 \text{ mM}$ is very close to the experimentally observed value. The K_B value is within

the range of binding constants of neutral benzene derivatives to HTAB micelles, e.g. the binding constant of phenol to HTAB is 263 M^{-1} , [22] but K_P is unprecedentedly large. Comparing it with K_A we see that addition of a phenylboronic group to **1a** increases its affinity to HTAB micelles by a factor of ca. 3000. Possible contributions to stabilization of PBA-**1a** complex are hydrophobic and cation- π interactions with aromatic groups as well as electrostatic interaction of the negative charge of the boronate ester with positively charged micelle. The last contribution together with increased cation- π interactions between tetraalkylammonium head groups of HTAB and aromatic fragments of negatively charged PBA-**1a** complex [23] should be the most important since micelles of non-ionic surfactants have no effect on the reaction equilibrium.

3.2. The fluorescence behavior of **1a** and its PBA complex

The fluorescence behavior of **1a** and its PBA complex can be rationalized in terms of Scheme 2. The high energy emission maximum at 410 nm belongs to most stable in ground state “normal” form **A**. In the excited state the 3-OH group becomes more acidic and this favors proton transfer to 4-carbonyl oxygen (ESIPT) affording tautomeric form **B** gaining the resonance stabilization from *para*-NH group and emitting at 506 nm. The complexation with PBA eliminates the possibility of tautomeric equilibrium and the respective complex **C** emits at 439 nm.

To evaluate possible structural differences between free and bound to PBA **1a** the complex structure was simulated at PBE0/G-31+G(d,p) level of theory, Fig. 3. The major difference is the complete planarity of **1a** in the complex in contrast to rotated by 55° phenyl group in free **1a** [24]. This planarity allows a stronger π -conjugation in the bound molecule, which is favorable for more intense fluorescence.

The type of spectral changes in the fluorescence titration is appropriate for a ratiometric method. There is a point at 477 nm where the fluorescence intensity remains constant together with a three-fold decrease in intensity at 506 nm and a ten-fold increase in intensity at 439 nm. Noteworthy, deprotonation of **1a**, which also eliminates the possibility of tautomerism, is accompanied by similar disappearance of the emission band at 512 nm, but no new band at shorter wavelength is observed [13].

3.3. Ratiometric titrations of polyols

Fig. 4a shows the results of titration of the mixture of **1a** and PBA by fructose. The spectral changes are the reverse of those observed in direct titration (Fig. 1), although the intensity of the signal at 506 nm does not recuperate completely apparently because of photobleaching of **1a** during the titration experiment. Similar reverse behavior was observed also in UV–vis titration. Fig. 4b illustrates visual changes in fluorescence on additions of PBA to **1a** and subsequent titration with fructose. Evidently the color change is easily detectable allowing a rough estimate of fructose concentration just by “naked eye”.

Fig. 5a shows the titration profile from which it is evident that the sensor allows one quantitative determination of fructose with a detection limit less than 1 mM by increase in the fluorescence intensity at 512 nm, but with a very short linear dynamic range from 0 to 2.5 mM (solid circles). Open circles show the ratiometric response defined as the ratio of fluorescence intensities at 506 and 349 nm (I_{506}/I_{349}), which demonstrates remarkable improvement in analytical characteristics of the system: the linear range extends now up to 25 mM and the signal I_{506}/I_{349} grows by a factor of 5 (from 0.4 to 2.5) at the end of the linear range while the absolute fluorescence intensity at 506 nm grows only by a factor of 2.5 at concentrations close to saturation. Similar effects were observed for other polyols as illustrated for arabinose in Fig. 5b.

Fig. 6 shows the results of ratiometric titrations of PBA-**1a** by a series of polyols. All calibration plots show unusually wide linear dynamic ranges with a strong optical response: the I_{512}/I_{439} values increase up to 10 times, while the direct fluorescence signal never changes by a factor more than 1.5 in a linear range. Limits of detection defined as $3\sigma/m$ vary from 1 mM for glucose to 0.04 mM for sorbitol.

The selectivity of determination correlates very well with known order of affinities of these polyols to PBA [18]. The presence of positively charged micellar aggregates of HTAB may increase the affinity to negatively charged analytes. For this reason we tested interaction of the sensor with a series of adenosine nucleotides in comparison with neutral adenosine. Fig. 7 shows the titration results from which the influence of the analyte negative charge is evident.

Among sugars the PBA-**1a** system gives the highest signal for fructose and it can be applied for fructose determination e.g. in foods. Fig. 8 illustrates the selectivity of determination of 10 mM fructose in comparison with other sugars taken at the same concentration. The last right column shows the effect of typical interfering compounds maltose, sucrose, glucose and starch, added together each at 10-fold excess to fructose. Evidently the observed signal is in limits of error close to that of fructose only.

3.4. Studies with 2-(2'-hydroxyphenyl)-1H-benzimidazole

Independently of studies with compounds **1a,b** we tested the interaction of PBA with another ESIPT dye **2**. Detailed results for PBA-**2** interaction will be reported elsewhere together with relevant data on other N,O-donor ligands. Here we discuss only the analytical aspect of application of PBA-**2** complex for ratiometric detection of polyols.

The results of fluorometric titration of **2** by BPA in water are shown in Fig. 9a. The fitting of these results gives the association constant $K_{\text{obs}} = 1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ at pH 7.4. Titrations in the range of pH from 6 to 8 where both components are predominantly in their neutral forms give K_{obs} values independent of pH which means that interaction of **2** with PBA is not accompanied by deprotonation as in the case of **1a** and proceeds with formation of a neutral complex as shown in Scheme 3.

The emission spectrum in the absence of PBA shows an intense maximum at 432 nm of keto tautomer resulting from ESIPT and a weak band of enol tautomer predominating in the ground state at 353 nm [26]. Complexation with PBA eliminates the possibility of tautomeric equilibrium and one observes a single maximum at 393 nm. Titration in the micellar solution of HTAB, Fig. 9b, demonstrates somewhat stronger binding with $K_{\text{obs}} = 1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ at pH 7.4 and more importantly a significantly red shifted to 453 nm and strongly enhanced emission of the keto tautomer of **2**, but blue shifted to 373 nm emission of the PBA complex. This makes the separation of maxima of free and bound dye much bigger which is favorable for the ratiometric determination. Much smaller micellar effect in the reaction with **2** as compared to that in the reaction with **1a** agrees with formation of a neutral complex in a former case, which does not gain electrostatic stabilization from the positive charge of a cationic micelle.

The results of ratiometric titrations of PBA-**2** complex by several polyols are shown in Fig. 10. Like in case of **1a** one observes unusually wide linear range of determination of polyols, but smaller slopes and therefore a lower sensitivity than with micellar **1a**.

4. Conclusions

The unusually strong micellar effect on the association of PBA with 3-hydroxyquinolone possessing fluorescence properties (ESIPT) suitable for ratiometric methodology makes possible design of a highly efficient new polyol optical sensor. In this context it should be noted that an improvement of classical boronic acid – Alizarin Red S system by cationic surfactants was recently reported, although the micellar effect was not analyzed quantitatively [27]. The important features of the new sensor are unusually wide linear dynamic range and large relative change of the ratiometric signal in the presence of polyol analytes. This strong extension of the linear dynamic range in ratiometric method is very much useful improvement, which seems to be overlooked until now.

Acknowledgments

Karla Elisa Trejo-Huizar thanks CONACYT for the doctoral fellowship; Arturo Jiménez-Sánchez thanks DGAPA-UNAM for the postdoctoral fellowship.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2016.07.007>.

References

- [1] (a) T.D. James, M.D. Phillips, S. Shinkai, *Boronic Acids in Saccharide Recognition*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2006; (b) X. Yang, Y. Cheng, S. Jin, B. Wang, in: V.M. Mirsky, A.K. Yatsimirsky (Eds.), *Artificial Receptors for Chemical Sensors*, Wiley-VCH, Weinheim, 2011, pp. 169–190; (c) J. Yan, H. Fang, B. Wang, *Med. Res. Rev.* 25 (2005) 490; (d) R. Nishiyabu, Y. Kubo, T.D. James, J.S. Fossey, *Chem. Commun.* 47 (2011) 1106; (e) J.S. Hansen, J.B. Christensen, J.F. Petersen, T. Hoeg-Jensen, J.C. Norrild, *Sens. Actuators B-Chem* 161 (2012) 45; (f) W. Wang, X. Gao, B. Wang, *Curr. Org. Chem.* 6 (2002) 1285.
- [2] (a) J.S. Hansen, J.B. Christensen, *Biosensors* 3 (2013) 400; (b) Q. Wu, L. Wang, H. Yu, J. Wang, Z. Chen, *Chem. Rev.* 111 (2011) 7855;

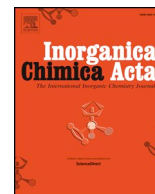
- (c) X. Wu, Z. Li, X.-X. Chen, J.S. Fossey, T.D. James, Y.-B. Jiang, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 8032;
- (d) H.S. Mader, O.S. Wolfbeis, *Microchim. Acta* 162 (2008) 1;
- (e) J.C. Pickupa, F. Hussaina, N.D. Evansa, O.J. Rolinskib, D.J.S. Birch, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2555;
- (f) M.-S. Steiner, A. Duerkop, O.S. Wolfbeis, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 4805;
- (g) X. Sun, B. Zhu, D.-K. Ji, Q. Chen, X.-P. He, G.-R. Chen, T.D. James, *Appl. Mater. Interfaces* 6 (2014) 10078;
- (h) X.-P. He, Y. Zang, T.D. James, J. Li, G.-R. Chen, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 4239;
- (i) X.-P. He, H. Tian, *Small* 12 (2016) 144.
- [3] G. Gryniewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440.
- [4] M.M. Henary, C.J. Fahrni, *J. Phys. Chem. A* 106 (2002) 5210.
- [5] M.H. Lee, J.S. Kim, J.L. Sessler, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 4185.
- [6] H. Cao, D.I. Diaz, N. DiCesare, J.R. Lakowicz, M.D. Heagy, *Org. Lett.* 4 (2002) 1503.
- [7] Y. Sanguansap, V. Ruangpornvisuti, T. Tuntulani, V. Promarak, B. Tomapatanaget, *R.S.C. Adv.* 5 (2015) 78468.
- [8] R. Badugu, J.R. Lakowicz, C.D. Geddes, *Talanta* 66 (2005) 569.
- [9] Y. Hu, X. Jiang, L. Zhang, J. Fan, W. Wu, *Biosens. Bioelectron.* 48 (2013) 94.
- [10] Y.-J. Huang, W.-J. Ouyang, X. Wu, Z. Li, J.S. Fossey, T.D. James, Y.-B. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 1700.
- [11] L.-L. Wang, J. Qiao, H.-H. Liu, J. Hao, Qi, X.-P. Zhou, D. Li, Z.-X. Nie, L.-Q. Mao, *Anal. Chem.* 86 (2014) 9758.
- [12] D.A. Yushchenko, V.V. Shvadchak, A.S. Klymchenko, G. Duportail, Y. Mely, V. G. Pivovarenko, *New J. Chem.* 30 (2006) 774.
- [13] A. Jiménez-Sánchez, A.K. Yatsimirsky, *RSC Adv.* 5 (2015) 62116.
- [14] F.A.S. Chipem, S.K. Behera, G. Krishnamoorthy, *Sens. Actuators B* 191 (2014) 727.
- [15] P. Hradil, J. Hlaváč, K. Lemr, *J. Heterocycl. Chem.* 36 (1999) 141.
- [16] (a) W.R. Harris, K.N. Raymond, F.L. Weitl, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 2667–2675;
- (b) V.M. Nurchi, G. Crisponi, T. Pivetta, M. Donatoni, M. Remelli, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 684.
- [17] (a) M.D. Engelmann, R. Hutcheson, I.F. Cheng, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2953;
- (b) M.M. Kasprzak, A. Erxleben, J. Ochocki *RSC Adv.* 5 (2015) 45853.
- [18] G. Springsteen, S. Deeter, B. Wang, *Tetrahedron* 58 (2002) 5291.
- [19] M.A. Martinez-Aguirre, R. Villamil-Ramos, J.A. Guerrero-Alvarez, A. K. Yatsimirsky, *J. Org. Chem.* 78 (2013) 4674.
- [20] (a) K. Martinek, A.K. Yatsimirski, A.V. Levashov, I.V. Berezin, *Micellization, Solubilization, and Microemulsions*, Plenum Press, N.Y., 1977, p. 489;
- (b) I.V. Berezin, K. Martinek, A.K. Yatsimirski, *Russ. Chem. Rev.* 42 (1973) 787;
- (c) J.H. Fendler, E.J. Fendler, *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic Press, New York, 1975;
- (d) C.A. Bunton, G. Savelli, *Adv. Phys. Org. Chem.* 22 (1987) 213.
- [21] (a) N.T. Yatsimirskaya, I.N. Sosnovskaya, A.K. Yatsimirsky, *Anal. Biochem.* 229 (1995) 249;
- (b) A.K. Yatsimirsky, N.T. Yatsimirskaya, S.B. Kashina, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2232.
- [22] C. Bunton, L. Sepulveda, *J. Phys. Chem.* 83 (1979) 680.
- [23] E.A. Meyer, R.K. Castellano, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 1210.
- [24] (a) R. Buchtík, Z. Trávníček, J. Vančo, R. Herchel, Z. Dvořák, *Dalton Trans.* 40 (2011) 9404–9412;
- (b) I. Ganszky, J. Kaizer, M. Czaun, G. Speier, L. Párkányi, *Z. Krist. NCS* 222 (2007) 259–260.
- [25] (a) R. Buchtík, Z. Trávníček, J. Vančo, R. Herchel, Z. Dvořák, *Dalton Trans.* 40 (2011) 9404–9412;
- (b) I. Ganszky, J. Kaizer, M. Czaun, G. Speier, L. Párkányi, *Z. Krist. NCS* 222 (2007) 259–260.
- [26] M. Shaikh, S.D. Choudhury, J. Mohanty, A.C. Bhasikuttan, W.M. Nau, H. Pal, *Chem. Eur. J.* 15 (2009) 12362.
- [27] (a) K. Ngamdee, T. Noipa, S. Martwiset, T. Tuntulani, W. Ngeontae, *Sens. Actuators B Chem.* 160 (2011) 129;
- (b) K. Ngamdee, S. Martwiset, T. Tuntulani, W. Ngeontae, *Sens. Actuators B Chem.* 173 (2012) 682.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Inorganica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ica

Research paper

Composition, stability and fluorescence properties of metal complexes of an aza-flavonol analog 1-methyl-2-phenyl-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone in aqueous solution

Karla Elisa Trejo-Huizar^a, Arturo Jiménez-Sánchez^b, Anatoly K. Yatsimirsky^{a,*}

^a Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico

^b Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

3-Hydroxy-4-quinolone

Metal complex

ESIPT

Fluorescence

ABSTRACT

Aza-flavonols are compounds containing the 3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone moiety, a unique scaffold with applications expanding from fluorescent probes and bioimaging to potential metal-related pharmaceutical drugs. Compositions and stability constants of metal complexes of an aza-flavonol 1-methyl-2-phenyl-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone (LH) in aqueous micellar medium of hexadecyltrimethylammonium bromide were established by fluorescence and spectrophotometric titrations of LH in the presence of metal ions of different type at variable pH. Strong binding with quenching of ligand fluorescence was observed for Cu²⁺, Fe^{2+/3+} and Pb²⁺ cations. The complexation with Zn²⁺ induced strong fluorescence enhancement in ZnL⁺ complex and smaller enhancement in ZnL₂ complex. Al³⁺, Ga³⁺ and Me₂Sn²⁺ cations induced strong fluorescence enhancement in 1:1 ML complexes, but quenching in ML₂ complexes. Together with the relevant literature data these results indicate that the quenching effect in 1:2 complexes along with strong fluorescence enhancement in respective 1:1 complexes is a general phenomenon for 3-hydroxypyranone and 3-hydroxypyridinone ligands. The quantum mechanical Natural Transition Orbital analysis of ground and excited states of LH, ALL²⁺ and ALL₂⁺ species reveals that the fluorescence of ALL₂⁺ complex is quenched by an internal electron transfer process, which is absent in the 1:1 ALL²⁺ complex. The results emphasize strong dependence of the coordination induced fluorescence changes on the complex composition.

1. Introduction

Complexation of flavonoids with metal ions has been studied extensively as a way of modification of their biological activity and for analytical purposes; in particular, the complexation of flavonol (1) with Al(III), Zn(II) and Fe(III) ions was studied in detail [1–3]. Typically binding of metal ions by flavonol involves chelation with 3-hydroxy and 4-carbonyl groups as illustrated in the structure 2. Recently we demonstrated [4] that aza-analogs of flavonol 2-phenyl-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolones (3, 4) can serve as more powerful ligands due to a significantly increased negative charge on the 4-carbonyl group as follows also from calculated atomic charges –0.498 and –0.601 on the carbonyl oxygen of 1 and 4 respectively (Mulliken atomic charges at a

CAM-B3LYP/6-311G(d) level of theory using Gaussian09 code). Importantly, 3-hydroxyquinolones conserve ESIPT properties of flavonol [5] useful for sensing applications [6]. Recently the phenylboronic acid complex of 3 was used for development of a ratiometric method of quantitative determination of sugars [7] and the dibutyltin(IV) complex of a 2-naphthyl-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone was successfully employed as a dual-emissive fluorescent probe for monitoring of nuclear local microviscosity [8]. Besides sensing applications the coordination properties of 3-hydroxy-4-quinolones are of interest because they are functional fragments of some important biological compounds such as the quorum sensing molecules, known to bind intracellular Fe³⁺ [9,10], and their metal complexes are considered as potentially metal-related pharmaceutical drugs [11].

* Corresponding author.

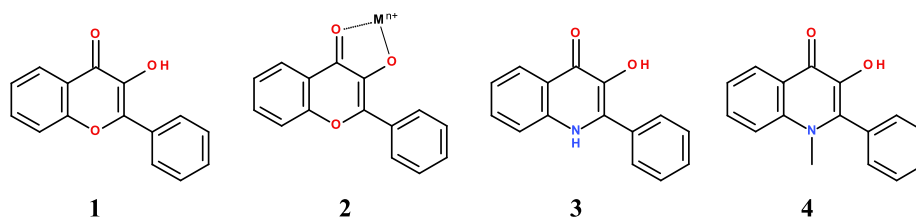
E-mail addresses: arturo.jimenez@iquimica.unam.mx (A. Jiménez-Sánchez), iatsimirski46@comunidad.unam.mx (A.K. Yatsimirsky).

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119471>

Received 13 December 2019; Received in revised form 25 January 2020; Accepted 25 January 2020

Available online 28 January 2020

0020-1693/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



Preliminary studies of metal ion complexation showed that **3** sometimes underwent deprotonation of the NH group on metal binding, but the *N*-methylated derivative **4** was free of this complication [4]. In this paper we report a detailed study of complexation of **4** with metal ions of different types in an aqueous medium aimed to explore similarity in coordination properties of 3-hydroxyquinolones and flavonol type ligands as well as the character of complexation-induced changes in fluorescence of this ligand, understanding of which is important for progressing sensor applications of 3-hydroxyquinolones.

Low solubility of **4** in water represents a serious obstacle for experimental measurements. Testing different approaches to improve its solubility we found that using the cationic surfactant hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) above its critical micelle concentration is superior to using aqueous-organic mixtures. Micellar solutions provided better stability and they are known to have no effect on pH reading of the glass electrode [12]. In addition, free metal ions should not penetrate cationic micelles and therefore one can safely use hydrolysis constants of metal ions determined in water for analysis of pH-profiles of observed stability constants.

In contrast to previous studies with flavonol type ligands performed in non-aqueous or organic-rich mixed aqueous media with uncontrolled pH values and unknown speciation of metal complexes, we were able in this study to perform fluorometric and spectrophotometric titrations in a wide range of pH and to assign the fluorescence properties to individual complexes. This allowed us to discover that with many metal ions the complexation induced changes in the fluorescence of free ligand were strongly dependent on the complex composition producing the fluorescence enhancement in 1:1, but quenching in 1:2 metal-to-ligand complexes. Such unexpected behavior occasionally was reported previously (see Discussion section below), and the results of present study demonstrate that this is a general phenomenon. A quantum mechanical interpretation of this effect is provided.

2. Experimental section

2.1. Materials and physical measurements

Commercially available starting materials, components of buffer solutions (CHES, MOPS, MES), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), inorganic salts used in complexation studies were used as supplied. Compound **4** was synthesized as previously described [4]; ^1H and ^{13}C NMR spectra of the prepared compound are shown in Supplementary Material, Fig. 1S. Fluorescence and UV-vis absorption spectra were measured on a FluoroMax spectrofluorometer from HORIBA Scientific and Thermo Scientific Evolution diode array UV-vis spectrophotometer, respectively, equipped with a thermostated cell compartment (recirculating water bath at 25.0 ± 0.1 °C).

2.2. Spectrophotometric and fluorometric titrations

All titration experiments were performed at 25 °C and ionic strength 0.05 M created by a buffer. An aliquot of a stock solution of **4** in acetonitrile was added to a 50 mM MOPS, MES or CHES aqueous solution in appropriate pH intervals, allowing the equilibration for 15 min before titrations. The final content of acetonitrile was always less than 0.5% and the concentration of **4** was in the range of 0.01–0.1 mM. Two

types of titrations were performed: titration of a fixed concentration of **4** at fixed pH with variable concentration of a metal salt or titration of a mixture of fixed amounts of a metal salt and the ligand **4** at variable pH. The program HypSpec version 1.1.33 Protonic Software was used to calculate all equilibrium constants.

2.3. Quantum chemical calculations

Quantum chemical calculations were performed in Gaussian09 [13] by using density functional theory (DFT). All the structure optimizations were corroborated by a frequency analysis finding no imaginary points at a B3LYP/G-31 + G(d,p)/IEF-PCM (Water) level of theory for the ligands and while the LANL2DZ pseudopotential were used for Al (III) ion complexes to account for effective core potential effects. The Cartesian coordinates for calculated structures are collected in Table 1S (Supplementary Material) Ground and excited-state geometries and natural transition orbitals were obtained by DFT to analyze the molecular orbital distributions of the different absorption and emission bands obtained with linear response.

3. Results and discussion

3.1. Interaction of **4** with surfactant micelles

The emission spectrum of **4** in water has two maxima of approximately similar intensity at 421 and 501 nm (Fig. 1a), which belong to neutral and zwitterionic tautomeric forms (A and B in Scheme 1) respectively [5]. In the presence of surfactant the emission of the neutral form is strongly reduced and emission of the zwitterionic form increases with red-shifting of the maximum to 523 nm (Fig. 1a). Similar emission spectrum of **4** is observed in acetonitrile [5]. One may conclude therefore that **4** is incorporated into the hydrophobic interior of HTAB micelles.

The micellar medium affects also the absorption spectrum of **4**, Fig. 1b. The absorbance vs. HTAB concentration profile “saturates” at concentrations above 5 mM and the fitting of this profile to a 1:1 binding isotherm (see inset in Fig. 1b) allows one to calculate the apparent binding constant $(1.2 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ for complexation of **4** with HTAB. Spectral changes are observed already below critical micelle concentration of HTAB (0.9 mM) which means that hydrophobic molecules of **4** induce micelle formation at lower concentrations of surfactant. All further experiments were performed at 5 mM HTAB where ca. 90% of **4** are incorporated in micelles. At these conditions pK_a of **4** is 9.8 [4].

3.2. Interactions of **4** with metal ions

Testing interactions of **4** with metal ions in the pH range 5–7 showed insignificant effects of Mg(II), Ca(II), Mn(II) at concentrations up to 1 mM on absorption and fluorescence of **4**. Cations of Co(II), Ni(II) and Eu(III) quenched fluorescence by ca. 90% at saturation with observed stability constants of 1:1 of complexes (β_{11}^{obs}) given in Table 1 (entries 1–3).

Complete quenching and very strong binding were observed with Cu(II) and Fe(II/III) cations, Fig. 2. Shapes of titration plots indicate formation of ML_2 and ML_3 complexes as predominant species with Cu

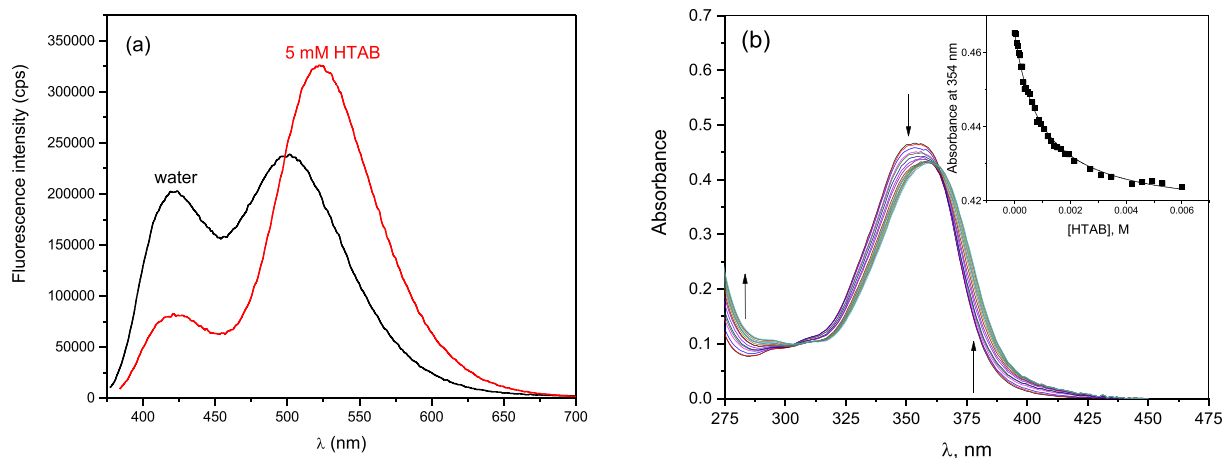


Fig. 1. (a) Emission spectra of 40 μM **4** in water containing 5% vol. MeCN (black line) and in the presence of 5 mM HTAB (red line); excitation wavelength 340 nm. (b) Effect of HTAB on the absorption spectrum of **4** at pH 5; inset shows the absorbance vs. HTAB concentration profile at 354 nm. Arrows show the directions of spectral changes on increase in the surfactant concentration. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

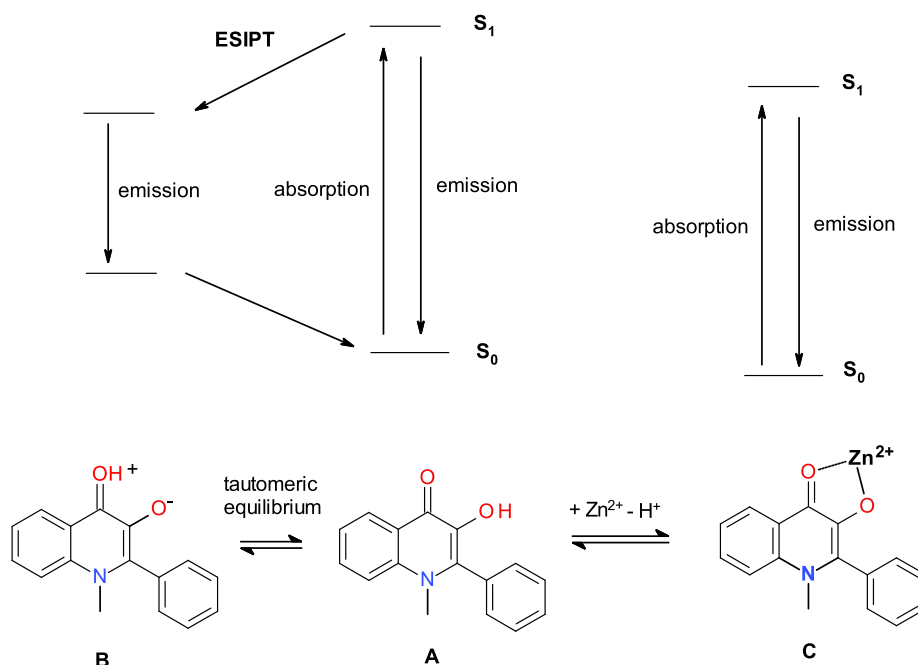
(II) and Fe(II) respectively (see insets in Fig. 2a,b). Fitting of results for Cu(II) with HypSpec program showed that in fact both 1:1 and 1:2 complexes were formed with stability constants given in Table 1 and both complexes were non-fluorescent, but binding to Fe(II) was too strong for reliable fitting of results at fixed pH and it was analyzed by measurements at variable pH (see below). Surprisingly titrations with Fe(II) and Fe(III) cations produced identical results. Similar behavior was reported for interaction of Iron cations with deferiprone [16] and desferrioxamine B [17] and was attributed to fast oxidation of Fe(II) to Fe(III) by the ligand. We did not observe however any consumption of the ligand in experiments with Fe(II), which means that another oxidant, apparently the atmospheric oxygen should be involved.

Fig. 2b shows results of spectrophotometric pH-titration of a mixture of Iron cations (identical results were obtained with both Fe(II) and Fe(III) salts) and **4** in the molar ratio 1:3. The absorption bands in the range 450–700 nm belong to Fe(III) complexes and fitting of these results with HypSpec gives stability constants $\log \beta_{110} = 11.65 \pm 0.01$, $\log \beta_{120} = 22.27 \pm 0.01$ and $\log \beta_{130} = 31.35 \pm 0.02$. Fig. 2S

(Supplementary Material) shows calculated absorption spectra of individual complexes and the species distribution diagram for total concentrations employed in the titration experiment in Fig. 2b. It follows from these results that $\text{pFe} = 15.14$ [18] for **4**. This value is close to $\text{pFe} = 16.6$ reported for 2-methyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (a quorum sensing signal molecule) in 50% DMSO [9], confirming strong Iron chelating ability of 3-hydroxyquinolones, although both values are significantly lower than $\text{pFe} = 20.67$ for 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridinone [19], a medically used iron chelating drug Deferiprone.

Also tight binding with nearly complete fluorescence quenching was observed for Pb(II), Fig. 3. Fitting of the results to HypSpec shows formation of both 1:1 and 1:2 complexes with stability constants given in Table 1. Interestingly, although the 1:1 complex is still weakly fluorescent with emission maximum at 476 nm, the 1:2 complex does not have fluorescence at all.

In contrast to Pb(II), coordination of Zn(II) induces strong fluorescence enhancement of **4** with an isoemissive point at 424 nm Fig. 4. At the same time the type of complexation-induced changes in UV-Vis



Scheme 1. ESIP process for **4** and the effect of metal coordination.

Table 1
Stability constants of metal complexes of **4** in 5 mM aqueous HTAB.

	Cation	$\log \beta_{11}^{\text{obs}}$	$\log \beta_{12}^{\text{obs}}$	pH	$I_{\text{ML}}/I_{\text{L}}^{\text{a)}$	$I_{\text{ML}_2}/I_{\text{L}}^{\text{a)}$	$\log K_1$	$\log K_1^{\text{b)}$ Maltol	$\log K_1^{\text{b)}$ Hdpp
1	Co ²⁺	3.25 ± 0.04		7	0.23		6.05	5.1	6.6
2	Ni ²⁺	3.49 ± 0.03		7	0.11		6.29	5.4	6.9
3	Eu ³⁺	4.32 ± 0.05		7	0.06				
4	Cu ²⁺	6.39 ± 0.03	12.05 ± 0.03	7	0	0	9.19	7.7	10.6
5	Zn ²⁺	2.20 ± 0.06		6	18				
6	Zn ²⁺	3.72 ± 0.02		7	24		7.57	5.6	7.2
7	Zn ²⁺	4.77 ± 0.02	9.58 ± 0.04	8	19	5.9			
8	Me ₂ Sn ²⁺	4.29 ± 0.01	8.28 ± 0.02	4	14.7	0			
9	Me ₂ Sn ²⁺	4.17 ± 0.03	7.60 ± 0.05	5	12	0			
10	Pb ²⁺ ^{d)}	5.11 ± 0.01	9.53 ± 0.01	7	0.05	0	7.91	6.83 ^{c)}	9.09 ^{c)}
11	Al ³⁺ ^{e)}	3.08 ± 0.04		3	45				
12	Al ³⁺	4.20 ± 0.03	8.16 ± 0.06	4	44	0	9.9	8.3	12
13	Al ³⁺	4.58 ± 0.03	8.96 ± 0.05	5	27	0			
14	Al ³⁺	6.16 ± 0.06	11.47 ± 0.08	6	5.6	0.42			
15	Al ³⁺	3.75 ± 0.06	9.62 ± 0.09	7	8.7	0.14			
16	Ga ³⁺	4.19 ± 0.03	11.51 ± 0.05	5	24	0.24			
17	Be ²⁺	2.7 ± 0.1		5	8.1				

a) The ratio of fluorescence intensities I at a wavelength corresponding to maximum difference in the fluorescence between L and ML or L and ML₂ respectively.

b) Binding constants to maltol and Hdpp in water, from Ref. [14].

c) In water from Ref. [15].

d) $\log \beta_{11}^{\text{obs}} = 4.92 \pm 0.06$ and $\log \beta_{12}^{\text{obs}} = 9.91 \pm 0.04$ from UV-Vis data.

e) $\log \beta_{11}^{\text{obs}} = 3.03$; 3.9 and 4.18 at pH 3; 4 and 5 respectively from UV-Vis data.

spectrum of **4** is similar for both cations (Figs. 3b and 4b): in both cases the absorption maximum at 359 nm is decreased and a new maximum at longer wavelength, 382 nm for Pb(II) and 376 nm for Zn(II), appears.

The effect of Zn(II) coordination on fluorescence can be rationalized in terms of Scheme 1 [20]. The free ligand has two emission maxima, at 421 nm and 523 nm attributed to two tautomeric forms A and B of **4**. In the ground state form A has lower energy and emits at shorter wavelength, but in the excited state OH group becomes more acidic and this leads to proton transfer (ESIPT) with formation of the tautomeric form B which emits at longer wavelength. Binding of the metal ion releases proton from OH group and eliminates a possibility of tautomeric equilibrium in the complex C, which has a single emission maximum at 479 nm. The fitting of titration results in Fig. 4 with HypSpec shows formation of a 1:1 complex with observed stability constant given in Table 1.

Titration with Zn(II) in pH interval from 5 to 8 showed the expected decrease of β_{11}^{obs} at lower pH (Table 1, entries 5–7) due to the competition with proton in accordance with complexation equilibrium (1). At pH 5 interaction with Zn(II) at mM concentrations is practically undetectable, but at pH 8 a second complex of 1:2 stoichiometry

corresponding to Eq. (2) starts to contribute with the apparent stability constant β_{12}^{obs} (Table 1, entry 7). This complex appears only at sufficiently high pH values because its formation requires the liberation of 2 protons, Eq. (2). Like in the case of Pb(II), the fluorescence intensity of ML₂ is significantly lower than that of ML, Fig. 4a (inset).



Interaction of **4** with Me₂Sn(IV) was accompanied by spectral changes similar to those observed with Zn(II), Fig. 5a, and can be interpreted in terms of the same Scheme 1. Fitting with HypSpec reveals formation of two complexes ML and ML₂ with the respective stability constants given in Table 1 (entries 8, 9) and the calculated emission spectra shown in Fig. 5b, from which one can see that complex ML is much more fluorescent than the free ligand, but ML₂ has no fluorescence.

Stability constants determined for Me₂Sn(IV) at variable pH show the opposite trend to those measured for Zn(II). The decrease in observed β_{11}^{obs} and β_{12}^{obs} on increase in pH is a result of strong hydrolysis

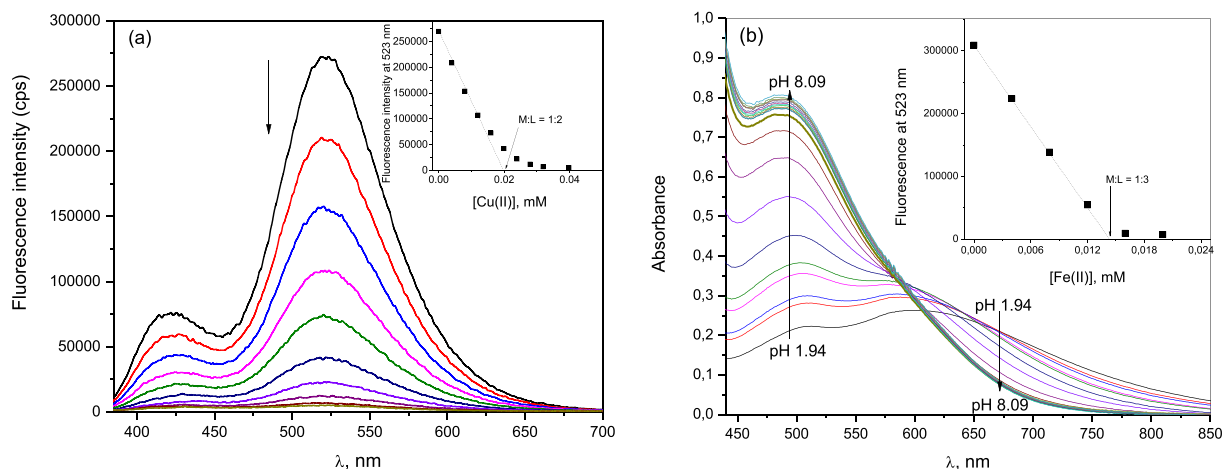


Fig. 2. (a) Emission spectra of 40 mM **4** at pH 7 in the presence of 5 mM HTAB at increased concentrations of Cu(II); excitation wavelength 374 nm. Arrow shows the direction of spectral changes on the increase in Cu(II) concentration. Inset shows the profile of fluorescence intensity vs. Cu(II) concentration at 523 nm. (b) UV-Vis absorption spectra of 0.1 mM Fe(II/III) in the presence of 0.3 mM **4** at variable pH. Inset shows the profile of fluorescence at 523 nm vs. Fe(II/III) concentration.

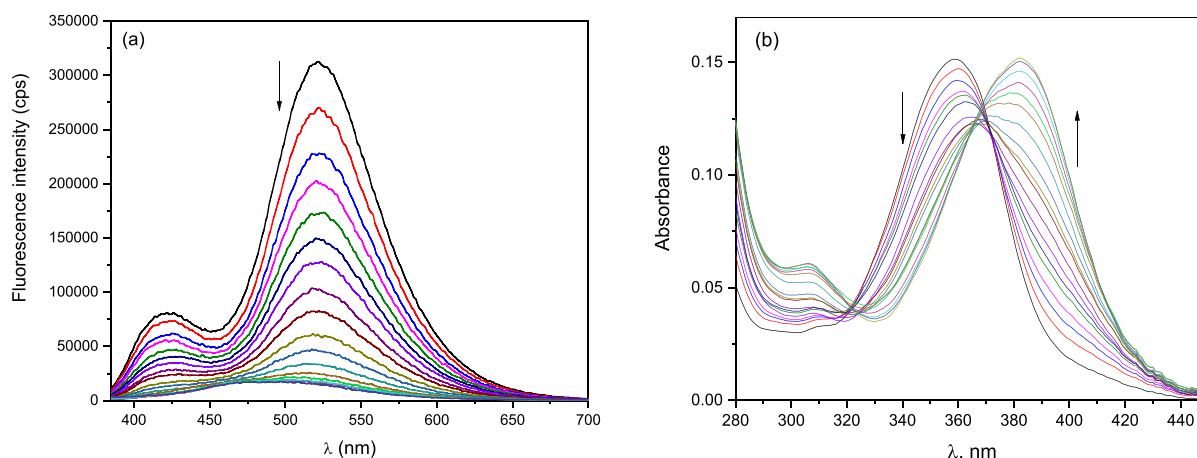
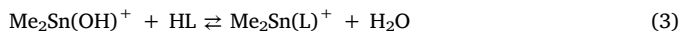


Fig. 3. (a) Fluorescence and (b) spectrophotometric titrations of 40 μM and 20 μM 4 respectively by Pb(II) at pH 7 in 5 mM HTAB. Excitation wavelength 374 nm. Arrows show the directions of spectral changes on increase in the metal ion concentration.

of this cation with reported values of $\text{p}K_{\text{a}1} = 2.71$ and $\text{p}K_{\text{a}2} = 5.30$ [21]. Thus at pH 4 the predominant form is the cation $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{OH})^+$ and the actual complexation reaction proceeds in accordance with Eq. (3). At higher pH 5 the ligand still is predominantly in the HL form, but at this pH already 30% of $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{OH})^+$ is converted in the neutral $\text{Me}_2\text{Sn}(\text{OH})_2$ with the corresponding decrease in the observed stability constant (cf. entries 8 and 9 in Table 1).



Cations of Al(III) induced the largest increase in the fluorescence intensity and visually detectable change of emission color, Fig. 6a. The existence of two complexes of 1:1 and 1:2 stoichiometry is clearly seen from results of titration at pH 6 (Fig. 6b): initial additions of low Al(III) concentrations when 1:2 complex is dominating quench fluorescence at 523 nm, but at higher Al(III) concentrations a new emission maximum appears at 450 nm. Like in the case of Sn(IV) and Zn(II) the complex ML_2 has low fluorescence, but the complex ML has the increased fluorescence. Complexation induced changes in UV-Vis absorption spectrum of 4 are of the same type as with Zn(II) and Pb(II), Fig. 3S (Supplementary Material).

Stability constants for Al(III) determined at several fixed pH values show complex trends (Table 1, entries 11–15) due to strong hydrolysis of this cation at pH above 4. Individual stability constants were determined by HypSpec analysis of UV-Vis and fluorescence spectra of metal ion – ligand mixtures at variable pH (Fig. 4S, Supplementary

Material) using reported in literature hydrolysis constants of Al^{3+} ($\log \beta_{1,-1} = -5.33$, $\log \beta_{1,-2} = -10.9$, $\log \beta_{3,-4} = -13.13$ and $\log \beta_{13,-32} = -107.41$, $\log \beta_{1,-4} = -23.3$) [22] as fixed parameters and assuming that the complexation reactions take place in accordance with Eqs. (1) and (2). The resulting values $\log \beta_{110} = 9.99 \pm 0.01$; $\log \beta_{120} = 19.60 \pm 0.03$ (UV-Vis) and $\log \beta_{110} = 9.74 \pm 0.01$; $\log \beta_{120} = 19.83 \pm 0.03$ (fluorescence) give the mean stability constants $\log \beta_{110} = 9.9 \pm 0.1$ and $\log \beta_{120} = 19.7 \pm 0.1$. They agree very well with observed stability constants measured at fixed pH, e.g. at pH = 4 calculated with these constants values are $\log \beta_{11}^{\text{obs}} = 4.1$ and $\log \beta_{12}^{\text{obs}} = 8.1$ while the respective experimental values are 4.20 and 8.16 (Table 1, entry 12).

Titration data for Be(II) and Ga(III) are shown in Fig. 5Sa,b (Supplementary Material). These cations also induce fluorescence enhancement, although effect of Be(II) is rather modest. In case of Ga(III) two complexation steps corresponding to ML and ML_2 complexes are clearly seen with ML complex possessing higher fluorescence, but ML_2 complex possessing lower fluorescence than the free ligand (Table 1, entries 16, 17).

An important question is how the presence of surfactant micelles affects the complexation equilibria. Previously we were able to make the measurements both in micellar HTAB solution and in water containing just 5% vol. of MeCN with more soluble ligand 3 [4]. Unfortunately with 4 as a ligand reproducible results were obtained only in the micellar medium. Expected effects of cationic micelles involve (1)

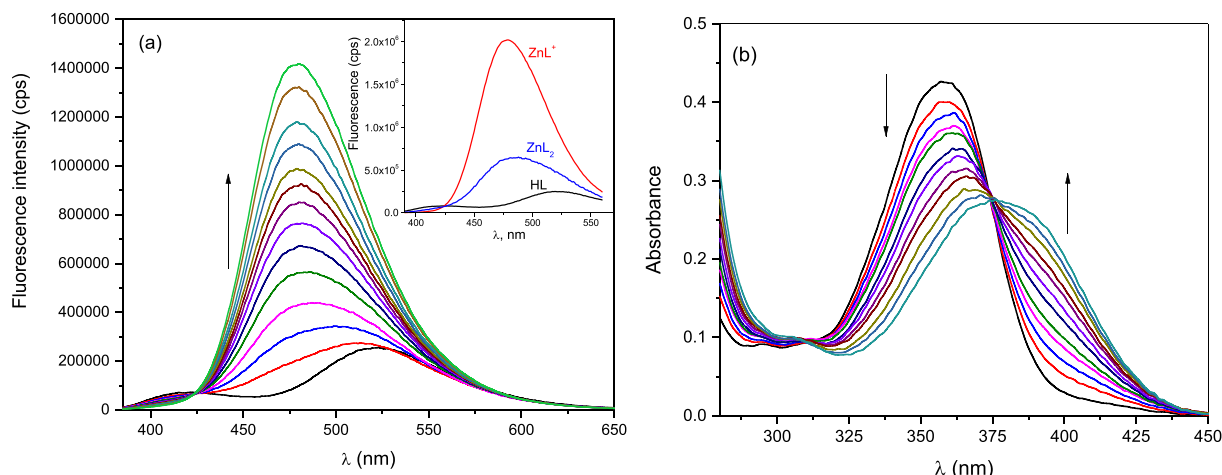


Fig. 4. (a) Fluorescence and (b) spectrophotometric titrations of 40 μM 4 in 5 mM HTAB by Zn(II) at pH 7. Arrows show the directions of spectral changes on increase in the metal ion concentration. Inset shows emission spectra of HL, ZnL^+ and ZnL_2 generated by HypSpec at pH 8.

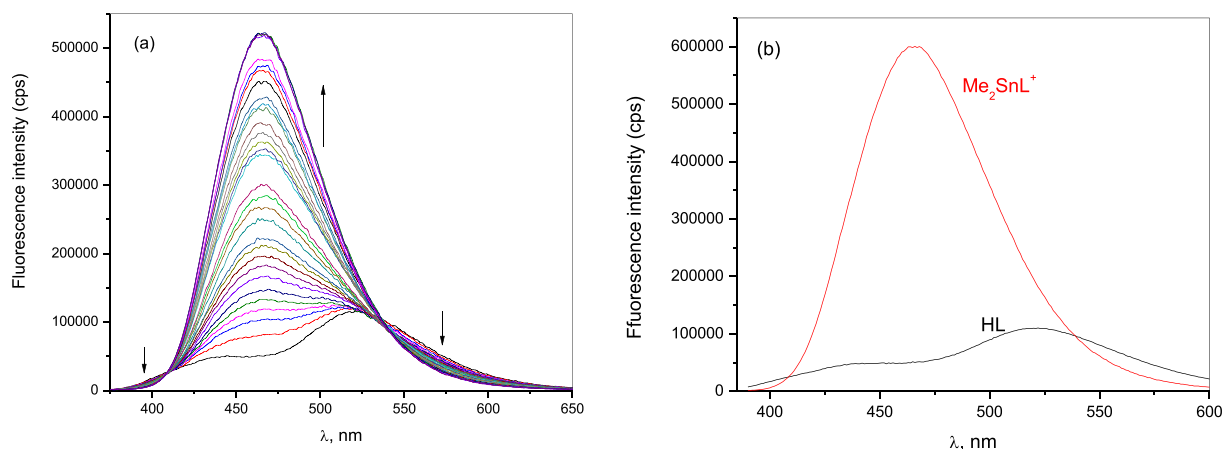


Fig. 5. (a) Fluorescence titration of 20 μM **4** by Me_2SnCl_2 in 5 mM HTAB at pH 5. The arrows show the direction of spectral changes on increase in the metal ion concentration. (b) Emission spectra of HL and Me_2SnL^+ generated by HypSpec at pH 5; the complex Me_2SnL_2 has no fluorescence.

heightening of the local concentration of hydrophobic ligand in the micellar phase, (2) decrease in the local concentration of metal ions in the micellar phase due to their repulsion by positive micellar charge and hydrophobic micellar microenvironment, (3) decrease in pK_a of the ligand induced by the positive micellar surface charge. The second and the third effects are respectively unfavorable and favorable for the complex formation and should to some extent compensate each other while the first effect should favor formation of complexes of a higher stoichiometry. In line with these expectations we observed with the ligand **3** [4] similar stabilities of 1:1 ML complexes in water and micellar solution, but strongly increased stabilities of 1:2 ML_2 complexes in the micellar medium. For instance, with Zn^{2+} and $\text{Me}_2\text{Sn}^{2+}$ only 1:1 complexes were detected in water, but both 1:1 and 1:2 complexes in micellar HTAB solutions [4]. Considering high degree of similarity in structures of **3** and **4** we expect similar micellar effects with **4** as a ligand.

Inspection of results in Table 1 shows that **4** behaves as a fairly

strong ligand toward different metal ions. It would be interesting to compare **4** and **1** as the ligands, but reported stability constants of the metal complexes of **1** were measured in organic solvents, usually in methanol or in organic rich aqueous-organic mixtures [1], under conditions of unknown metal speciation and cannot be meaningfully compared with those determined in the present study. More meaningful comparison is possible with water soluble structurally similar ligands 3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone (maltol) and 3-hydroxy-1,2-dimethyl-4-pyridinone (Hdpp). Available stability constants for 1:1 complexes (K_1) with these ligands are compiled in Table 1. These constants refer to the binding of an aqua metal ion with a deprotonated ligand anion. Respective constants for **4** and several metal ions calculated from apparent conditional constants β_{11}^{obs} and known pK_a^{HL} of **4** assuming that the complex formation reaction follows the Eq. (1) are also given in Table 1, column $\log K_1$ ($\log K_1 = \log \beta_{11}^{\text{obs}} + \text{pK}_a^{\text{HL}} - \text{pH}$). Evidently stability constants for **4** and different metal ions correlate very well with those for maltol and Hdpp, occupying the intermediate position

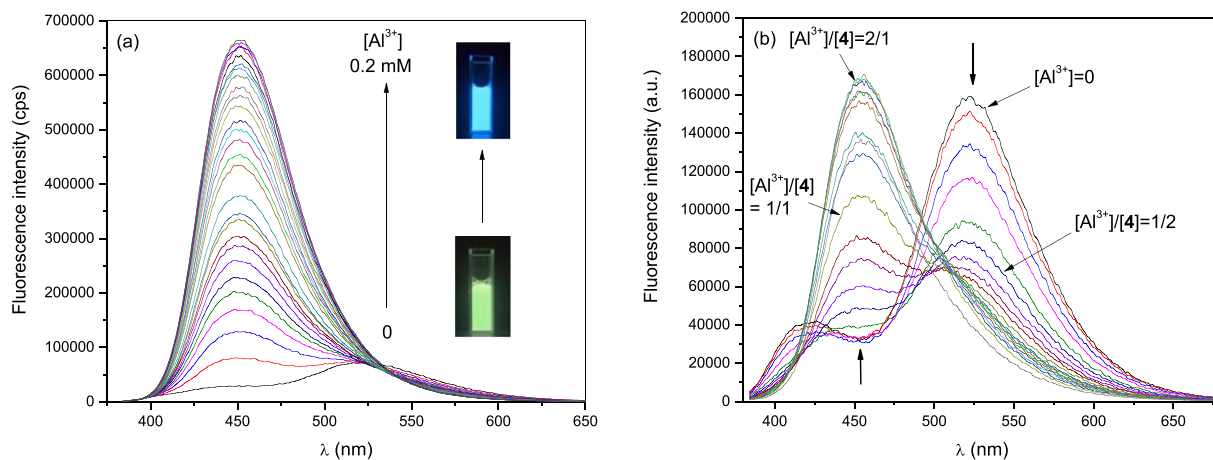
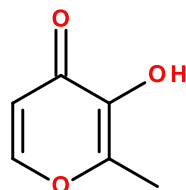
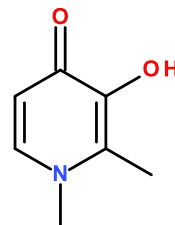


Fig. 6. Fluorescence titration of 40 μM **4** by $\text{Al}(\text{III})$ in 5 mM HTAB at pH 5 (a) and pH 6 (b). Arrows show the directions of spectral changes on increase in the metal ion concentration.

between less powerful ligand maltol and more powerful Hdpp. The relative affinity of anions maltol $< 4 < \text{Hdpp}$ correlates well with basicity of anions ($\text{p}K_{\text{a}}$ of neutral HL ligands 8.45; 9.8; 10.16 respectively) and with atomic charges on the carbonyl oxygen: -0.613 , -0.601 and -0.702 respectively.



Maltol



Hdpp

3.3. Complexation effects on fluorescence of 4

Described above effects of metal coordination on optical properties of 4 in general follow typically observed pattern [23]: the absorption maximum is shifted non-selectively due to electrostatic interactions of cations with lone pairs adjacent to ligand's π -system, paramagnetic cations induce strong quenching, heavy diamagnetic cation Pb^{2+} also induces quenching and light diamagnetic cations (Al^{3+} , Zn^{2+} , Sn^{4+}) enhance the fluorescence acting as outlined in Scheme 1 for Zn^{2+} . Similar effects are observed with 1 as a fluorescent ligand although Pb^{2+} enhances fluorescence of 1 in methanol [24].

Results of this study summarized in Table 1 point to usually overlooked aspect of metal coordination effect on the fluorescence of bound ligands: its strong dependence on the stoichiometry (see columns $I_{\text{ML}}/I_{\text{L}}$ and $I_{\text{ML}_2}/I_{\text{L}}$). With all cations except Cu^{2+} and Fe^{2+} , which quench completely fluorescence in both ML and ML_2 complexes, we observe stronger fluorescence of ML complex than that of ML_2 complex. Particularly large difference is observed for $\text{Me}_2\text{Sn}^{2+}$, Al^{3+} and Ga^{3+} . These cations induce strong fluorescence enhancement in ML complexes, but quenching in ML_2 complexes.

Occasional observations of such effect can be found in literature. Thus 1:1 organotin complexes of 1 are strongly fluorescent, but complexes with two molecules of 1 have nearly zero fluorescence [25]. The effect was attributed to the fact that 1:1 complexes were penta-coordinate while 1:2 complexes were hexa-coordinate although it remained unclear why the coordination number was important.

More recently a strong dependence of fluorescence of Al^{3+} complexes with ligands derived from 8-hydroxyquinoline on their stoichiometry was reported [26]. The fluorescence intensity of the complex with a tripod ligand where the metal ion is bound to three 8-hydroxyquinoline units is similar to that of the free ligand, but the fluorescence of a ligand containing a single 8-hydroxyquinoline unit increases by a factor of 100 in a 1:1 complex with Al^{3+} . It was concluded that "The charge density on $\text{Al}(\text{III})$, tuned by the number of chelating groups and by their formal charges, influences the photoinduced intramolecular charge transfer (ICT) which tends to quench the fluorescence emission of the 8-hydroxyquinoline ligand" [26].

Relevant results can be found in previous studies on fluorescence of Al^{3+} complexes of flavonol 1. In an earlier study formation of a series of complexes of variable stoichiometry depending on acidity or basicity of the medium in pure methanol was reported [27]. Complexes of ML type were fluorescent, but complexes of ML_2 type lacked fluorescence in line with our observations for $\text{Al}(\text{III})$ complexes of 4. In a more recent study [28] only ML_2 complex was observed in neutral and basic methanol solutions, but in 50% aqueous methanol at pH 6 both ML and ML_2 complexes were observed by spectrophotometric titrations with very

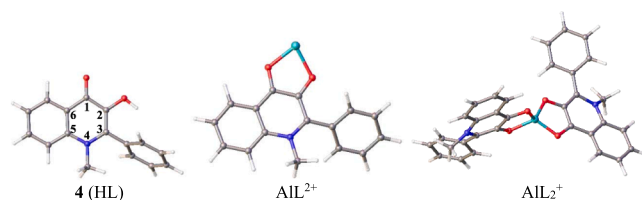
high stability constants $\log \beta_{11} = 5.17$ and $\log \beta_{12} = 9.91$ [29]. Fluorescence properties of the complexes were not measured, but in ref. [24] the complex AlL_2 with 1 was reported as highly fluorescent both in methanol and methanol-water. Finally, with methoxy-substituted in the phenyl ring 1 as a ligand, in 95% methanol – 5% water containing 0.01–10 mM HClO_4 only 1:1 AlL strongly fluorescent complex was

detected [30]. Interestingly, in this study stability of $\text{Zn}(\text{II})$, $\text{Cd}(\text{II})$ and $\text{Pb}(\text{II})$ complexes strongly increased on decrease in acid concentrations in accordance with binding mode 2, reaction (1), but stability of $\text{Al}(\text{III})$ complex was independent of $[\text{HClO}_4]$ indicating strong complexation of the neutral form of the ligand without always assumed concomitant deprotonation. This aspect may be a reason for some controversy in the reported data because in methanol solutions postulated deprotonation usually is not confirmed, but due to lower polarity of methanol as compared to water a fairly efficient complexation with OH group indeed can take place under certain conditions and discussed complexes may contain either neutral or anionic 1 as a ligand.

In a most recent example a nonfluorescent 1:2 complex and a fluorescent 1:1 complex of Cu^{2+} with 1 in methanol were observed [31]. In light of results found in the present study we believe that decreased fluorescence of 1:2 complexes as compared to 1:1 complexes is a general phenomenon for 3-hydroxy-pyranone and 3-hydroxy-pyridinone ligands.

3.4. Quantum mechanical analysis of fluorescence properties of Al^{3+} complexes of 4

To get a better insight into the nature of this phenomenon the electronic properties of Al^{3+} 1:1 and 1:2 complexes with 4 were analyzed theoretically. The calculated structures of the complexes, ML and ML_2 in Scheme 2, were obtained starting from the crystal structure of 4 reported previously [4] and assuming the binding mode of the metal ion as in 2. The calculated structure of AlL_2^+ can be compared with reported structures of the $\text{Al}(\text{III})$ complex of the same composition, but with $\text{HL} = 1$ [28,32]. Concerning the pyridinone ring of 4, $\text{Al}(\text{III})$ ions complexation in the 1:1 complex strongly modifies its geometry; we observed a pyronium-like structure [28] with bond distances of $\text{C}_1\text{--C}_2 = 1.44 \text{ \AA}$, $\text{C}_2\text{--C}_3 = 1.43 \text{ \AA}$, $\text{C}_3\text{--C}_4 = 1.42 \text{ \AA}$, $\text{C}_4\text{--N}_5 = 1.43 \text{ \AA}$, $\text{N}_5\text{--C}_6 = 1.32 \text{ \AA}$, $\text{C}_6\text{--C}_1 = 1.49 \text{ \AA}$, suggesting a small bond-length alternation (BLA, defined as the difference between the long and short bonds in a conjugated molecule). Thus this molecular polarization



Scheme 2. The crystal structure of 4 and simulated structures of its complexes with Al^{3+} .

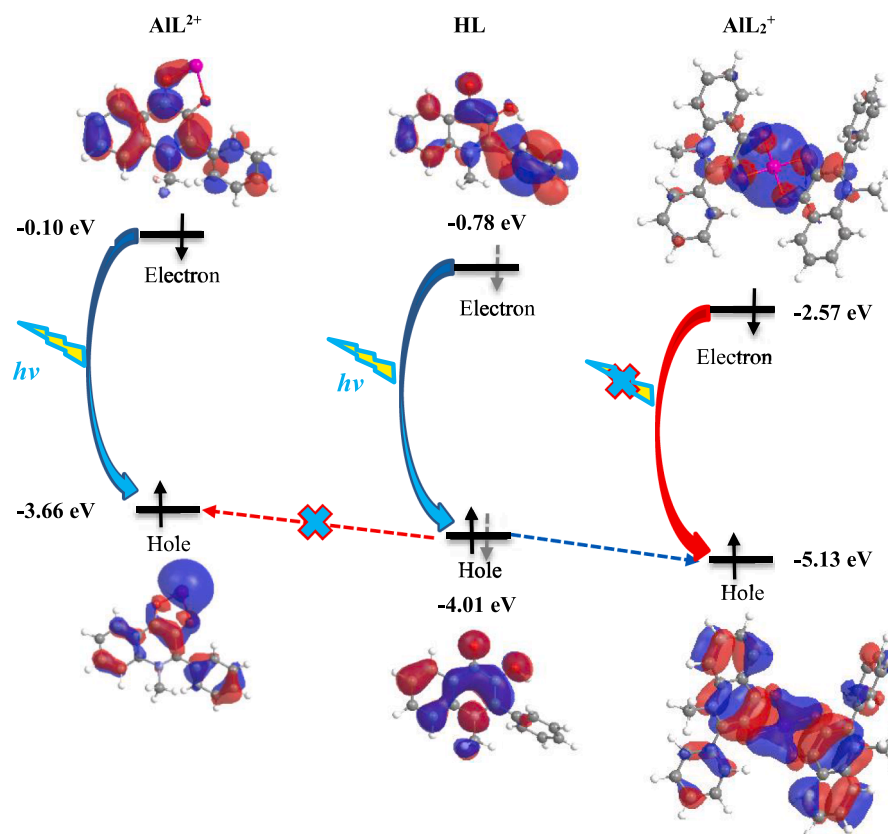


Fig. 7. Schematic representation of the fluorescence sensing mechanism using the NTO transition energies of **4** (HL) upon Al^{3+} ion coordination in 1:1 (AlL^{2+}) and 1:2 (AlL_2^+) stoichiometry, see Fig. 5S (Supplementary Material) for details.

through metal ion coordination agrees with a conservation of aromaticity in the pyridinone moiety. However, such BLAs observed in the 1:1 complex are not preserved in the 1:2 complex, where the pyridinone ring quote for distances of $\text{C}_1\text{--C}_2 = 1.43 \text{ \AA}$, $\text{C}_2\text{--C}_3 = 1.39 \text{ \AA}$, $\text{C}_3\text{--C}_4 = 1.43 \text{ \AA}$, $\text{C}_4\text{--N}_5 = 1.40 \text{ \AA}$, $\text{N}_5\text{--C}_6 = 1.44 \text{ \AA}$, $\text{C}_6\text{--C}_1 = 1.38 \text{ \AA}$, suggesting a larger bond-length alternation. A small or zero alternation indicates an aromatic behavior or π -electron delocalization and a larger alternation points to a separated single and double bond character. This result also suggests the radiative deactivation process in the 1:2 complex to be less effective compared to the 1:1 complex. Moreover, the electronic redistribution in the 1:2 complex enables a strong variation in the quinolinone N -dihedral angle, thus inhibiting the radiative deactivation channel of AlL_2^+ by internal conversion processes. Interestingly, the nearly planar geometry around nitrogen atom in the free ligand is conserved in the ML complex (dihedral angles between $\text{C}_{\text{Me}}\text{--N--C}_{\text{Ar}}$ and $\text{C}_{\text{Ar}}\text{--N--C}_{\text{Ar}}$ 173.0° and 175.3° respectively), but in the ML_2 complex nitrogen atom becomes more pyramidal with the dihedral angle of 137.4° . Therefore, the total charge density on the Al(III) metal ion induces a strong ligand polarization thus altering the ICT process and decreasing the fluorescence lifetime in 1:2 complexes, as previously suggested [26].

TD-DFT provides a good benchmark in the determination of spectroscopic properties due to the accurate description of ground and excited potential energy surfaces. In spite of that, in most of the cases, conventional TD-DFT results in a description of an excited state in terms of several single electronic excitations from an occupied to a virtual orbital. On the other hand, all the contributions to a given electronic excitation can be clarified by a Natural Transition Orbital (NTO) analysis [33], which provides a compact orbital representation of the electronic transition through a single configuration of a *hole* and *electron* interaction in a particular state. Consequently, the photoinduced electron transfer process is not depicted by a simple change in the

elementary molecular orbital occupancy, but in a hole-electron distribution.

Fig. 7 shows the NTO distribution for (HL), Al(L)^{2+} and Al(L)_2^+ forms of **4**. For HL the hole is spread around the hydroxyquinolinone moiety, while the electron is mainly spread in the phenyl subunit with a contribution of hydroxyquinolinone, conferring a homogeneous distribution for this electronic transition. The parameters for each electronic transition are shown in Fig. 6S (Supplementary Material), providing the wavelength value in nanometers and showing the oscillator strength (f) and the NTO coefficient (w) representing the extent to which the electronic excitation can be written as a single excitation. Moreover, the low-energy band experimentally observed near 500 nm can be ascribed to the HOMO-LUMO levels by simple comparison with the calculated spectrum of **4**. A similar pattern is observed for the HOMO-1-LUMO configurations, but in the case of the HOMO-LUMO + 1 configuration both, the *hole* and *electron* are localized through the molecule giving rise to the more energetic absorption band. Similar ligand *hole-electron* distribution is observed for the complexes, however, in the case of $[\text{Al(L)}]$ (Fig. 6S, entries C-D) NTO *hole* is largely distributed in the Al metal ion and **4** ligand while the *electron* is distributed solely in the **4** ligand, thus conferring a metal to ligand charge transfer character (MLCT) to this electronic transition with a high $S_1 \rightarrow S_0$ radiative deactivation probability. This effect is not observed for $[\text{Al(L)}_2]$ (Fig. 6S, entries E-M) and only metal contribution is observed for the absorption transition, $S_0 \rightarrow S_1$. The low energy emission transition ($S_1 \rightarrow S_0$) involves strong electron redistribution with inter-ligand charge transfer (ILCT) character promoting a non-radiative deactivation [34]. In the case of absorption transitions, clear MLCT process occur with quadrupolar electron polarization from the metal center to the ligands as shown in Fig. 6S-E, or dipolar polarization as shown in Fig. 6S, entries F and G. For the ILCT emission transitions only dipolar polarization is observed for all the *hole-electron* configurations between

one of the ligands to the whole complex or vice versa, Fig. 6S, entries H-M. Then, Fig. 7 illustrates the fluorescence sensing mechanism using the NTO transition energies of 4 (HL) modified upon Al(III) ion coordination in 1:1 (AlL_2^{2+}) and 1:2 (AlL_2^+) complexes. It appears that the AlL_2^+ complex is quenched by an internal photoinduced electron transfer (PET) process. Such PET process is known for some hydroxyquinoline-derived fluorophores [35], where the electron redistribution upon photoexcitation leads to its internal transfer to the unoccupied orbital level of the metal ion (see ligand 4 and 1:2 (AlL_2^+) complex, Fig. 7). In the case of the 1:2 complex the ligand frontier molecular orbitals are more stabilized by ca. 1.12 eV probably due to the strong electron coupling (evidenced by the hole distribution which is widespread from one ligand to the other), thus allowing the internal electron transfer from the ligands to the metal center and preventing the radiative deactivation for this complex (electron return to the ground state, red solid-arrow in Fig. 7). Importantly, this process is not favorable for the 1:1 AlL_2^{2+} complex where the energy of the ligand is smaller by ca. 0.35 eV, Fig. 7, red dotted-arrow. Then, 1:1 metal ion coordination leads to a fluorescent emission state S_1 , where the electron distribution is similar to the free ligand and no internal electron transfer occurs, however, in the case of the 1:2 stoichiometry the internal PET process has a clear electron redistribution between the S_0 and S_1 states. Here is important to remark that the NTO pair is equivalent to the HOMO – LUMO distribution since these molecular orbitals have the main contribution to the electronic transition (NTO coefficient $w > 0.9$).

4. Conclusions

1-Methyl-2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (LH) acts a powerful ligand for many metal ions in aqueous micellar medium and potentially may serve as a turn-on fluorescent sensor for biologically and environmentally important cations such as Al^{3+} , Zn^{2+} and Me_2Sn^{2+} . The major point of this study is the demonstration that for many metal ions, the strong fluorescence enhancement observed in 1:1 ML complexes is not conserved in higher 1:2 ML_2 complexes. Moreover, ML_2 complexes of Al^{3+} , Ga^{2+} and Me_2Sn^{2+} are non-fluorescent or low fluorescent although these cations induce very strong fluorescence enhancements in ML complexes. An important implication of this phenomenon for design of fluorescence sensors for metal ions, as it was noticed for the first time by Bardez et al. [26], is that di- or tri-topic ligands designed for increased affinity to the metal ion may suffer from the loss of the turn-on fluorescence response to the metal binding. The quenching mechanism elaborated in this work for ML_2 complex of Al(III) and 4 should work equally well for other light diamagnetic metal ions and aromatic O,O-chelate ligands of 3-hydroxypyranone, 3-hydroxypyridinone and 3-hydroxyquinolone type and probably also for catechols.

CRediT authorship contribution statement

Karla Elisa Trejo-Huizar: Investigation, Validation, Formal analysis, Visualization. **Arturo Jiménez-Sánchez:** Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing, Formal analysis, Visualization. **Anatoly K. Yatsimirsky:** Conceptualization, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Karla Elisa Trejo-Huizar thanks CONACYT for the doctoral fellowship (292469). The support from Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 5000-9042), Facultad de Química de la UNAM is gratefully acknowledged. Arturo Jiménez-Sánchez thanks PAPIIT-UNAM project IA201318.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119471>.

References

- [1] M.M. Kasprzak, A. Erxleben, J. Ochocki, Properties and applications of flavonoid metal complexes, *RSC Adv.* 5 (2015) 45853–45877, <https://doi.org/10.1039/C5RA05069C>.
- [2] M. Samsonowicz, E. Regulaska, M. Kalinowska, Hydroxyflavone metal complexes – molecular structure, antioxidant activity and biological effects, *Chem. Biol. Interact.* 273 (2017) 245–256, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.06.016>.
- [3] M. Grazul, E. Budzisz, Biological activity of metal ions complexes of chromones, coumarins and flavones, *Coord. Chem. Rev.* 253 (2009) 2588–2598, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.015>.
- [4] A. Jimenez-Sanchez, A.K. Yatsimirsky, Acid–base and coordination properties of 2-phenyl-3-hydroxy-4-quinolones in aqueous media, *RSC Adv.* 5 (2015) 62116–62127, <https://doi.org/10.1039/C5RA10217Kq>.
- [5] (a) D.A. Yushchenko, V.V. Shvadchak, A.S. Klymchenko, G. Duportail, Y. Mely, V.G. Pivovarenko, 2-Aryl-3-hydroxyquinolones, a new class of dyes with solvent dependent dual emission due to excited state intramolecular proton transfer, *New J. Chem.* 30 (2006) 774–781, <https://doi.org/10.1039/B601400C>; (b) D.A. Yushchenko, V.V. Shvadchak, A.S. Klymchenko, G. Duportail, V.G. Pivovarenko, Y. Mely, Steric control of the excited-state intramolecular proton transfer in 3-hydroxyquinolones: steady-state and time-resolved fluorescence study, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 8986–8992.
- [6] A.C. Sedgwick, L. Wu, H.-H. Han, S.D. Bull, X.-P. He, T.D. James, J.L. Sessler, B.Z. Tang, H. Tian, J. Yoon, Excited-state intramolecular proton-transfer (ESIPT) based fluorescence sensors and imaging agents, *Chem. Soc. Rev.* 47 (2018) 8842–8880, <https://doi.org/10.1039/C8CS00185E>.
- [7] K.E. Trejo-Huizar, A. Jiménez-Sánchez, M.A. Martínez-Aguirre, A.K. Yatsimirsky, Fluorescence ratiometric sensing of polyols by phenylboronic acid complexes with ligands exhibiting excited-state intramolecular proton transfer in aqueous micellar media, *J. Lumin.* 179 (2016) 393–401, <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2016.07.007>.
- [8] J. Bernal-Escalante, A. Lopez-Vazquez, D. Araiza-Olivera, A. Jimenez-Sanchez, Organotin(IV) differential fluorescent probe for controlled subcellular localization and nuclear microviscosity monitoring, *Chem. Commun.* 55 (2019) 8246–8249.
- [9] S.P. Diggle, S. Matthijs, V.J. Wright, M.P. Fletcher, S.R. Chhabra, I.L. Lamont, X. Kong, R.C. Hider, P. Cornelis, M. Camara, P. Williams, The pseudomonas aeruginosa 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment, *Chem. Biol.* 14 (2007) 87–96, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.11.014>.
- [10] S. Heeb, M.P. Fletcher, S.R. Chhabra, S.P. Diggle, Paul Williams, M. Camara, Quinolones: from antibiotics to autoinducers, *FEMS Microbiol. Rev.* 35 (2011) 247–274, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00247>.
- [11] R. Buchtik, Z. Travnicek, J. Vanco, R. Herchel, Z. Dvorak, Synthesis, characterization, DNA interaction and cleavage, and in vitro cytotoxicity of copper(II) mixed-ligand complexes with 2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone, *Dalton Trans.* 40 (2011) 9404–9412, <https://doi.org/10.1039/c1dt10674k>.
- [12] C.A. Bunton, A.K. Yatsimirsky, Comparisons and analyses of theoretical treatments of micellar effects upon ion-molecule reactions, *Relev. Amide Exchange, Langmuir* 16 (2000) 5921–5931, <https://doi.org/10.1021/la000068s>.
- [13] Gaussian 09, Revision A.02, M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H.P. Hratchian, J.V. Ortiz, A.F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V.G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J.A. Montgomery, Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [14] J. Burgess, M. Rangel, Hydroxypyranones, hydroxypyridinones, and their complexes, in: Van Eldik (Ed.), *Advances in Inorganic Chemistry*, vol. 60, Academic Press, Amsterdam, 2008, pp. 167–243.
- [15] P. Buglyó, L. Bíró, I. Nagy, B. Szocs, E. Farkas, Hydroxypyronate, thiohydroxypyronate and hydroxypyridinone derivatives as potential Pb^{2+} sequestering agents, *Polyhedron* 92 (2015) 7–11, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.03.006>.

- [16] V.A. Timoshnikova, V.I. Klimentieva, N.E. Polyakova, G.J. Kontoghiorghes, Photoinduced transformation of iron chelator deferiprone: Possible implications in drug metabolism and toxicity, *J. Photochem. Photobiol., A* 289 (2014) 14–21, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2014.05.012>.
- [17] E. Farkas, E.A. Enyedy, L. Zekany, G. Deak, Interaction between iron (II) and hydroxamic acids: oxidation of iron(II) to iron (III) by desferrioxamine B under anaerobic conditions, *J. Inorg. Biochem.* 83 (2001) 107–114, [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(00\)00197-5](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(00)00197-5).
- [18] pFe is defined as $\log Fe_{free}$ when $Fe_{Tot} = 10^{-6}$ M and $L_{Tot} = 10^{-5}$ M at pH 7.4.
- [19] V.M. Nurchi, G. Crisponi, T. Pivetta, M. Donatoni, M. Remelli, Potentiometric, spectrophotometric and calorimetric study on iron(III) and copper(II) complexes with 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridinone, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 684–692.
- [20] M.M. Henary, C.J. Fahrni, Excited state intramolecular proton transfer and metal ion complexation of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzoxoles in aqueous solution, *J. Phys. Chem. A* 106 (106) (2002) 5210–5220, <https://doi.org/10.1021/jp014634j>.
- [21] R. Villamil-Ramos, P. Gomez-Tagle, J.C. Aguilar-Cordero, A.K. Yatsimirsky, Spectrophotometric, fluorimetric and electrochemical selective pyrophosphate/ATP sensing based on the dimethyltin(IV)-tiron system, *Analyt. Chim. Acta* 1057 (2019) 51–59.
- [22] (a) M.L. Adams, B. O'Sullivan, A.J. Downard, K.J. Powell, Stability constants for aluminium(III) complexes with the 1,2-dihydroxyaryl ligands caffeic acid, chlorogenic acid, DHB, and DASA in aqueous solution, *J. Chem. Eng. Data* 47 (2002) 289–296, <https://doi.org/10.1021/je010279e>;
(b) P.L. Brown, R.N. Sylva, G.E. Batley, J. Ellis, The hydrolysis of metal ions. Part 8. Aluminium(III), *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1985) 1967–1970, <https://doi.org/10.1039/DT9850001967>.
- [23] K. Rurack, Flipping the light switch 'ON' — the design of sensor molecules that show cation-induced fluorescence enhancement with heavy and transition metal ions, *Spectrochim. Acta, Part A* 57 (2001) 2161–2195, [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(01\)00492-9](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(01)00492-9).
- [24] S. Protti, A. Mezzetti, C. Lapouge, J.-P. Cornard, Photochemistry of metal complexes of 3-hydroxyflavone: towards a better understanding of the influence of solar light on the metal–soil organic matter interactions, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7 (2008) 109–119, <https://doi.org/10.1039/B709682H>.
- [25] S.J. Blunden, P.J. Smith, Synthesis and spectroscopic studies of organotin derivatives of 3-hydroxyflavon, *J. Organomet. Chem.* 226 (1982) 157–163, [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(00\)87431-8](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)87431-8).
- [26] J.-B. Mulon, E. Destandau, V. Alain, E. Bardez, How can aluminium(III) generate fluorescence? *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1749–1755, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.06.005>.
- [27] L.J. Porter, K.R. Markham, The aluminium (III) complexes of hydroxy-flavones in absolute methanol. Part 1. Ligands containing only one chelating, Site, *J. Chem. Soc. (C)* (1970) 344–349, <https://doi.org/10.1039/J39700000344>.
- [28] A.-C. Boudet, J.-P. Cornard, J.-C. Merlin, Conformational and spectroscopic investigation of 3-hydroxyflavone–aluminium chelates, *Spectrochim. Acta, Part A* 56 (2000) 829–839, [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(99\)00284-X](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(99)00284-X).
- [29] L. Dangleterre, J.-P. Cornard, C. Lapouge, Spectroscopic and theoretical investigation of the solvent effects on Al(III)–hydroxyflavone complexes, *Polyhedron* 27 (2008) 1581–1590, <https://doi.org/10.1016/j.poly.2008.01.038>.
- [30] J.V. Valente, M.A. Buntine, S.F. Lincoln, A.D. Ward, UV–Vis and fluorimetric Al^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} complexation studies of two 3-hydroxyflavones and a 3-hydroxythioflavone, *Inorg. Chim. Acta* 360 (2007) 3380–3386, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2007.04.011>.
- [31] A. Moncombe, C. Falantin, J.-P. Cornard, Electronic spectroscopies combined with quantum chemistry calculations: study of the interactions of 3-hydroxyflavone with copper ions, *J. Phys. Chem. B* 122 (122) (2018) 8943–8951, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b06062>.
- [32] Y.A. Davila, M.I. Sancho, M.C. Almandoz, S.E. Blanco, Structural and spectroscopic study of Al(III)–3-hydroxyflavone complex: determination of the stability constants in water–methanol mixtures, *Spectrochim. Acta, Part A* 95 (2012) 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.04.034>.
- [33] R.L. Martin, Natural transition orbitals, *J. Chem. Phys.* 118 (2003) 4775–4777, <https://doi.org/10.1063/1.1558471>.
- [34] (a) L. Burel, M. Mostafavi, S. Murata, M. Tachiya, Transient effect in fluorescence quenching by electron transfer. 4. Long-range electron transfer in a nonpolar solvent, *J. Phys. Chem. A* 103 (1999) 5882–5888, <https://doi.org/10.1021/jp991087h>;
(b) A. Ito, Z. Fang, M.K. Brennaman, T.J. Meyer, Long-range photoinduced electron transfer dynamics in rigid media, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 4880–4891, <https://doi.org/10.1039/C3CP54801E>;
(c) A. Ito, D.J. Stewart, Z. Fang, M.K. Brennaman, T.J. Meyer, Sensitization of ultra-long-range excited-state electron transfer by energy transfer in a polymerized film, *PNAS* 109 (2012) 15132–15135, <https://doi.org/10.1073/pnas.1213646109>.
- [35] E. Bardez, A. Chatelain, B. Larrey, B. Valeur, Photoinduced coupled proton and electron transfers. 1. 6-Hydroxyquinoline, *J. Phys. Chem.* 98 (9) (1994) 2357–2366, <https://doi.org/10.1021/j100060a025>.