



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**DISEÑO DE UN QUIMIOSENSOR FLUORESCENTE PARA
CISTEÍNA Y HOMOCISTEÍNA BASADO EN UN
COMPLEJO TIPO PINZA DE COBRE(II) CON
PIRIDIN-2,6-DICARBOXIAMIDA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

Ordiales Caballero Carolina

Director de Tesis

Dr. Dorazco González Alejandro



Ciudad Universitaria, CDMX, 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** BARBA BEHRENS NORÁH YOLANDA

VOCAL: **Profesor:** ZÚÑIGA VILLARREAL NOÉ

SECRETARIO: **Profesor:** DORAZCO GONZÁLEZ ALEJANDRO

1^{er} SUPLENTE: **Profesor:** MORALES MORALES DAVID

2^o SUPLENTE: **Profesor:** FARFÁN GARCÍA JOSÉ NORBERTO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LAB. DE QUÍMICA INORGÁNICA 3 DEL INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.
CIRCUITO EXTERIOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, ALCALDÍA COYOACÁN
C.P. 04510, CDMX.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Alejandro Dorazco González

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Josué Valdés García

SUSTENTANTE (S):

Carolina Ordiales Caballero

Agradecimientos

A los siguientes proyectos por el financiamiento:

- Programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica **PAPIIT-UNAM 2020-2023, IN216220.**
- CONACyT ciencia de frontera 2019, proyecto 160671.

Contenido

I. Resumen.....	12
II. Introducción.....	13
III. Capítulo 1 Antecedentes	15
III.1 Propiedades químicas y biológicas de los tioles biológicos	15
III.1.1 Cisteína	16
III.1.2 Homocisteína	17
III.1.3 Glutación	17
III.2 Sensores moleculares fluorescentes	18
III.2.1 Tipo de quimiosensores	21
III.2.2 Mecanismos de repuesta de los sensores moleculares fluorescentes	22
III.3 Luminiscencia (conceptos, mecanismos, encendido y extinción)	24
III.3.1 Mecanismos fotofísicos para el sentido	26
III.3.2 Desactivación de luminiscencia (Quenching)	29
III.4 Quimiosensores para cisteína, homocisteína y glutación	30
III.5 Química del Cu(II)	33
III.6 Complejos tipo pinza	33
IV. Hipótesis.....	36
V. Objetivo General	36
VI. Objetivos Particulares.....	36
VII. Metodología	38
VII.1 Disolventes y reactivos	38
VII.2 Instrumentación	38

VII.3	Síntesis de compuestos	39
VII.3.1	BQ5 (intermediario)	39
VII.3.2	Ligante L	40
VII.3.3	Complejo 1	41
VIII.	Resultados	43
VIII.1	Síntesis química	43
VIII.2	Estudios de complejación de L con Cu(II) en agua	54
VIII.3	Estabilidad del complejo en medios acuosos	59
VIII.4	Detección fluorescente de bimotoles.	61
VIII.5	Detección visual por tiras reveladoras	68
IX.	Conclusiones	71
X.	Referencias	72

ABREVIATURAS

Ala	Alanina.
Arg	Arginina.
ATR	Por sus siglas en inglés, reflectancia total atenuada.
Cys	Cisteína.
°C	Grados Celsius.
d	Doblete (en estudios RMN). Señal débil (en estudios IR).
DART	Espectrometría de masas por análisis directo en tiempo real.
DMF	N,N-dimetilformamida.
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetil-sulfóxido deuterado.
Et ₃ N	Trietilamina.
f	señal fuerte en estudios de IR.
Gly	Glicina.
GSH	Glutación.
HCy	Homocisteína.
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno.
IDA	Por sus siglas en inglés, mecanismo de desplazamiento de indicador.
IR	Espectroscopía de infrarrojo.
J	Constante de acoplamiento entre dos núcleos.
m	Multiplete (en estudios de RMN). Señal mediana (en estudios IR).
MeOH	Metanol.
mg	Miligramo.
mL	Mililitro.
mmol	Milimol.
MOPS	ácido 3-(n-morfolino)propanosulfónico.
MS-ESI	Espectrometría de masas por ionización por electrospray.

m/z	relación masa/carga.
Phe	Fenolftaleína.
Ppm	Partes por millón.
Pro	Prolina.
RPE	Resonancia paramagnética electrónica.
Ser	Serina.
s	Singulete.
t	Triplete.
Val	Valina.
δ	Desplazamiento químico en ppm.
λ	Longitud de onda en nm.

Lista de Esquemas

Esquema 1. Mecanismo IDA.	14
Esquema 2. Representación de (a) quimiosensor con subunidad de señalización y sitio de unión, (b) quimiosensor por desplazamiento y (c) quimiodosímetro.	23
Esquema 3. Diagrama de Jablonki: Relajación no radiante vs. Fluorescencia vs. Fosforescencia.	26
Esquema 4. Mecanismos PET por (a) reducción y (b) oxidación.	27
Esquema 5. (a) mecanismo FRET, (b) mecanismo EET.	29
Esquema 6. Mecanismo de la desactivación de fluorescencia para un sistema fluoróforo (F)-apagador(Q).	30
Esquema 7. Síntesis de intermediario.	39
Esquema 8. Síntesis ligante L .	40
Esquema 9. Síntesis del complejo 1 .	41
Esquema 10. Ruta sintética.	43
Esquema 11. Equilibrio alcanzado.	57

Lista de Figuras

Figura 1. Biotioles.	15
Figura 2. Ejemplos representativos de interacciones supramoleculares no covalentes y covalentes dinámicas. Reportado en el artículo de Lei You llamado Recent Advances in Supramolecular Analytical Chemistry Using Optical Sensing ¹ .	19
Figura 3. Estructuras de los 8 sensores para Cys y HCy más recientes de la Tabla 3. Los números que identifican a cada estructura corresponden a los de la Tabla 3.	32
Figura 4. Ligante de piridin-2,6-dicarboxiamida con posibilidad de formar un enlace tipo pinza.	34
Figura 5. Espectro de Masas DART(+) de intermediario BQ5 y estructura química del mismo.	44
Figura 6. Espectro 1H-RMN del intermediario BQ5 en DMSO-d6 a 400 MHz.	45
Figura 7. Expansión de la Figura 6.	45
Figura 8. Espectro de 1H-RMN de L en DMSO-d6 a 400 MHz.	46
Figura 9. Expansión de la Figura 8.	46
Figura 10. Espectro de 13C-RMN de L en DMSO-d6 a 400 MHz.	48
Figura 11. Espectro de Masas ESI(+) del ligante L en metanol y estructura química de la sal de bromuro L .	49
Figura 12. Espectro de IR-ATR de L .	50
Figura 13. Espectro de masas ESI(+) del complejo 1 en metanol y estructura química del complejo [CuLBr] ⁺ .	51

Figura 14. Comparación de espectros IR-ATR de L y 1 . Desaparición de señal en 3408 cm^{-1} referente al grupo amida (-NH).	52
Figura 15. Espectro RPE tomado a 77 K de una solución 0.002 M de 1 en MeOH, frecuencia= 9.04 GHz.	53
Figura 16. Espectros de UV-Vis del complejo 1 preparado in-situ y en forma sintética en agua a pH= 7.4.	56
Figura 17. Titulación espectrofotométrica de L (20 μM) con CuBr_2 en una solución acuosa a pH= 7.4 (10 mM MOPS).	57
Figura 18. Titulación fluorimétrica ($\lambda_{\text{ex}}= 330\text{ nm}$) de L con adiciones crecientes de Cu(II) hasta 1.0 equivalente en agua a pH= 7.4 (10 mM MOPS).	59
Figura 19. Perfil fluorimétrico de la titulación a 530 nm de L en función de $[\text{Cu(II)}]$. La línea sólida corresponde al ajuste de los datos experimentales para un modelo 1:1 usando la ecuación (1).	60
Figura 20. Máximos de absorción a 318 y 400 nm del complejo 1 (20 μM) en agua a pH= 7.4 en función del tiempo.	60
Figura 21. Selectividad fluorescente relativa de 1 con aminoácidos y biotioles en agua a pH= 7.4.	62
Figura 22. Espectros de emisión ($\lambda_{\text{ex}}= 330\text{ nm}$) en 2D de L , 1 y el sistema 1 + HCy en agua a pH= 7.4.	63
Figura 23. Titulación fluorimétrica ($\lambda_{\text{ex}}= 350\text{ nm}$) del complejo 1 (20 μM) por adiciones de HCy.	63
Figura 24. Perfil fluorimétrico a 350 nm, mostrando un ajuste lineal.	64
Figura 25. Espectro de masas ESI(+) del complejo 1 en MeOH tras la adición de 5 eq de HCy para la titulación por RPE.	67
Figura 26. Especies catiónicas encontradas en el análisis por ESI de la mezcla del complejo 1 + HCy.	67
Figura 27. Espectro RPE tomado a 77 K de una solución MeOH de 1 en ausencia y presencia HCy (5 equivalentes), frecuencia= 9.04 GHz, mostrando las soluciones del análisis bajo irradiación de luz UV.	68

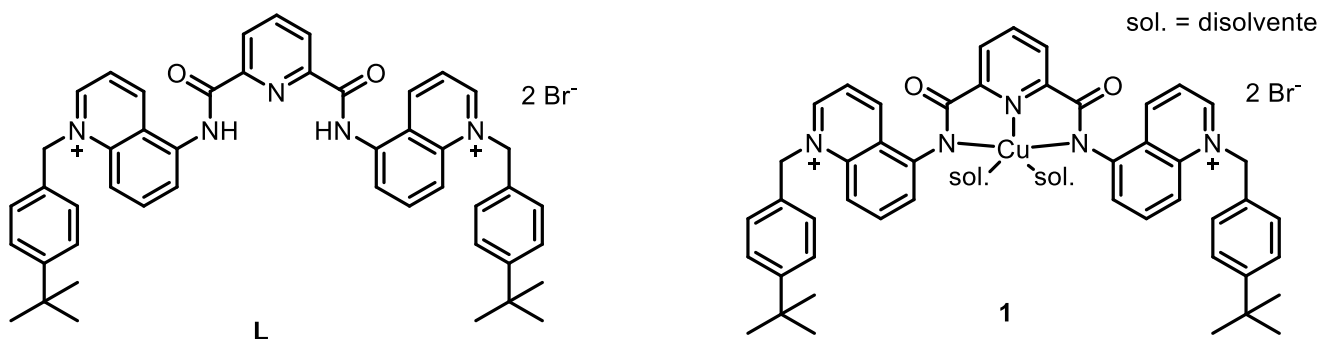
Lista de Imágenes

<i>Imagen 1. Ligante L y complejo 1 en distintos estados de agregación (arriba: sólido, abajo: líquido) y a distintas longitudes de onda del espectro de la luz (izquierda:espectro visible, derecha:UV).</i>	58
<i>Imagen 2. Cambio visual de color de una solución acuosa del complejo 1 (50 mM) a pH= 7.4 por la adición de HCy, Cys y diferentes aminoácidos ([X]= 0.5 mM) bajo la radiación de luz UV (365 nm).</i>	61
<i>Imagen 3. Tiras reveladoras de 1 bajo radiación de UV-Vis mostrando el cambio visual inducido por la presencia de HCy, Cys y diferentes aminoácidos.</i>	69
<i>Imagen 4. Tiras reveladoras de 1 bajo radiación de UV-Vis después de ser inmersas en soluciones acuosas de HCy a diferentes concentraciones (0, 20, 40, 60, 80 y 100 μM).</i>	70
<i>Imagen 5. Tira reveladora con acrónimo de la universidad donde se realizó el proyecto.</i>	70

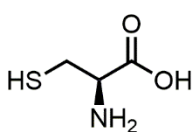
Lista de Tablas

<i>Tabla 1. Constantes de acidez biotioles⁵ y potenciales estándar de reducción⁶ reportados en la literatura.</i>	15
<i>Tabla 2. Concentración de tioles biológicos en plasma sanguíneo (Población adulta).⁹</i>	16
<i>Tabla 3. Comparación de biosensores en medio acuoso para HCy y Cys de los últimos 10 años (orden cronológico del más reciente al menos).</i>	31

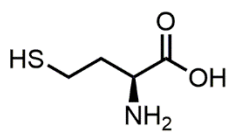
Estructuras Químicas del quimiosensor y analitos estudiados



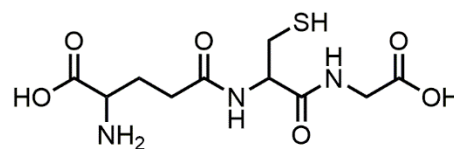
Ligante L y complejo 1.



Cys

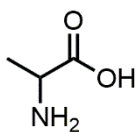


HCy

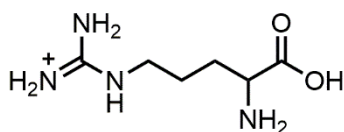


GSH

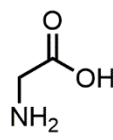
Biotioles.



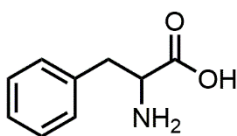
Ala



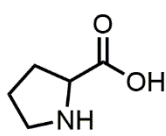
Arg



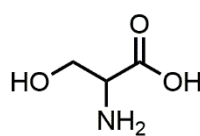
Gly



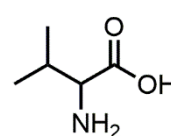
Phe



Pro



Ser



Val

Aminoácidos.

I. Resumen

El presente proyecto de investigación está enmarcado por la Química Supramolecular Analítica, específicamente en el desarrollo de un nuevo complejo luminiscente tipo pinza de Cu(II), y en su estudio espectroscópico como quimiosensor para biotioles. La fórmula mínima de dicho complejo, nombrado **1**, es [Cu(L)Br₂] donde se entiende como **L** al ligante fluorescente tipo pinza derivado de N,N'-Di(5-N''-terbutilbencilquinolinio)pyridin-2,6-dicarboxamida.

La Hcy y Cys son biotioles que desempeñan funciones fisiológicas y patológicas relevantes en los seres vivos. Su detección cuantitativa por receptores artificiales en agua a pH fisiológico es un tema activo en la química supramolecular^{1,2}, siendo éste el objetivo del trabajo.

Las titulaciones del complejo **1** a una concentración 20 micromolar en solución acuosa a pH = 7.4, con Hcy mostraron la activación de la emisión fluorescente verde (530 nm) en un intervalo de concentración sub-micromolar. En contraste, la adición de aminoácidos y GSH mostraron una respuesta débil. Los estudios espectroscópicos y análisis de masas confirman que el complejo **1** funciona como quimiosensor luminiscente tipo "turn-on" y que lo hace por medio de un mecanismo de ensayo de desplazamiento de indicador, donde el ligante **L** funciona como indicador fluorescente y es liberado por la adición de biotioles. El límite de detección estimado para la homocisteína en agua por el complejo **1** es 285±10 nM.

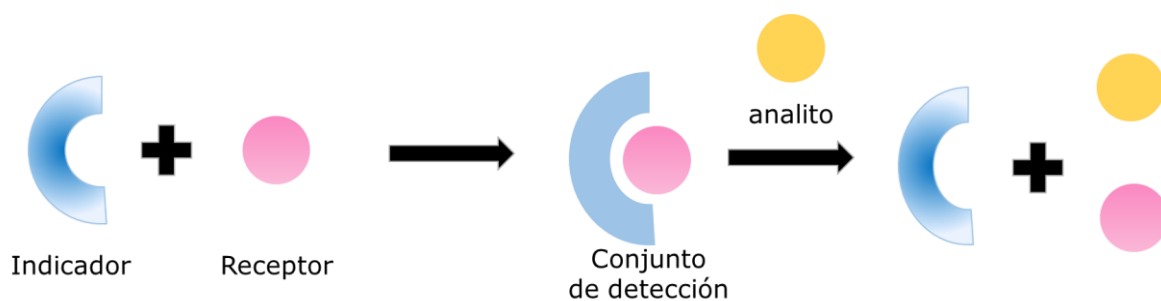
El interés de sistemas prácticos para la identificación de estos analitos nos llevó al desarrollo de tiras reveladoras para Hcy y Cys basadas en la adsorción directa del complejo **1** sobre celulosa. Éstas permiten una detección visual de Hcy en un intervalo de concentración micromolar, bajo una radiación de luz UV, con buena selectividad sobre aminoácidos.

II. Introducción

El presente proyecto de investigación está enmarcado por la Química Supramolecular Analítica, específicamente en el desarrollo de un nuevo complejo luminiscente tipo pinza de Cu(II), y en su estudio espectroscópico como quimiosensor para biotioles. La fórmula mínima de dicho complejo, nombrado **1**, es [Cu(L)Br₂] donde se entiende como **L** al ligante fluorescente tipo pinza derivado de N,N'-Di(5-N''-terbutilbencilquinolinio)pyridin-2,6-dicarboxamida.

Un quimiosensor óptico es una especie química capaz de interactuar con un analito de forma específica, modificando alguna de sus propiedades fotofísicas (absorción, emisión, rendimientos cuánticos y tiempos de vida media). Un reto de la química moderna es el generar receptores artificiales eficientes que mimeticen a los sistemas biológicos "huésped - anfitrión" con alta afinidad y selectividad en un medio competitivo como agua pura o mezclas acuosas^{3,4}. Dentro de este reto, la química supramolecular ha visto como tendencia el diseño de sensores moleculares selectivos con gran afinidad a especies de relevancia biológica debido a sus aplicaciones potenciales en reconocimiento molecular, detección y cuantificación.²

A lo largo de la investigación nos centramos en a cisteína y homocisteína. Estos son compuestos azufrados importantes para la transferencia de grupos metilos en el metabolismo celular. Sus concentraciones son consideradas un factor e indicador de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. Por otra parte el glutatión, es un tripéptido no protéico y el principal oxidante de las células.



Esquema 1. Mecanismo IDA.

El Esquema 1 muestra el concepto de detección de los biotioles bajo un mecanismo de desplazamiento de indicador (*IDA*, por sus siglas en inglés). Para el compuesto a tratar, la detección se basa en la capacidad reductora de los tioles hacia el centro metálico, de Cu(II) a Cu(I). Es bien conocido que la coordinación de centros paramagnéticos, como Cu(II) (d^9), a fluoróforos orgánicos extinguen fuertemente su emisión y se espera que la adición de los ligantes S-donadores, los biotioles, reduzcan al centro metálico y la emisión del ligante sea activada por liberación del fluoróforo.

III. Capítulo 1 Antecedentes

III.1 Propiedades químicas y biológicas de los tioles biológicos

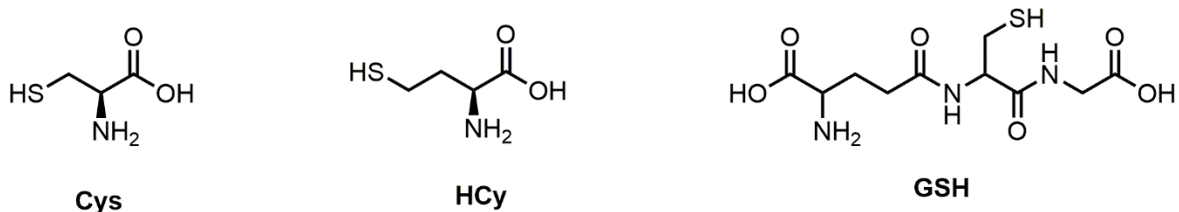


Figura 1. Biotioles.

Biotiol	pKa	E _o
Cys	8.29	-0.245
HCy	9.98	-0.256
GSH	9.27	-0.262

Tabla 1. Constantes de acidez biotioles⁵ y potenciales estándar de reducción⁶ reportados en la literatura.

El grupo tiol está conformado por un átomo de azufre enlazado a un átomo de hidrógeno y al resto de la molécula. El azufre es conocido por ser mejor nucleófilo que el oxígeno, lo que le da a estas moléculas una gran afinidad a los metales de transición por sus propiedades electrodonadoras (orbitales 3s y 3p llenos) y electroceptoras (3d vacío).⁷

Existen tres mercaptomoléculas importantes para los sistemas biológicos: cisteína (Cys), homocisteína (HCy) y glutatión (GSH). Estas tienen un papel importante en la homeostasis redox mediante el equilibrio de tioles reducidos (RSH) y disulfuros oxidados (RSSR), aparte de ser receptores de especies reactivas de oxígeno (ROS). También pueden operar como agentes radioprotectores, indicadores cancerígenos, antitoxinas y antioxidantes.⁸

Normalmente, las concentraciones intracelulares de los tioles son muy bajas como se observa en la Tabla 2, por esto la necesidad de buscar métodos sensibles a concentraciones micromolares.⁸ Es un reto poder discriminar entre los diferentes compuestos dada su similitud estructural y en reactividad.

	Cisteína (μM)	Homocisteína (μM)	Glutati3n (μM)
Femenina	192 - 220	6.2 - 7.2	9.2 - 16.4
Masculina	189 - 235	6.2 - 9.2	8.2 - 17.4

*Tabla 2. Concentraci3n de tioles biol3gicos en plasma sangu3neo (Poblaci3n adulta).*⁹

Los m3todos tradicionales m3s comunes de detecci3n de biotioles son los cromatogr3ficos, la electroforesis capilar, espectrometr3a de masas y electroqu3micas. Una desventaja de las t3cnicas previamente mencionadas es que requieren un pretratamiento de las muestras e instrumentaci3n anal3tica lo cual es tardado y de alto costo.^{2,10}

III.1.1 Ciste3na

La ciste3na (Cys) es polar sin carga e hidrof3lica por la formaci3n de puentes de hidr3geno.² Est3 presente en las prote3nas que participan de manera esencial en los sitios activos de las enzimas como GAPDH o las tirosina fosfatasas.⁷

Niveles altos de ciste3na en el plasma humano est3n relacionado con edema, letargia, da3o de h3gado, entre otras.¹¹ Tambi3n est3 involucrada en mantener funciones metab3licas cr3ticas al actuar como buffer redox intracelular. Es por esto que el cambio en su concentraci3n causa da3o

oxidativo, hematopoyesis, psoriasis, pérdida de leucocitos, desórdenes metabólicos, enfermedades cardiovasculares y Alzheimer.¹²

III.1.2 Homocisteína

Es un intermediario para la formación de otros tioles biológicos, y por lo tanto, sirve como señalizador de distintos desórdenes referentes a los compuestos dentro de la ruta de su metabolismo.¹³ En el ser humano se encuentra tanto reducida como oxidada.

Su concentración se ha controlado antes con ácido fólico, B6 o B12. Sin embargo, un incremento en su concentración en plasma es un factor fuerte e independiente del riesgo del desarrollo de demencia y Alzheimer.¹⁴ También, se han encontrado niveles altos en pacientes en etapas tempranas de fallo crónico renal, donde la concentración de este biotiol sigue aumentando conforme empeora la enfermedad.¹⁵ Del mismo modo, una concentración alta es un factor de riesgo para enfermedades coronarias del corazón.¹⁶

III.1.3 Glutación

El glutación (GSH) es el tiol no proteico más abundante en el organismo. Es un tripéptido soluble en agua compuesto por glutamina, cisteína y glicina. El grupo tiol lo hace un fuerte reductor (antioxidante) por lo que juega un papel importante en la desintoxicación de compuestos electrofílicos y peróxidos vía catálisis con GST. También está presente en la reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, en la regulación de proteínas y en la de genes por el intercambio de disulfuros en los tioles. El glutación puede existir intracelularmente en forma reducida (GSH) u oxidada (GSSG). Una deficiencia de GSH respecto al equilibrio con GSSG pone a la célula en estrés oxidativo lo que se ve en enfermedades como

el cáncer, desordenes neurodegenerativos, Parkinson, fibrosis cística, sida, entre otros.^{6,17}

Por otro lado, trastornos hereditarios en la síntesis y el metabolismo de GSH pueden alterar significativamente la función hepática. En pacientes con infecciones crónicas por hepatitis C, los niveles de GSH se redujeron gravemente en las fracciones hepática y plasmática y también en las células mononucleares de sangre periférica.¹⁸

III.2 Sensores moleculares fluorescentes

Una interacción supramolecular está definida como una interacción intermolecular no-covalente reversible. Por otro lado están las interacciones dinámicas covalentes, en las cuales la formación e intercambio de enlaces covalentes se usa para construir ensamblajes (proceso cooperativo y reversible que consiste en formar estructuras estables y complejas por medio de interacciones espontáneas y no covalentes). Aunque en fuerza de enlace tienen diferentes rangos – en las interacciones no covalentes, 2 – 300 kJ mol⁻¹; en las covalentes, 150 – 540 kJ mol⁻¹¹⁹– lo que nos lleva a pensar que los enlaces covalentes son generalmente más estables que los no covalentes, existen similitudes entre las interacciones covalentes dinámicas y supramoleculares. En primer lugar, desde los puntos de vista cinético y termodinámico, ambos son procesos reversibles y pueden sufrir un intercambio de componentes. En segundo lugar, el equilibrio debe alcanzarse rápidamente, y la escala de tiempo normalmente varía desde algunos segundos hasta minutos.¹ Los sensores pueden jugar con ambas tipo de interacciones y es común que en la literatura no se haga la distinción.

En la Figura 2 se observan los distintos tipos de interacciones supramoleculares previamente discutidos. Desde el punto de vista de la

teoría de enlace de valencia, un compuesto de coordinación está formado por una base de Lewis (ligante) y un ácido de Lewis (metal o ion metálico) que interactúan por medio de un enlace covalente coordinado o dativo. ²⁰

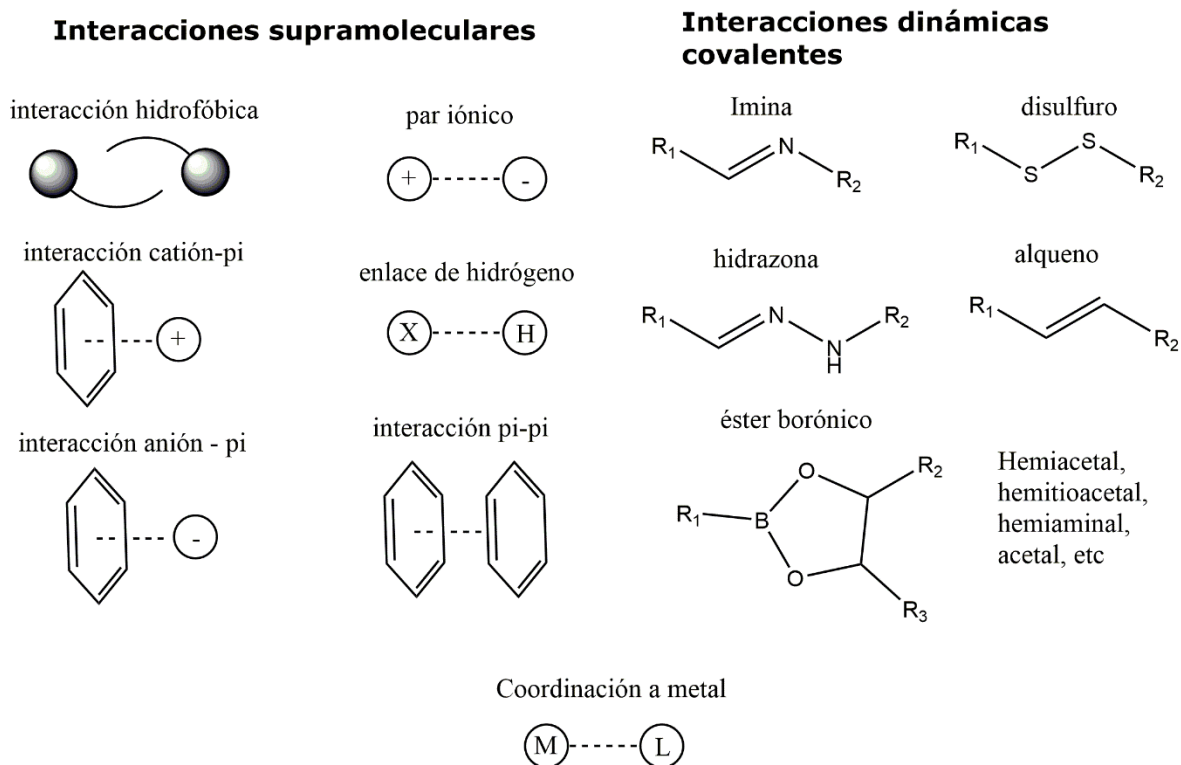


Figura 2. Ejemplos representativos de interacciones supramoleculares no covalentes y covalentes dinámicas. Reportado en el artículo de Lei You llamado *Recent Advances in Supramolecular Analytical Chemistry Using Optical Sensing*¹.

En este contexto, se considera que una molécula "anfitrión" que se une a otra molécula "huésped" puede producir un complejo supramolecular "anfitrión-huésped". El anfitrión es definido como la entidad molecular que posee sitios de unión convergentes (átomos donadores, donadores de enlaces de hidrógeno, etc.) y el huésped como el que posee sitios de unión divergentes (sitios esféricos, cationes metálicos, etc.). A su vez un sitio

de unión es definido como la región del anfitrión o del huésped capaz de participar en una interacción no covalente. ¹⁹

Un sensor, desde el punto de vista de la química analítica, es un dispositivo que hace una medida. En la química supramolecular, la señal es modulada tras la unión del analito particular al receptor de manera selectiva y reversible. Esta rama ha obtenido gran interés por parte de diversos grupos de investigación rápidamente por sus múltiples aplicaciones el ambiental, industrial, composición de gases, medicina, defensa nacional, etc. ^{1,21}

El diseño de un quimiosensor debe incluir aspectos analíticos como:

- Alta selectividad.- Incluso en presencia de otros analitos interferentes y competidores. Ésta tiene relación con las moléculas del disolvente circundantes, el tamaño de molécula a sensar (si presenta impedimento estérico o no), su complementaridad estructural y química.^{10,22}
- Alta sensibilidad.- Capacidad de detectar incluso pequeños cambios en la concentración del analito y traducirlos a un cambio grande en las propiedades fotofísicas. Alta sensibilidad también habla de un límite de detección bajo.
- Respuesta rápida.- Tiempo de espera para que el sensado ocurra. En concentraciones micromolares, en la que normalmente se encuentran los analitos, y la premisa del mundo actual hacen de este factor, determinante.

Además, para un quimiosensor para compuestos biológicos, como lo es el de este trabajo, es necesario tener en cuenta su solubilidad en agua. Solubilidad en agua: Los procesos biológicos ocurren en este medio por lo que es importante tomarlo en cuenta. Al ser el agua un disolvente prótico muy polar, puede estabilizar o desestabilizar la parte orgánica del

compuesto. Esta interacción molécula-solvente puede crear desplazamientos de longitudes de onda y aumento de quenching.²²

III.2.1 Tipo de quimiosensores

Una manera de clasificar a los quimiosensores es por su respuesta analítica. En este contexto, los sensores pueden ser: ópticos, electroquímicos, térmicos, magnéticos, entre otros. Otra forma de clasificarlos es por el analito a identificar. Es así como podemos diferenciar sensores de gases, de iones, moléculas neutras, – para pH –, de humedad y biosensores.²¹

Un quimiosensor óptico consiste de una molécula con sitios de unión y de cromóforos o fluoróforos así como un mecanismo para la comunicación entre ambos. Su unión con analitos produce un cambio en las propiedades ópticas del sensor (absorción o fluorescencia).²³

Dentro de los quimiosensores ópticos se encuentran los cromogénicos que cambian de color luego de asociarse con el analito, por lo tanto, están basados en el cambio de propiedades ópticas dentro del intervalo visible del espectro. Su principal ventaja es que se elimina el uso del equipo analítico costoso pues no precisa de un procesamiento electrónico de la señal. Sin embargo, si se cuenta con el equipo, el procesamiento de la señal lumínica con un equipo espectrofotométrico UV-Vis es útil para obtener datos más precisos y fiables, que no dependan de la subjetividad del operario. En este tipo de sensores, las bandas del espectro de absorción del quimiosensor pueden sufrir desplazamiento batocrómico (a longitudes de onda más largas) o hipocrómico (a longitudes de onda más cortas).

Por otra parte se encuentran los quimiosensores luminiscentes, a los que abordaremos con más detalle en la siguiente sección, que consisten en

dos componentes: 1) un sitio de reconocimiento molecular y 2) la unidad de luminiscencia. El sitio de reconocimiento interactúa selectivamente con el analito por medio de interacciones no covalentes y transduce el fenómeno de reconocimiento molecular en un cambio de las propiedades fotofísicas del quimiosensor. Los cambios en las propiedades fotofísicas del quimiosensor se pueden medir en tiempo real con instrumentos como un espectrofotómetro de absorción UV-Vis o espectrofotómetro de fluorescencia la detección cromogénica o fluorescente respectivamente.²²

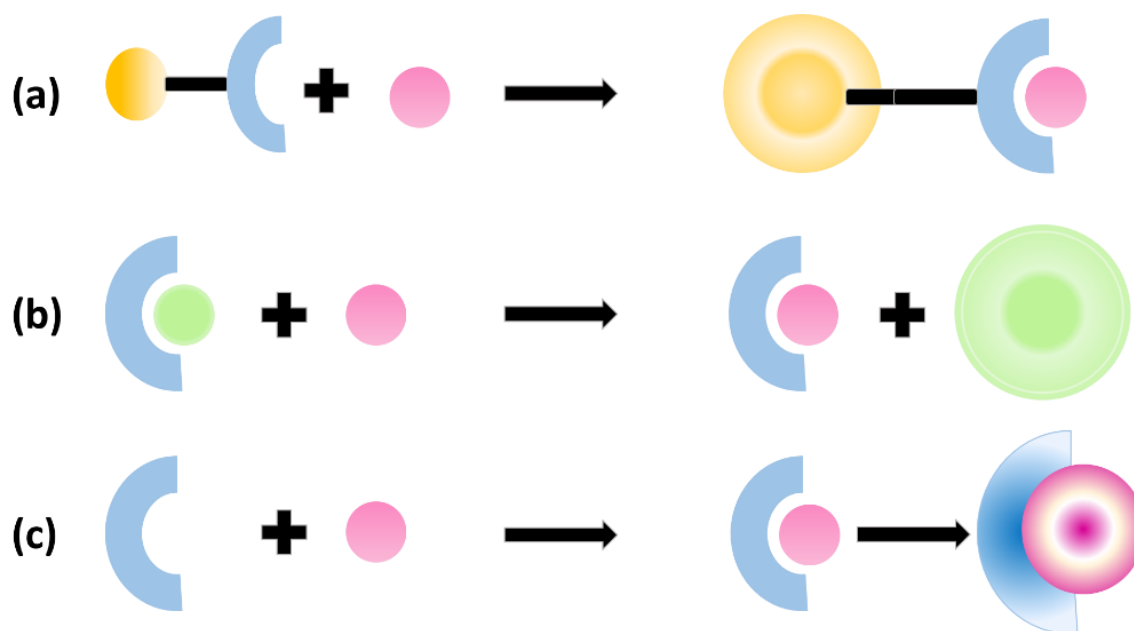
Los quimiosensores fluorescentes son indiscutiblemente los sistemas más eficientes en términos de su alta selectividad, límite de detección bajo, respuesta rápida, detección in situ y facilidad de operación hacia analitos incluso a concentraciones micromolares.²⁴

La intensidad de la fluorescencia puede medirse dadas las longitudes de onda de excitación y emisión. El campo de estudio de quimiosensores fluorescentes lleva existiendo alrededor de 150 años, siendo el primero reportado en la literatura el de F. Goppelsröder en 1867 para la detección de Al(III).²³

III.2.2 Mecanismos de respuesta de los sensores moleculares fluorescentes

Por su diseño molecular podemos catalogar los quimiosensores en intrínsecos y ensamblados. Los sensores intrínsecos se basan en una sola molécula y el sitio de unión es la misma unidad de señalización (fluoróforo y/o cromóforo). Si la unidad de señalización se separa de la unión a través de un conector covalente corto, se trata de quimiosensores conjugados. Estos tipos de sensado se puede rastrear al principio "llave-cerradura" de Emil Fischer que habla sobre la interacción enzima-sustrato. Por su parte, los sensores por desplazamiento (IDA) presentan la competencia entre

un indicador y un analito por la unión de un receptor. En un experimento típico de IDA, un indicador se une primero a un receptor, creando el conjunto de detección. Luego se introduce un analito y el indicador se desplaza del conjunto de detección. Generalmente, los indicadores libres y ligados tienen diferentes propiedades ópticas (colorimétricas o fluorescentes), lo que resulta en un cambio de señal. Por último, en los “quimiosensómetros” no hay formación del complejo supramolecular quimiosensor-analito, sino que el analito reacciona con el sensor, de forma irreversible para crear una molécula nueva con diferentes propiedades ópticas.²⁵ En el Esquema 2 se muestran ejemplos visuales de las últimas 3 categorías de sensores mencionadas.



Esquema 2. Representación de (a) quimiosensor con subunidad de señalización y sitio de unión, (b) quimiosensor por desplazamiento y (c) quimiosensómetro.

En general, se puede concluir que en un sensor óptico, se busca que al detectar el analito, el ionóforo (unidad de reconocimiento responsable de

la selectividad y estabilidad) cambie, ya sea mediante el cambio de longitud de onda, que se apague o prenda.

Existen dos maneras principales de ocupar un metal de transición para el diseño de sensores: la primera consiste en seleccionar un centro metálico con alta afinidad hacia el ligante que apague la luminiscencia de un fragmento orgánico luminiscente, esto con el fin de que cuando el sensor esté en presencia del analito, en este caso tioles, estos secuestren al metal y permita la luminiscencia del fragmento orgánico (común en compuestos de coordinación). La segunda consiste en seleccionar un metal que permita la fosforescencia del compuesto y que sus propiedades fotofísicas puedan ser alteradas por la coordinación del tiol al metal (común en compuestos organometálicos y con la presencia de fosforescencia).^{2,21}

Para este trabajo, se usará el enlace de coordinación en el cual hay un traslape de los orbitales del ligante y del metal, lo que lo hace una interacción más cercana a la covalente. Para compuestos con este tipo de interacción la estabilidad se verá afectada por el concepto de Pearson (blando con blando, duro con duro). Siguiendo esta idea, en los sensores donde se espera que el tiol saque al metal de la esfera de coordinación, el metal debe estar coordinado a bases duras, como aminas, en un principio. Para que de esta forma al interaccionar posteriormente con una base blanda (como los tioles), el metal sea liberado de la parte fluorescente, encendiendo así la luminiscencia.

III.3 Luminiscencia (conceptos, mecanismos, encendido y extinción)

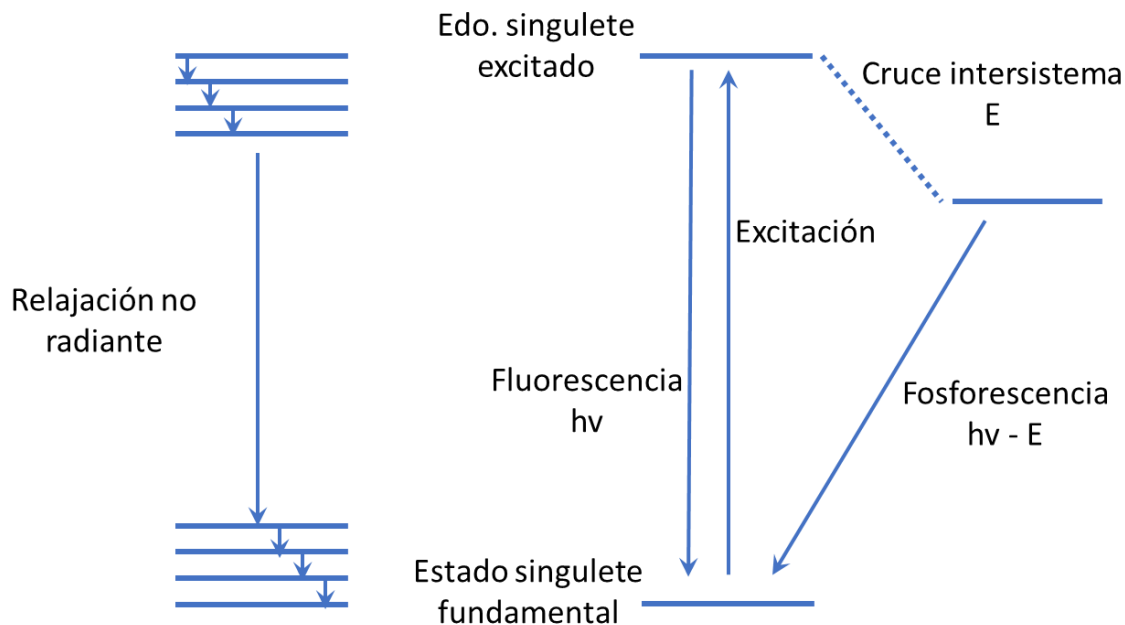
La luminiscencia es definida como la emisión espontánea de radiación de una especie excitada electrónica o vibracionalmente que se encuentra en

equilibrio térmico con su entorno. Si la excitación es provocada mediante la absorción de luz ($h\nu$) el fenómeno se conoce como fotoluminiscencia. Después de la absorción de un fotón externo y que el electrón es promovido a un estado de mayor energía, este puede volver a su estado basal mediante la relajación vibracional al nivel electrónico original o uno distinto, o bien, puede emitir un fotón con la misma multiplicidad de espín (fluorescencia) o diferente multiplicidad de espín (fosforescencia). El diagrama de Jablonski, Esquema 3, es una buena representación de este fenómeno.²⁶

Durante la fluorescencia se emite un fotón con la relajación de un singulete excitado de baja energía al estado fundamental.²³ El fluoróforo, puede entonces presentar cambios conformacionales y está sujeto a múltiples interacciones con el medio ambiente molecular.²⁶

En la fosforescencia se emite un fotón mediante la relajación del estado triplete hacia el estado fundamental, después del cruce intersistema. Este proceso depende del acomplamiento entre los dos niveles excitados y se ve favorecido cuando la diferencia de energía entre éstos es pequeña y el tiempo de vida del singulete es relativamente largo.^{23,26}

La energía de emisión de estos dos procesos es menor que la de absorción debido a la energía que se disipa durante el tiempo de vida del estado excitado, es decir la longitud de emisión es mayor que la de excitación. Esto es conocido como la regla de Stokes.^{23,26,27}



Esquema 3. Diagrama de Jablonki: Relajación no radiante vs. Fluorescencia vs. Fosforescencia.

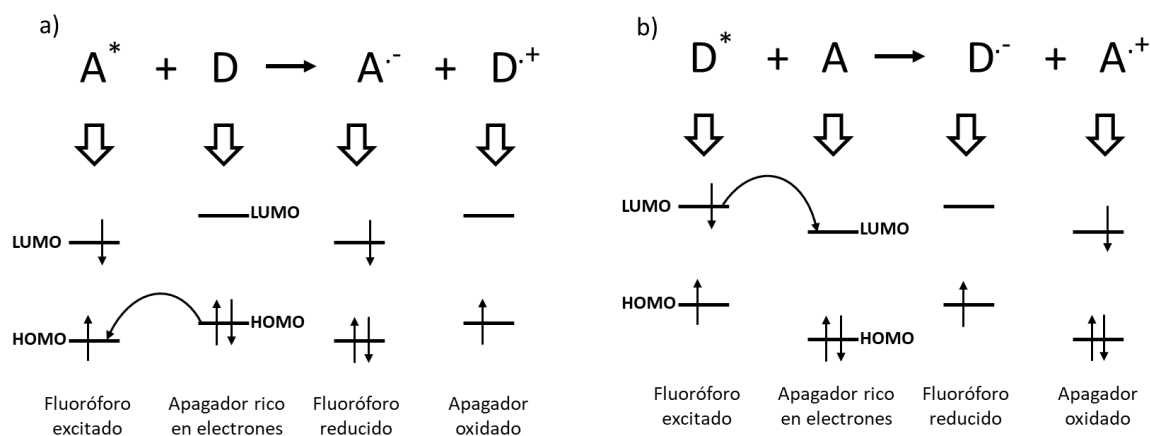
Mientras menor sea la diferencia energética entre el estado basal y el estado excitado de menor energía mayor será el traslape de los niveles vibracionales y por lo tanto menor será la eficiencia de la emisión (Regla del band gap).²⁸

III.3.1 Mecanismos fotofísicos para el sensado

Se sabe que cuando alguna especie huésped se une al receptor, las características fotofísicas se modifican a través de varios mecanismos y dichos cambios proveen de una señal para detectar la unión. Dentro de los posibles mecanismos están: 1. la transferencia electrónica fotoinducida (PET), 2. transferencia de carga intermolecular (ICT), 3. transferencia de carga metal ligante (MLCT), 4. transferencia torcida de carga intramolecular (TICT), 5. transferencia de energía por resonancia

de fluorescencia (FRET), 6. transferencia de energía electrónica (EET) y 7. la formación de excímeros/exciplej. También, como mecanismos más recientes podemos ver la emisión inducida por agregados (AIE) y transferencia intramolecular de protón en estado excitado (ESIPT).²⁹

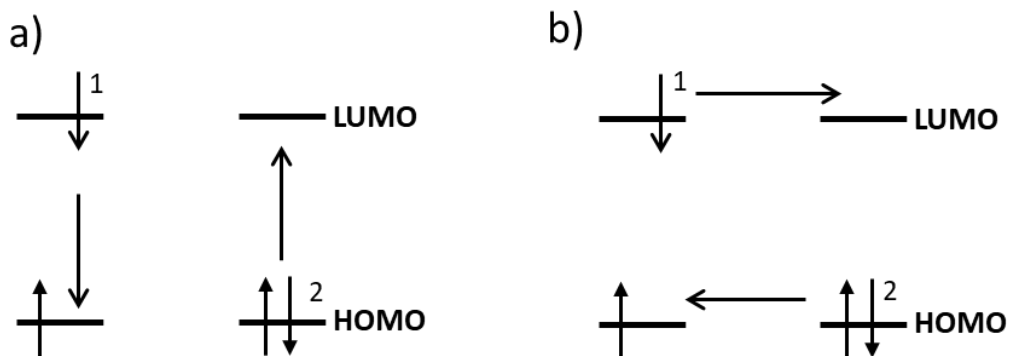
El PET, como se ve en el Esquema 4, es un mecanismo que se basa en la transferencia electrónica entre una molécula en estado electrónico excitado – que actúa como aceptor de electrones – y una especie que actúa como donador y se puede explicar desde la teoría de fronteras de orbitales moleculares. En ausencia de un analito, el orbital HOMO del donador, que tiene mayor energía que el HOMO del aceptor, puede transferir un electrón al orbital HOMO del aceptor después de la excitación y antes de la emisión, tal transferencia disminuye considerablemente la fluorescencia del quimiosensor. Cuando el analito se enlaza, el nivel de energía del orbital HOMO del donador disminuye dificultando la transferencia del electrón al orbital HOMO del aceptor provocando que la fluorescencia aumente ya que se suprime el mecanismo.¹



Esquema 4. Mecanismos PET por (a) reducción y (b) oxidación.

El ICT también es una transferencia electrónica y ocurre entre moléculas que tienen grupos donador-aceptor π unido mediante un enlace covalente. Cuando estas moléculas son excitadas por radiación electromagnética el grupo π -donador cede un electrón al grupo π -aceptor produciendo estados de carga polarizada. Esto logra cambios que se pueden ver reflejados en las intensidades fluorescentes o en las longitudes de onda de ya sus espectros de emisión o de excitación. El espectro de emisión del quimiosensor presenta dos bandas de fluorescencia, la primera es conocida como banda de fluorescencia normal y se da por el desplazamiento de Stokes y la segunda banda aparece a una longitud de onda mayor que la anterior y se atribuye al estado excitado altamente polar ICT. Este fenómeno depende de la energía del dipolo formado y de la energía de activación del proceso y se ve afectado por la polaridad del disolvente donde a mayor viscosidad, mayor la intensidad de la banda. Si la intensidad de la banda no cambia y el quimiosensor tiene grupos muy electroattractivos o donadores, al interactuar con el analito se reduce la conjugación electrónica ocasionando que el espectro de absorción se desplace hacia el azul y la absorbancia molar disminuya, pero cuando un analito se une al grupo aceptor de electrones del sistema, el espectro de absorción se desplaza hacia el rojo y la absorbancia molar incrementa.²⁶

Para la transferencia de energía, pueden ocurrir dos mecanismos, representados en el Esquema 5. El primero es EET, también conocido como Dexter, que requiere una distancia entre el donador y receptor menor a 10 Å. Por otra parte, entre 10 y 100 Å ocurre el mecanismo de FRET donde la banda de absorción del fluoróforo necesita presentar una sobreposición con la banda de emisión del donante; el fluoróforo aceptor presenta excitación y fluorescencia resultante es de mayor longitud de onda.²⁹



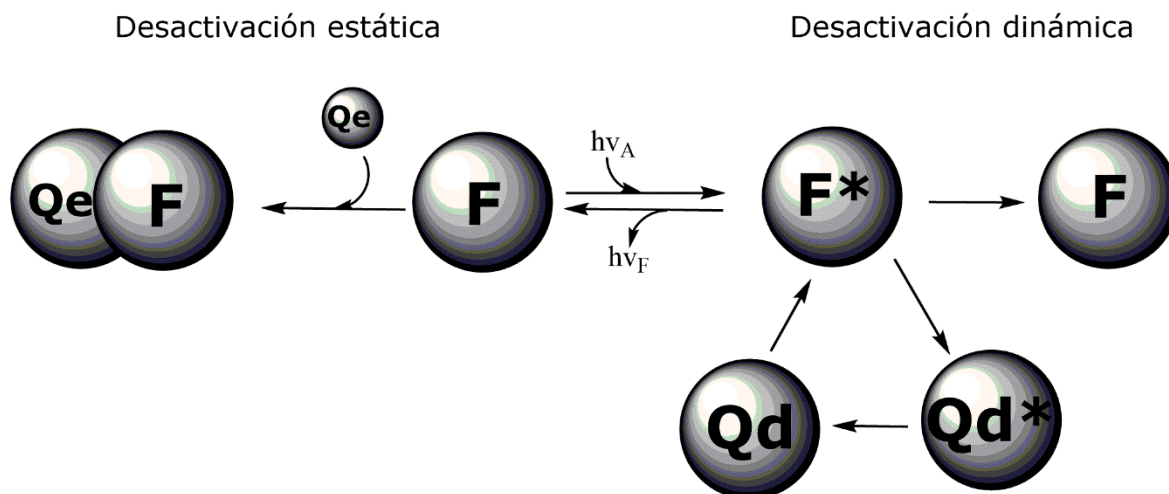
Esquema 5. (a) mecanismo FRET, (b) mecanismo EET.

Si en un proceso de absorción o emisión los orbitales inicial y final se encuentran separados en el espacio, la promoción del electrón es acompañada de un cambio en el momento dipolar de la molécula, generando el fenómeno de transferencia de carga³⁰. Dichas transiciones pueden ocurrir entre zonas dentro de un mismo ligante (ILCT) o dos ligantes diferentes (LLCT), dentro del mismo metal (IMCT), o entre orbitales del metal y del ligante (MLCT, LMCT). Usualmente las transiciones que se encuentran a menores longitudes de onda son las ILCT, debido a que la separación entre niveles energéticos es grande por lo que se requiere mayor energía para promover un electrón entre los dos estados. De acuerdo con el mismo razonamiento, la energía de dichas transiciones se suele encontrar en el orden $ILCT > MLCT \approx LMCT > IMCT$.

III.3.2 Desactivación de luminiscencia (Quenching)

La desactivación de la luminiscencia es el fenómeno por el cual la intensidad de emisión de un fluoróforo disminuye o se extingue. Esta disminución es debida a la interferencia de una segunda sustancia llamada apagador o quencher, la cual, dependiendo del mecanismo por el cual

disipa la energía electrónica del fluoróforo, puede clasificarse como desactivación dinámica y desactivación estática. En el Esquema 6 se observa el mecanismo de ambos.



Esquema 6. Mecanismo de la desactivación de fluorescencia para un sistema fluoróforo (F)-apagador(Q).

III.4 Quimiosensores para cisteína, homocisteína y glutatión

La Tabla 3 muestra una comparación de parámetros analíticos (límites de detección, respuesta fluorescente, longitud de emisión, sensibilidad) de sensores reportados en los últimos 10 años. La Figura 3, se basa en dicha tabla y presenta las estructuras químicas de los 8 quimiosensores moleculares fluorescentes para biotioles más recientes.

Sensor de biotioles	Respuesta fluorescente	Límite de detección		Solubilidad	λ_{em} (nm)	Sensibilidad ^b	Ref.
		Cys	HCy				
1	De encendido	73.0 nM	a -	H ₂ O	632	Alta	31
2	De encendido, colorimétrica	48.9 nM	a -	H ₂ O	670	Alta	32
3	De encendido	240 nM	a -	H ₂ O	610	Alta	11
4	De apagado	5.0 μ M	a -	H ₂ O	612	Media	33
5	De encendido	580 nM	a -	H ₂ O	545	Alta	34
6	De apagado	2.12 nM	a -	H ₂ O	420	Alta	35
7	De apagado	35.0 nM	a -	H ₂ O	580	Alta	36
8	De encendido	330 nM	a -	H ₂ O	520	Alta	37
9	De encendido, colorimétrica	10.0 nM	a -	H ₂ O	575	Alta	38
10	De encendido	2.3 μ M	4.1 μ M	H ₂ O	517	Media	39
11	De encendido	25 nM	a -	H ₂ O	533	Alta	40
12	De encendido	29.0 nM	a -	H ₂ O	406	Alta	12
13	De apagado	50 nM	a -	H ₂ O	525	Alta	41
14	De apagado	6.2 nM	a -	H ₂ O	605	Alta	42
15	De apagado	100.0 nM	400.0 nM	H ₂ O	615	Alta	43
16	De encendido, colorimétrica	229 nM	227 nM	H ₂ O	605	Alta	44
17	De encendido, colorimétrica	200 nM	a -	H ₂ O	621	Alta	45
18	De encendido	20.1 nM	a -	H ₂ O	456	Alta	46

Tabla 3. Comparación de biosensores en medio acuoso para HCy y Cys de los últimos 10 años (orden cronológico del más reciente al menos).

^a Límites de detección no calculado.

^b Parámetro subjetivo donde alta refiere a un límite de detección en la magnitud concentración 10^{-9} y media en 10^{-6} .

De la tabla se puede analizar que el estudio de sensores para HCy no ha tenido el auge que los sensores para Cys. Esto da un buen espacio para que el trabajo hecho en este escrito sea novedoso y relevante.

Por otro lado, al analizar las estructuras usadas recientemente como sensores de biotioles, es interesante recalcar la variedad de compuestos. Es imposible categorizar a dichos sensores dentro del mismo grupo estructuralmente, a pesar de que vemos la presencia de grupos conjugados como un factor en común. Esto habla de la magnitud de la rama de investigación.

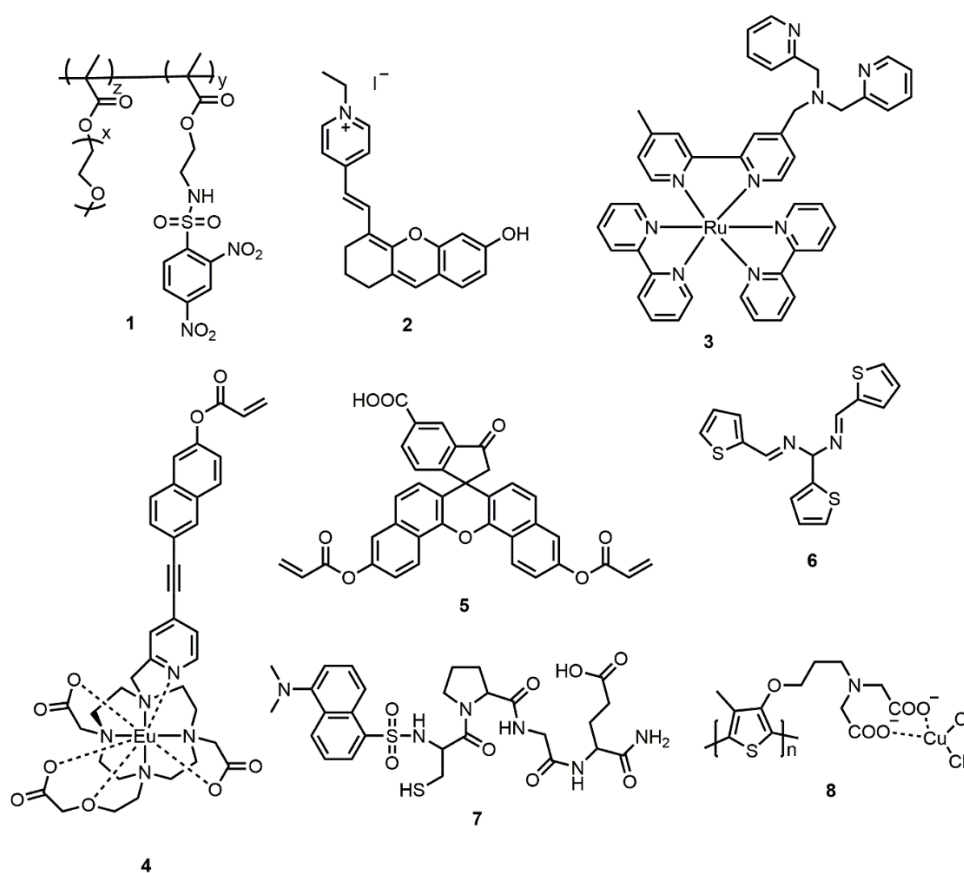


Figura 3. Estructuras de los 8 sensores para Cys y HCy más recientes de la Tabla 3. Los números que identifican a cada estructura corresponden a los de la Tabla 3.

III.5 Química del Cu(II)

En este proyecto la detección fluorescente se basa en la capacidad reductora de los tioles hacia el centro metálico de Cu(II) a Cu(I). Es bien conocido que la coordinación de centros paramagnéticos (con electrones desapareados) como Cu(II) ($3d^9$) a fluoróforos orgánicos extinguen fuertemente su emisión y que la adición de los ligantes S-donadores, como los tioles, pueden reducir al centro metálico a Cu(I).

Para la teoría ácido-base duro-blando de Pearson, el Cu(I) es considerado un ácido suave, mientras que el Cu(II) es una base dura fronteriza. Esto crea diferencias en reactividad al estar en contacto con otras especies.

En la química del Cu(II) se observan distorsiones de Jahn-Teller aunque el grado de distorsión varía considerablemente entre especies. Las distorsiones Jahn-Teller generan mayor estabilidad en sistemas no lineales con un estado basal electrónicamente degenerado al eliminar esta degeneración, creando una distorsión en su geometría nuclear.

Se conocen complejos de Cu(II) tetraédricos, planos cuadrados, bipirámides-trigonales, piramidales de base cuadrada y octaédricos.⁴⁷ En los complejos que contienen ligandos dadores a través de N y O son muy comunes y predominan los números de coordinación 4,5 y 6. Las disoluciones acuosas de Cu(II) contienen su respectivo ion hexahidratado $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$.⁴⁸

III.6 Complejos tipo pinza

Los ligantes tipo pinza son agentes quelantes que se unen fuertemente por tres sitios coplanares adyacentes en una disposición meridional. La inflexibilidad de la interacción pinza-metal confiere una alta estabilidad térmica en los complejos resultantes. Los sustituyentes orgánicos definen una bolsa hidrofóbica alrededor del sitio de coordinación reactiva. Las

aplicaciones estequiométricas y catalíticas de los complejos de pinzas se han estudiado a un ritmo acelerado desde mediados de los años setenta, conteniendo la mayoría fosfinas.⁴⁹ En la última década se ha abordado con éxito la combinación adecuada de ligandos orgánicos fluorescentes y/o cromogénicos tipo pinza con centros metálicos de transición, que contienen sitios de coordinación disponibles, capaces de unirse selectivamente con especies iónicas químicas, biológicas y ambientales como haluros, oxianiones, nucleótidos, proteínas y el ADN en medios competitivos.⁵⁰

El ligante NNN tipo pinza es un donador de 6 electrones al mismo tiempo por parte de tres átomos de nitrógeno distintos que puede crear un sistema quelante con varios metales catiónicos en una geometría cuasi planar.

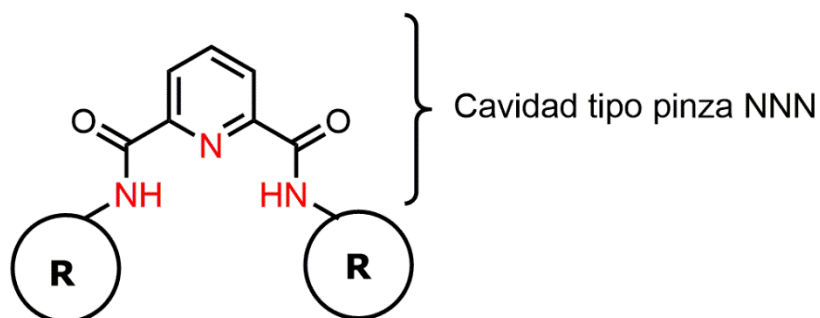


Figura 4. Ligante de piridin-2,6-dicarboxiamida con posibilidad de formar un enlace tipo pinza.

Las moléculas basadas en el fragmento piridin-2,6-dicarboxiamida han tenido notoriedad por varias razones. Crean una cavidad de pinza NNN, como se muestra en la Figura 4 a través de dos anillos quelato de cinco miembros entre grupos n-piridina y n-amida. También, la participación de dos n-amidas donantes de grupos σ aniónicos no solo da como resultado la formación de complejos de coordinación estables, sino que también

dota a tales ligantes hacia la estabilización de iones metálicos en sus estados de oxidación superiores. Por último, está la posibilidad de introducir una variedad de grupos funcional adjuntos (R) y / o grupos protectores (R) en los átomos de la n-amida lo cual genera una gran cantidad de ligantes interesantes que pueden a su vez crear un entorno de coordinación estéricamente difícil o un ambiente de coordinación secundario adyacente al ion metálico coordinado dentro de la cavidad de pinza NNN.⁵¹

La orientación óptima es cuando el grupo R está coplanar con la piridina dicarboxiamida. En pH menores a 7, los receptores están en forma dicatiónica no disociada (sus pK_as son más altos que esto) por lo que se busca trabajar con un pH menores o cercanos a este.⁴

El grupo del Dr. Dorazco ha trabajado con variaciones de este ligante cambiando el sustituyente del grupo R. Ha reportado recientemente quimiosensores para aniones inorgánicos, nucleótidos y monosacáridos basados en piridin-2,6-dicarboxamida con grupos quinolinio como unidades luminiscentes.⁴ Han demostrado que la afinidad por ciertos iones y su selectividad no cambian al usarse en fase acuosa así como optimizado su función al modificar los grupos aledaños.⁴

IV. Hipótesis

La detección cuantitativa y selectiva de homocisteína y cisteína en agua a pH fisiológico y en tiras reveladoras puede ser llevada a cabo por un complejo de Cu(II) con un ligante fluorescente soluble en agua bajo un ensayo de desplazamiento de indicador fluorescente.

V. Objetivo General

El proyecto tiene como objetivo principal el diseño y la síntesis de un nuevo quimiosensor óptico con formula general $[Cu(L)Br_2]$, (L = ligante fluorescente tipo pinza derivado de N,N'-Di(5-N''-terbultilbencilquinolinio)pyridin-2,6-dicarboxamida) y estudios de detección de biotioles por espectroscopia de fluorescencia en un medio acuoso y el estudio de aminoácidos como interferentes de éstos.

VI. Objetivos Particulares

- Sintetizar y caracterizar un nuevo ligante dicatiónico, **L**, de tipo NNN, derivado del fragmento piridin-2,6-dicarboxamida y funcionalizado con grupos quinolinios como unidades fluorescentes.
- Estudiar por espectrofotometría, espectroscopia de fluorescencia y espectrometría de masas la complejación del nuevo ligante **L** con iones Cu(II) en un medio acuoso a pH fisiológico.
- Sintetizar y caracterizar un nuevo complejo de Cu(II), sensor **1**, con el ligante **L** derivado de piridin-2,6-dicarboxamida (NNN) propuesto.
- Estudiar la estabilidad del nuevo complejo, **1**, en medios acuosos neutros por espectrofotometría y espectroscopía de emisión fluorescente.

- Estudiar el nuevo complejo de Cu(II) como un quimiosensor fluorescente para tioles biológicos (cisteína, homocisteína y glutatión) a través de titulaciones espectroscópicas de UV-vis y fluorescencia.
- Estudiar los posibles interferentes, aminoácidos varios, con respecto al sensor **1**.
- Comprobar la correcta operación del sensor **1** en medios acuosos y en un intervalo de pH fisiológico.
- Determinar los límites de detección de los tioles biológicos más afines al complejo de Cu(II).
- Desarrollar tiras reveladoras para biotioles a través de la adsorción del complejo en celulosa, determinar su selectividad y su límite de detección visual.

VII. Metodología

VII.1 Disolventes y reactivos

Los reactivos y disolventes utilizados fueron adquiridos de fuentes comerciales (Sigma-Aldrich, Tecsiquim), se usaron tal y como se recibieron, excepto en los casos que se indique el método de purificación. La mayoría de los disolventes son anhidros o grado HPLC, sin embargo, algunos fueron secados por técnicas convencionales.

VII.2 Instrumentación

Los espectros de IR se obtuvieron usando un equipo Perkin-Elmer Attenuated Total Reflectance FT-Spectrometer (ATR); en todos los espectros obtenidos se muestra el número de onda (cm^{-1}) contra el porcentaje de transmitancia (T%).

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron utilizando Trimetilsilano como referencia. Equipo Bruker Advanced 400MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.

Los espectros de masas se obtuvieron usando un espectrómetro de masas marca JEOL modelo JMS-T100LC mediante los modos de ionización ESI y DART+.

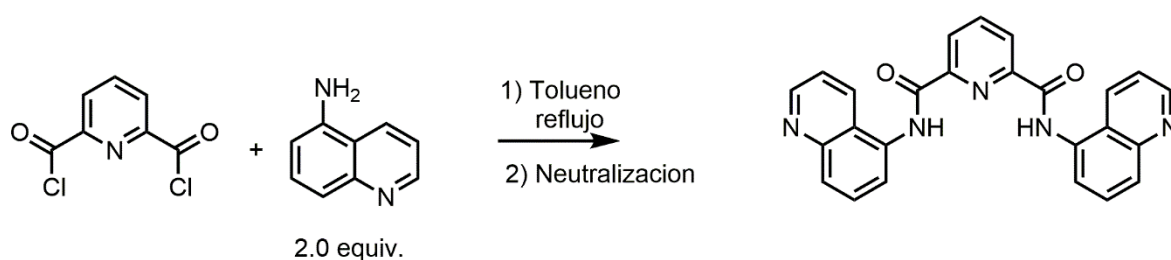
Los espectros de RPE se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro de resonancia paramagnética electrónica marca JEOL modelo JES-TE300 con 1.4 T de campo magnético en la banda X, posibilidad de variación de temperatura entre ambiente y 6.5K así como una lámpara de luz UV para irradiación in situ.

Los experimentos por espectrofotometría de UV-VIS se hicieron con un espectrofotómetro de arreglo de diodos, Agilent modelo Cary 100, con una precisión de longitud de onda $< \pm 0.5\text{nm}$ y una precisión fotométrica $< \pm 0.005\text{A}$. Se utilizaron celdas de cuarzo (Paso óptico [1cm], Volumen [3mL]).

Los experimentos por espectroscopía de fluorescencia se realizaron con un espectrofluorímetro Agilent Varian modelo Cary Eclipse (ventana espectral de 200 a 800nm), con una exactitud de longitud de onda de ± 0.5 nm y una relación señal ruido 550/1. Las celdas utilizadas son de cuarzo (Paso óptico [1cm], Volumen [3mL]).

VII.3 Síntesis de compuestos

VII.3.1 BQ5 (intermediario)



Esquema 7. Síntesis de intermediario.

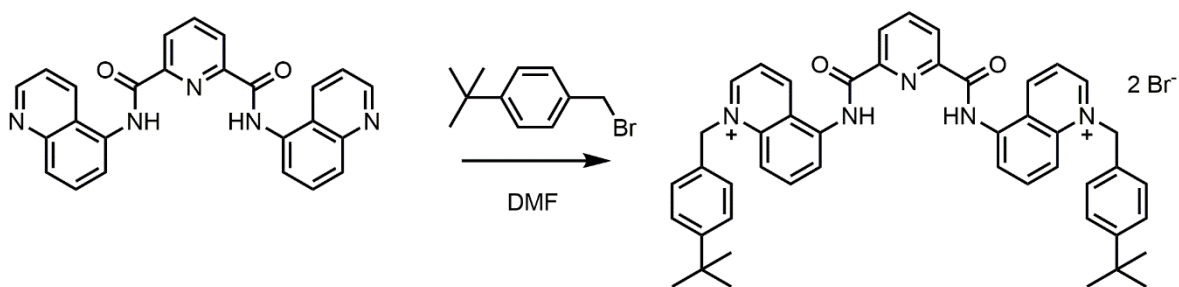
Como primer paso se obtuvo el precursor de ligante a partir de la reacción estequiométrica de 103.12 mg de 5-aminoquinolina (0.71 mmol) con 72.95 mg de dicloruro de piridin-2,6-dicarbonilo (0.35 mmol) en tolueno anhidro (~ 20 mL) dentro de un matraz de fondo redondo a reflujo por 24 h a 90 °C. Se observó un cambio de coloración instantáneo pasando de dos sólidos blancos a una solución naranja intenso. Después del tiempo de reacción, el precipitado obtenido se filtró al vacío. El mismo precipitado fue después neutralizado con una solución saturada de bicarbonato de sodio. Se observó un cambio de coloración a rosa claro, el cual se filtró al vacío. Este producto fue disuelto en metanol caliente y resolidificado.

Rendimiento 98% (143.6 mg).

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.47 (s, 2H), 8.98-8.96 (dd; J 4.2, 1.6 Hz; 2H), 8.53- 8.51 (d, J 8.6 Hz, 2H), 8.48-8.46 (d, J 7.6 Hz, 2H); 8.39-8.36 (t, J 8.6, 6.9 Hz, 1H), 8.03-8.01 (d, J 8.3 Hz, 2H), 7.88-7.84 (t, J 5.7 Hz, 2H), 7.81-7.79 (dd, 7.4 Hz, 2H), 7.65-7.62 (dd, J 8.6, 4.2 Hz, 2H).

DART+ MS: m/z: 420 [BQ5]⁺.

VII.3.2 Ligante L



Esquema 8. Síntesis ligante L.

Tras confirmar la aparición del BQ5, se procedió a su cuaternización para obtener el ligante. En un matraz de fondo redondo, se añadió 120 mg de BQ5 (0.28 mmol) que se disolvió con 3 mL de DMF seco. Posteriormente, se añadió 116 μ L de bromuro de 4-tertbutil-bencilo (0.63mmol) previamente diluido en acetona. A esta mezcla se le burbujeó nitrógeno y se puso en un baño de sal a 80°C. Después de aproximadamente media hora se empezó a ver un cambio de coloración a un rojo ladrillo. Así se mantuvo por 48 h.

Terminado el tiempo de reacción, se eliminó el DMF presente en el matraz con el rotavapor a alto vacío. Se realizaron lavados fríos de hexano-acetona (60:40). El sólido, color naranja grisáceo, se filtró y secó al vacío.

Parte del producto fue disuelto en metanol para la posible formación de cristales.

Rendimiento 95% (189.4 mg).

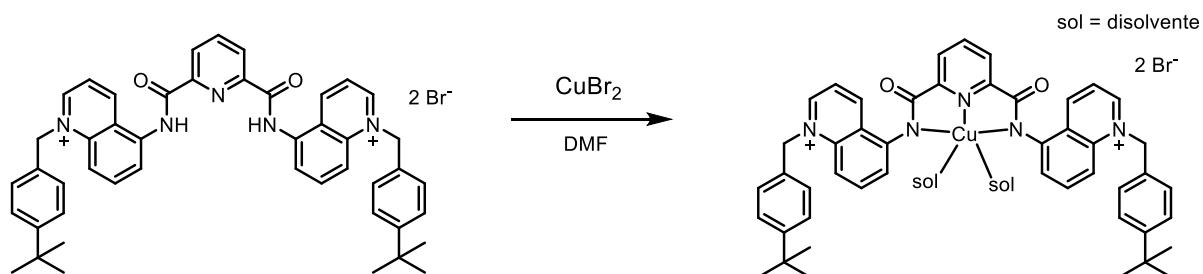
IR-ATR (cm^{-1}): $\tilde{\nu}$ = 3408.1(d), 1680.74(m), 1508.79(f), 792.86(f), 503.18(d).

MS-ESI(+): m/z: 793.8 [**L**] $^{+}$.

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.79 (s, 1H), 9.78 (d, J 5.2 Hz, 2H), 9.57 (d, J 8.5 Hz, 2H), 8.54 (d, J 1.5 Hz, 2H), 8.51 (s, 2H), 8.46 (m, 1H), 8.33 (m, 2H), 8.22 (d, J 7.5 Hz, 2H), 7.41 (d, J 8.46 Hz, 2H), 7.34 (d, J 8.4 Hz, 2H), 6.38 (s, 2H), 1.23 (s, 18H).

^{13}C RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.4, 151.92, 151.13, 148.48, 145.21, 138.57, 136.31, 135.95, 131.36, 127.48, 126.62, 126.59, 126.36, 122.24, 117.90, 60.56, 34.83, 31.41.

VII.3.3 Complejo 1



Esquema 9. Síntesis del complejo **1**.

Para la obtención del compuesto de coordinación metal-ligante, se disolvieron 120 mg de **L** (0.17 mmol) en 3 mL de DMF anhidro. Posteriormente se adicionaron 41 mg de CuBr_2 (0.19 mmol). Al adicionar dicha sal se observó un cambio de coloración inmediato a una solución verde oscuro. Se añadieron 47 μL de Et_3N (0.34 mmol) en una solución

del 25% en MeOH para favorecer la desprotonación de las amidas. La mezcla fue calentada en un baño de sal a 40°C y dejada en agitación por 48 h.

Pasado ese tiempo, se llevó la mezcla de reacción al rotavapor. Se eliminó primero el MeOH restante y se procedió a la eliminación del DMF. Al ver que lo que quedaba era de consistencia viscosa, se procedió a redissolver en acetona (para formar una mezcla de disolventes isotrópicos que favorecieran la eliminación del DMF) y volver a llevar al rotavapor. El producto fue raspado del matraz y puesto en un baño de éter frío. El resultado fue filtrado por gravedad y dejado a secar en vacío.

Rendimiento 78% (123.8 mg).

IR-ATR (cm^{-1}): $\tilde{\nu} = 3443.1(\text{d}), 2960.1(\text{m}), 1359.5(\text{f}), 790.3 (\text{f})$.

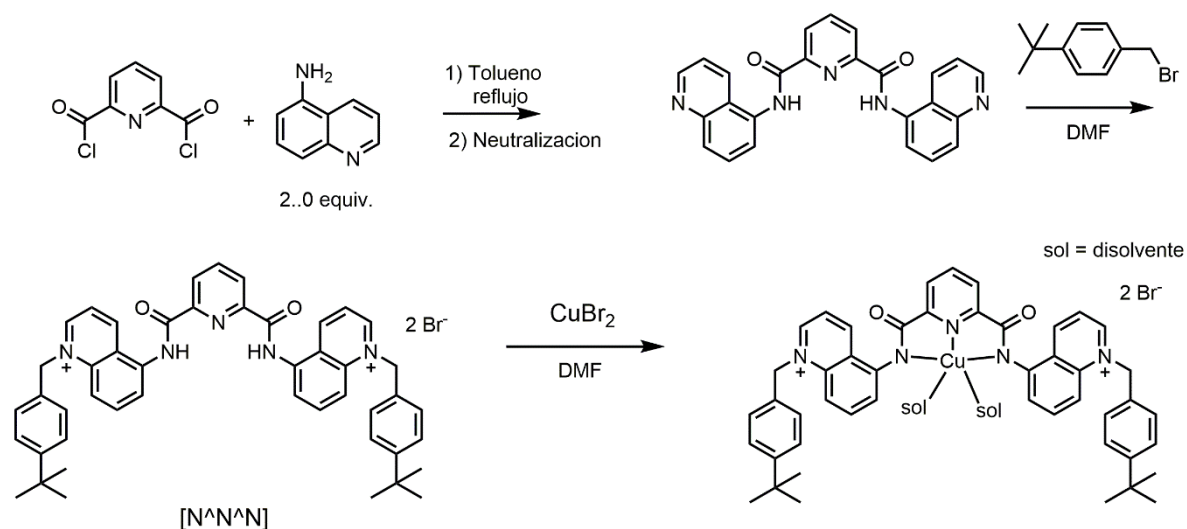
ESI+ MS: m/z : 855 $[\text{CuLBr}]^+$.

VIII. Resultados

El capítulo describe los resultados más importantes de este trabajo, enfocados en la síntesis del quimiosensor de Cu(II), su caracterización espectroscópica, los estudios de detección de biotioles en solución por diferentes técnicas espectroscópicas y el desarrollo de tiras reveladoras para homocisteína y cisteína.

VIII.1 Síntesis química

El complejo de Cu(II), **1** fue sintetizado siguiendo el procedimiento de las tres reacciones en el Esquema 10. El intermediario BQ5 y **L** fueron caracterizados usando ^1H , ^{13}C RMN, IR-ATR, DART+ y MS-ESI(+). Estos productos son puros de acuerdo con sus espectros de ^1H RMN, los cuales muestran un número de señales consistentes con estructuras químicas.



Esquema 10. Ruta sintética.

El intermediario químico BQ5 fue obtenido con un rendimiento del 98 % por la reacción entre dicloruro de piridin-2,6-dicarbonilo con y 2.0 equiv. de 5-aminoquinolina en tolueno seco, su espectro con la asignación de las

señales se muestra en la Figura 6. También se realizó un DART(+) donde la señal más intensa 420 m/z se puede asignar a $[BQ5]^+$ ($C_{25}H_{17}N_5O_2$, 419.44 m/z) (Figura 5).

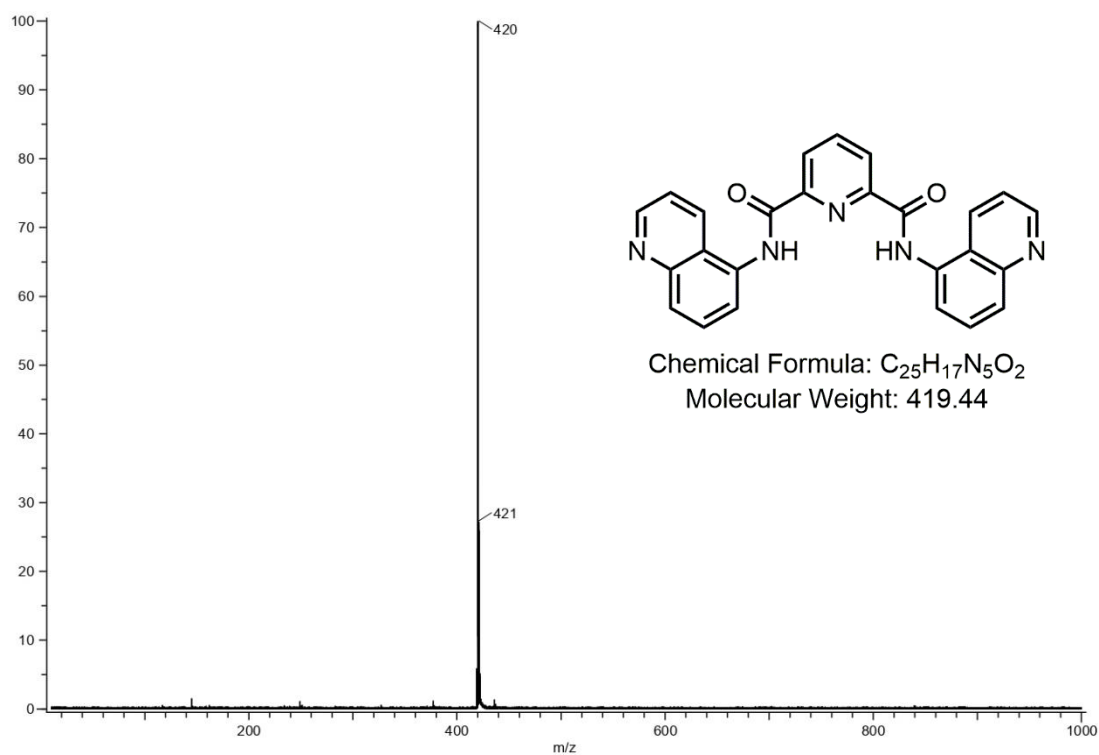


Figura 5. Espectro de Masas DART(+) de intermediario BQ5 y estructura química del mismo.

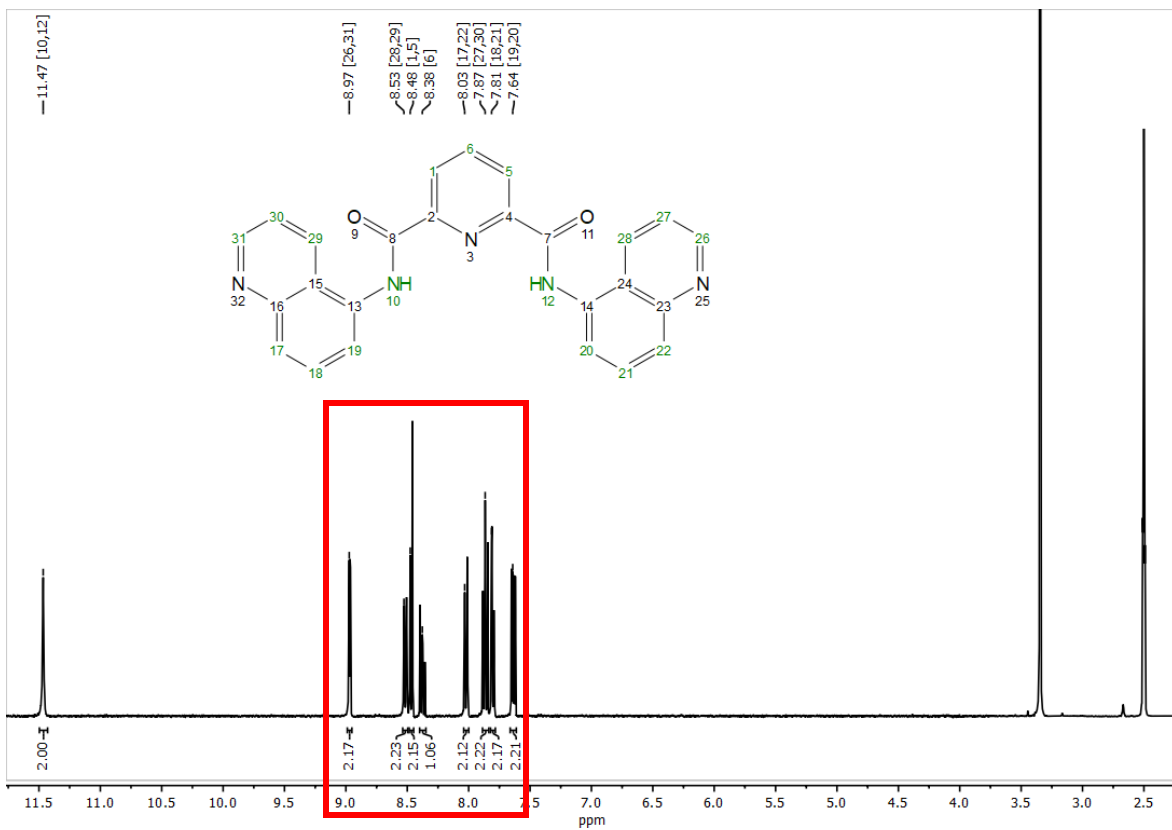


Figura 6. Espectro 1H-RMN del intermediario BQ5 en DMSO-d₆ a 400 MHz.

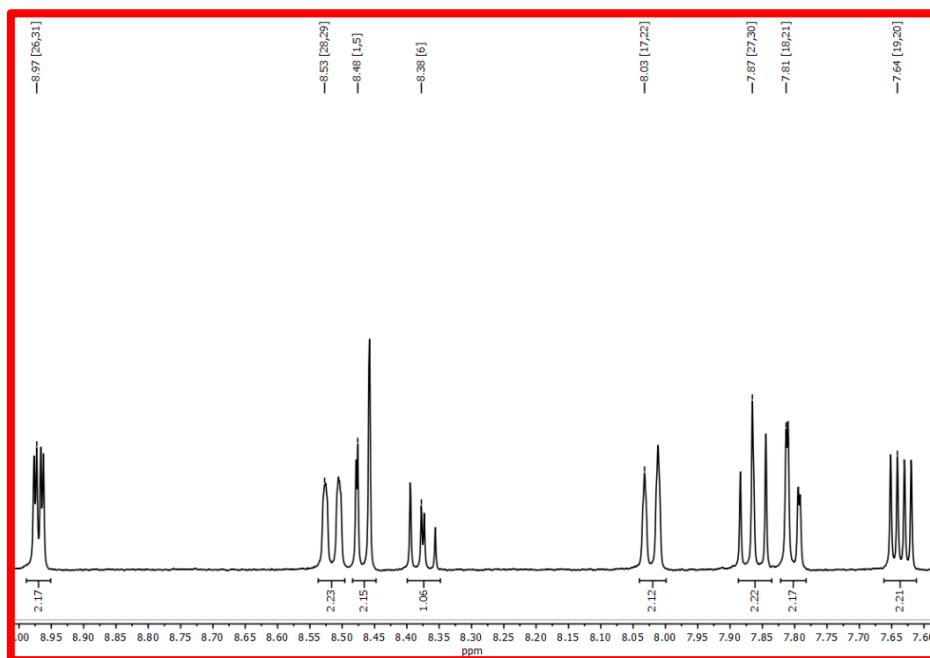


Figura 7. Expansión de la Figura 6.

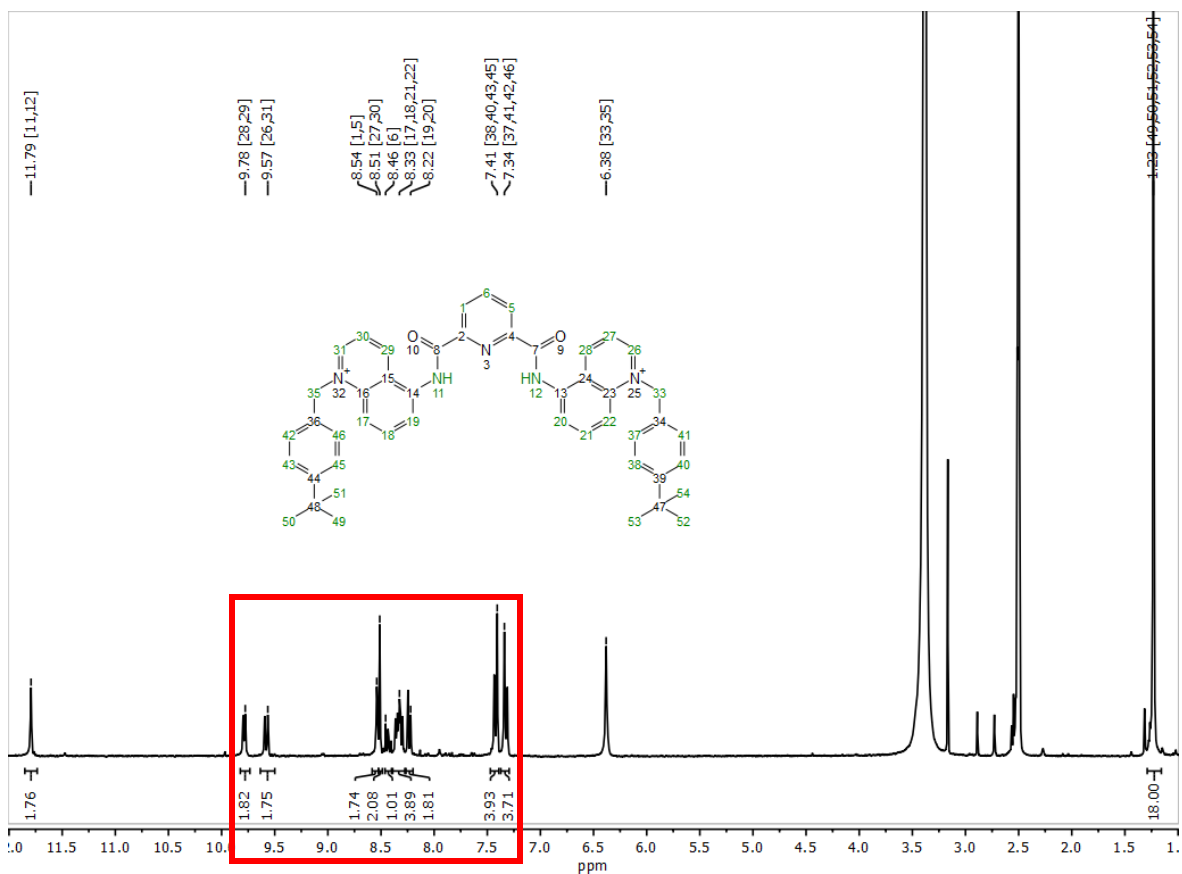


Figura 8. Espectro de ^1H -RMN de **L** en DMSO-d_6 a 400 MHz.

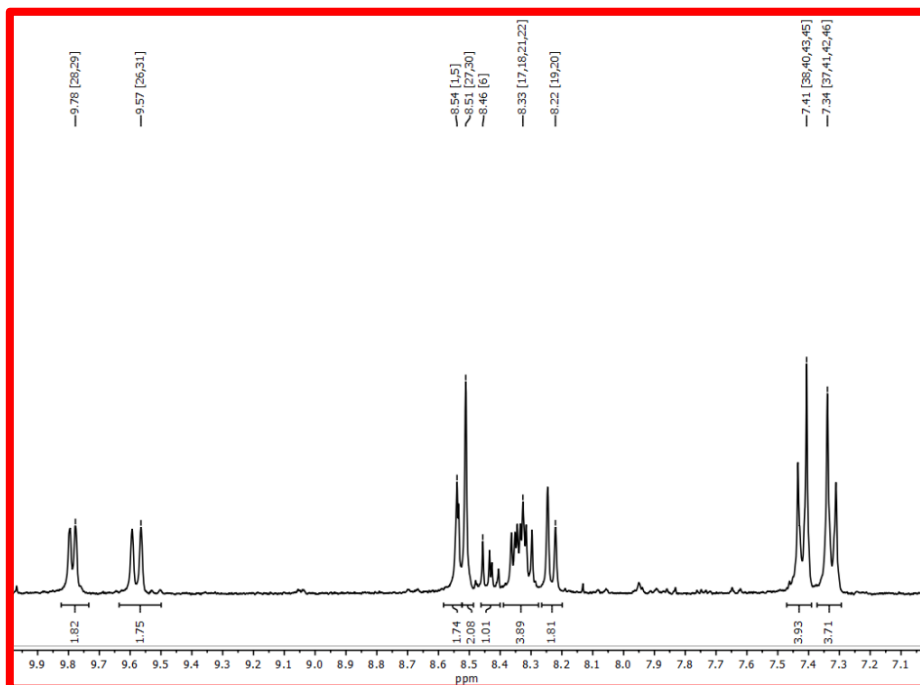


Figura 9. Expansión de la Figura 8.

El ligante dicatiónico **L** fue obtenido como sal de bromuro con un rendimiento del 95 % por la reacción entre el intermediario BQ5 y bromuro de 4-tert-butilbencilo. Los espectros correspondientes de ^1H , ^{13}C , IR-ATR, y MS-ESI(+) se muestran desde la Figura 8 a la Figura 12.

El espectro ^1H RMN de **L** en $\text{DMSO-}d_6$, Figura 8, mostró tres singuletes en 11.79, 6.38 y 1.23 ppm que corresponden al grupo amida (-CONH-), al grupo metileno (-CH₂-), y al terbutilo (-C(CH₃)), respectivamente. Los protones aromáticos del sustituyente (4-terbutil-benceno) se observan entre 7.41 y 7.34 ppm.

Los dos dobletes desplazados a campo bajo en 9.80 y 9.60 ppm corresponden a los átomos de hidrógeno en posición *orto* y *para* del grupo N⁺-terbutilo del anillo quinolina. El resto de las señales de quinolina se observan en el intervalo 9.78 – 8.22 ppm.

El espectro ^{13}C RMN de **L** en $\text{DMSO-}d_6$, Figura 10, mostró una señal en 163.43 ppm que corresponde al carbono cuaternario de la amida (-CONH-). Las dos señales a menor campo, 34.83 y 31.41 ppm, hacen referencia a los carbonos del terbutilo, siendo la señal más intensa la de los metilos y la menos intensa la de los cuaternarios.

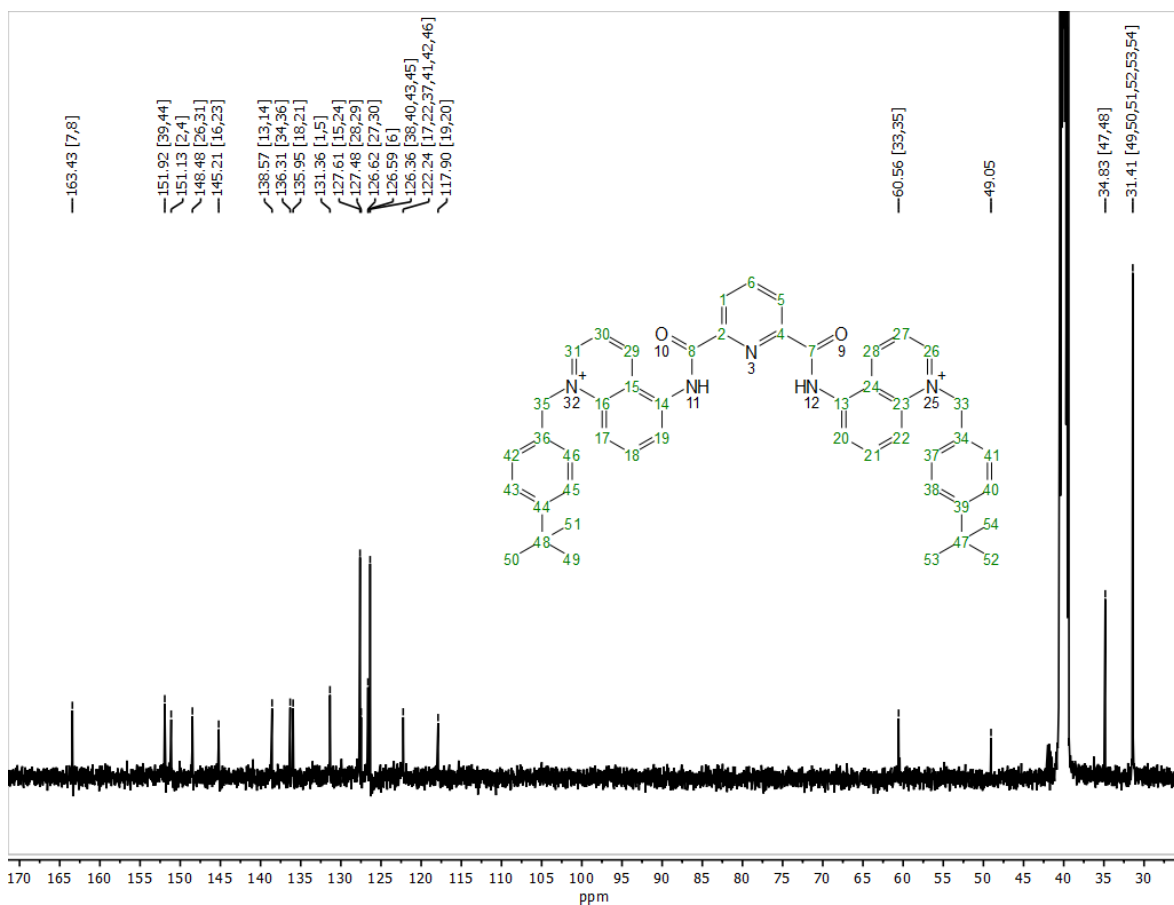


Figura 10. Espectro de ^{13}C -RMN de **L** en DMSO-d_6 a 400 MHz.

Por otra parte, el espectro de masas ESI, con un escaneo positivo, muestra prácticamente una señal intensa en 793.8 m/z que se puede asignar al monocatión $[\text{L}^{2+} + \text{Br}^-]^+$ ($\text{C}_{47}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_2$, 793.83 m/z) (Figura 11).

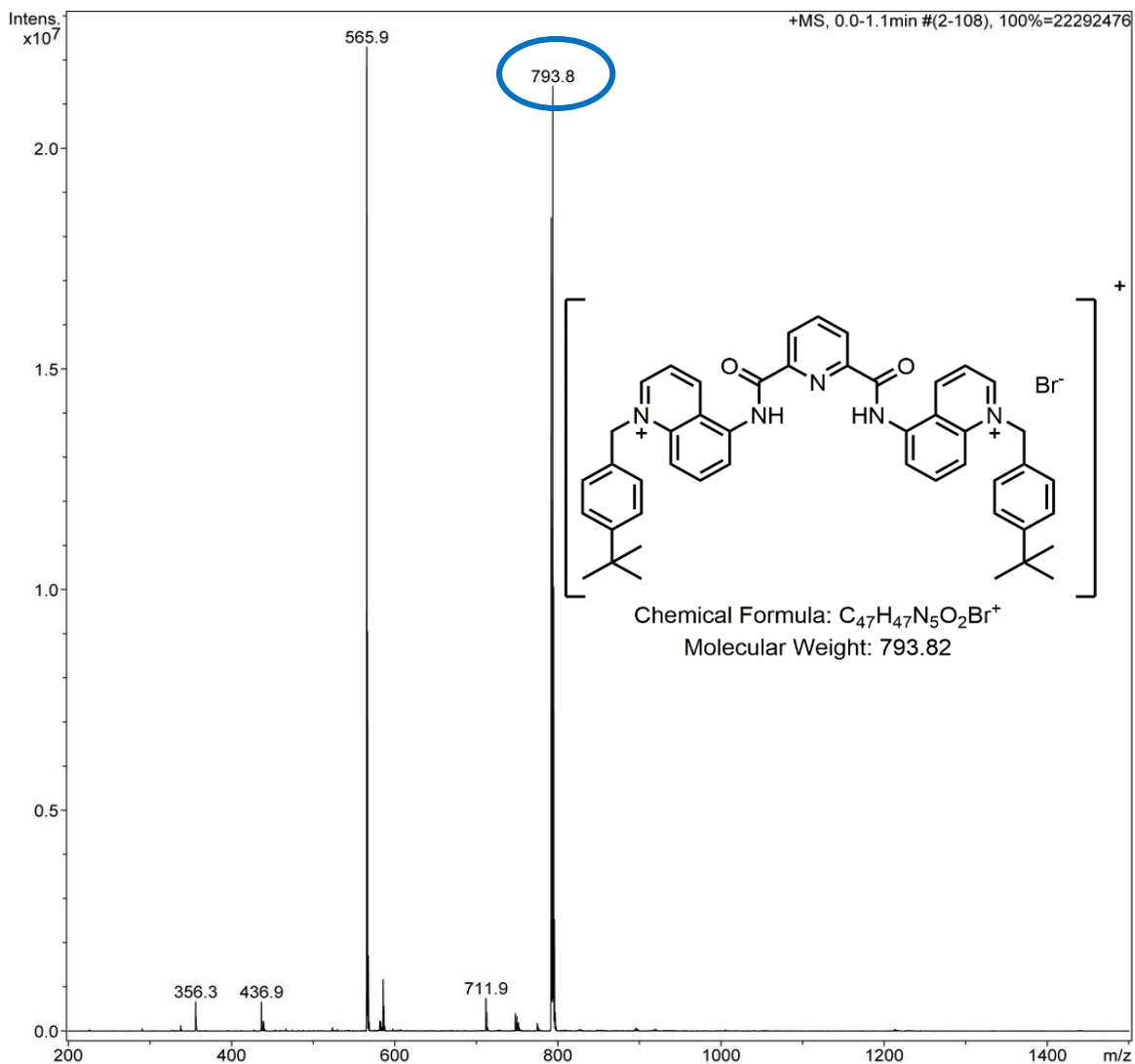


Figura 11. Espectro de Masas ESI(+)⁺ del ligante L en metanol y estructura química de la sal de bromuro L.

La Figura 12 muestra el espectro IR-ATR del complejo, las principales bandas son observadas en 1680.74 y 3408.10 cm⁻¹. De éstas, la primera es del carbonilo de la amida y la segunda del enlace nitrógeno – hidrógeno de la misma. Arriba de 3000 se observan las señales para los C-H aromáticos, en específico en 3083.39 y 3151.76. Se sabe que en esta zona se muestran enlaces sp². La presencia de enlace carbono – hidrógeno del terbutilo se confirma con la señal en 2959.53 referente a alifáticos. En la parte derecha del espectro se ven dos señales fuertes, a

1508.79 y 792.82; la primera corresponde a una segunda señal del nitrógeno de la amida mientras que la segunda, a la presencia de la quinolina.

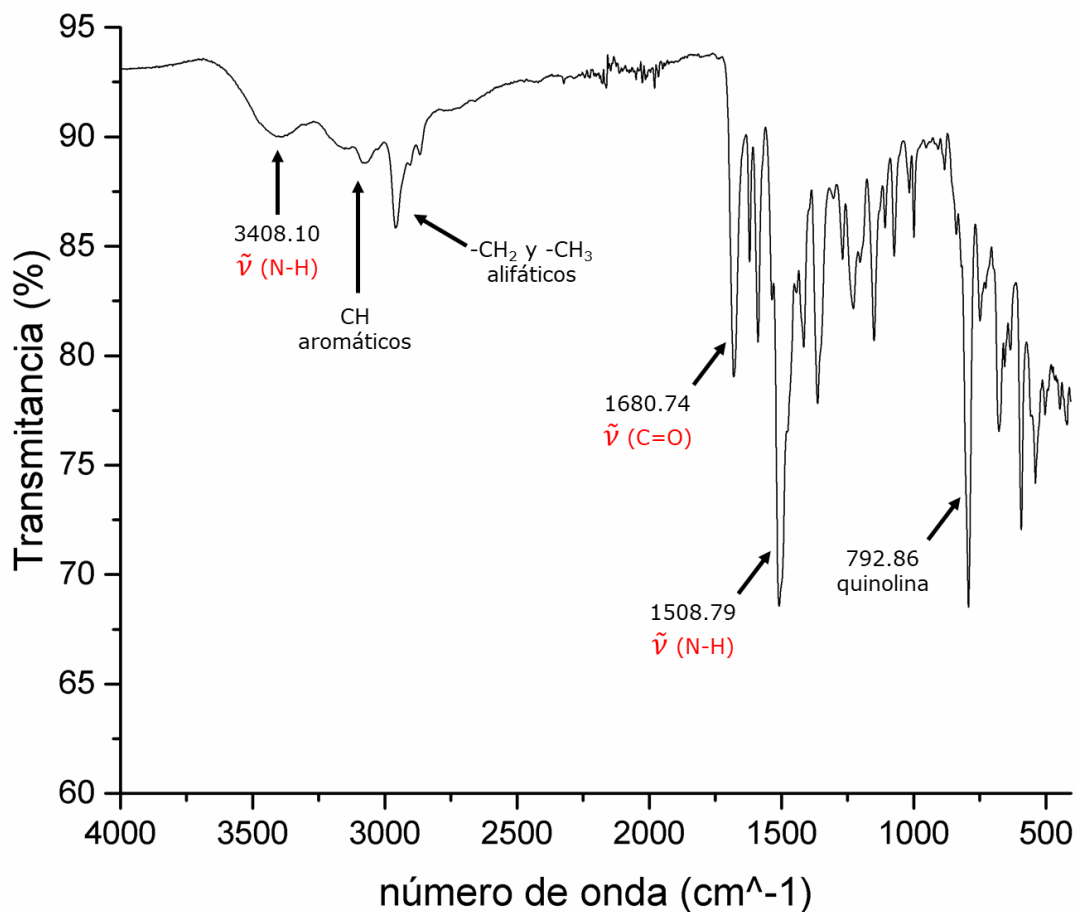


Figura 12. Espectro de IR-ATR de **L**.

El complejo de Cu(II), **1** fue obtenido como un polvo cristalino de color café oscuro en un rendimiento del 78% por la reacción directa entre el ligante **L** con la sal de CuBr₂ en metanol y en presencia de una base. El complejo fue caracterizado por MS-ESI(+), IR-ATR y RPE como se muestra de la Figura 13 a la Figura 15.

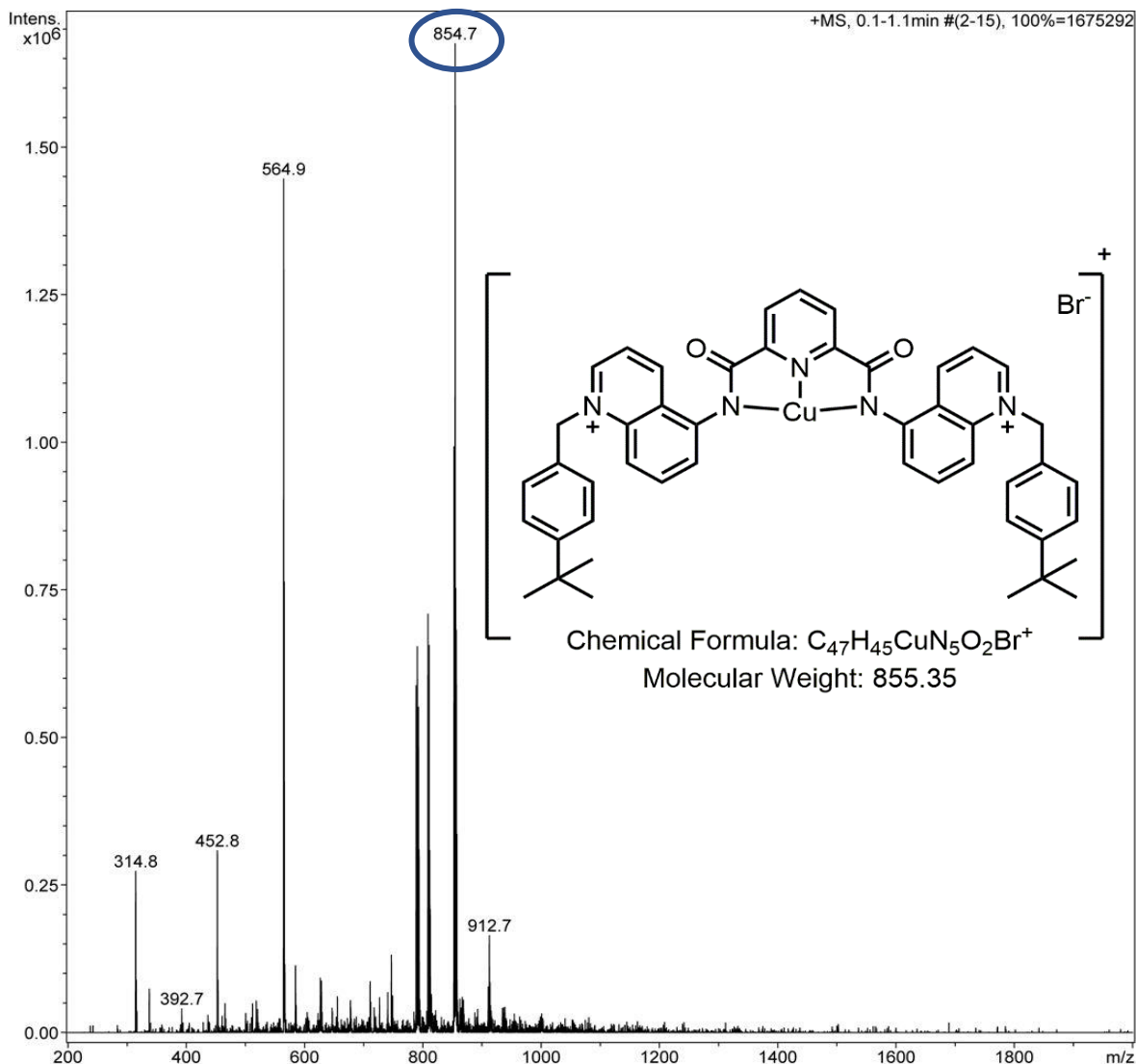


Figura 13. Espectro de masas ESI(+) del complejo **1** en metanol y estructura química del complejo [CuLBr]⁺.

La primera evidencia de la formación del complejo de Cu(II) fue obtenida por espectrometría de masas. El espectro ESI(+) del complejo **1** muestra una señal principal a 854.7 m/z que se puede asignar al catión [CuLBr]⁺ (formula mínima: C₄₇H₄₅BrCuN₅O₂, 855.3 m/z) como se observa en la Figura 13.

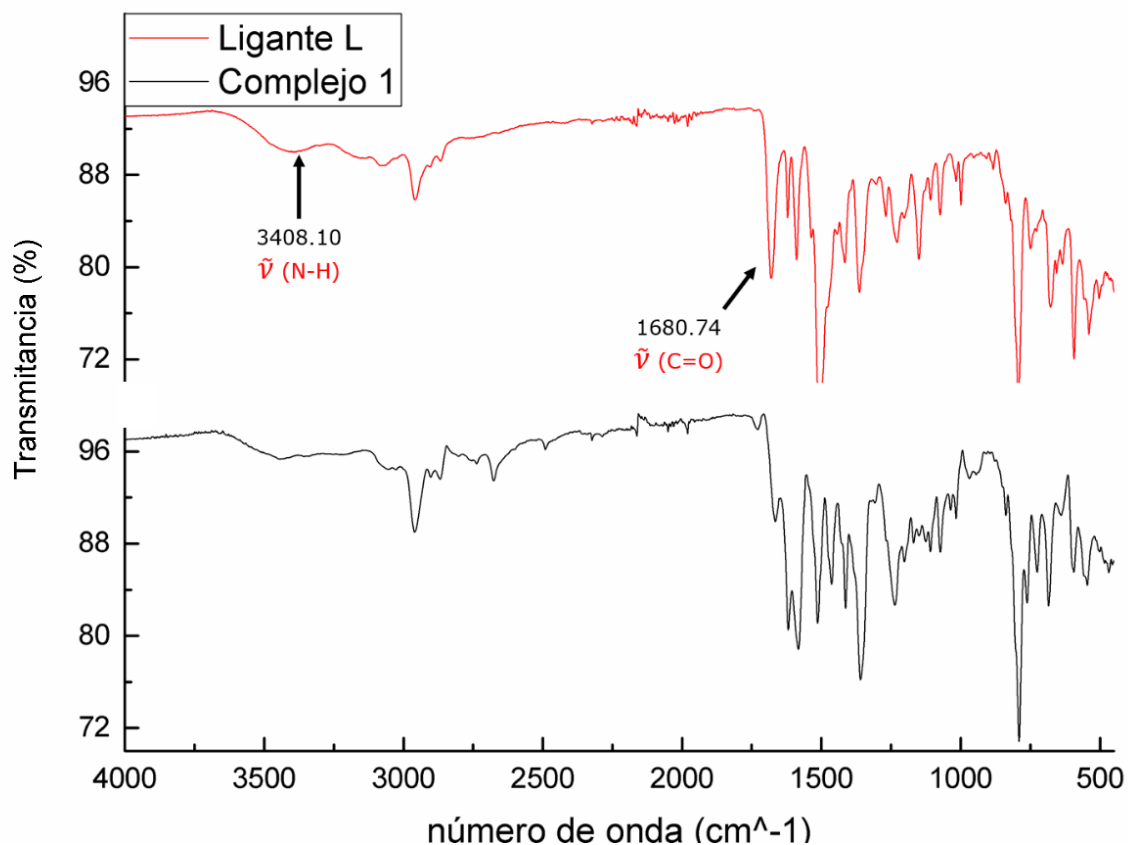


Figura 14. Comparación de espectros IR-ATR de **L** y **1**. Desaparición de señal en 3408 cm^{-1} referente al grupo amida (-NH).

Para comprobar la coordinación del ion Cu(II) con el ligante **L** a través de cavidad y los átomos donadores [NNN] se realizó una comparación entre los espectros de IR-ATR del ligante libre **L** y el complejo **1**, Figura 14. En general, las bandas de los grupos amida que se encuentra en 3408 cm^{-1} en el ligante⁵², desaparecen después de la reacción con la sal de Cu(II), lo cual sugiere fuertemente la participación de estos grupos en la coordinación. También observamos el desplazamiento de la banda de los carbonilos a un número de onda menor. Si bien estos no participan directamente en el enlace, al estar en enlace con el nitrógeno de la amida que forma un enlace covalente al metal, también se ven afectados y se espera que se desplacen a menores números de onda. Por parte de la

piridina, Nakamoto⁵² reporta que las vibraciones de frecuencia alta se van a ver poco afectadas por la formación del complejo de coordinación. La Figura 15 muestra el espectro de RPE del complejo en metanol a 77K con sus parámetros. El espectro es del tipo anisotrópico ($g_{\parallel} = 2.43$ y $g_{\perp} = 2.088$) y muestra características señales hiperfinas en la región paralela debido al ion Cu(II). Los parámetros g fueron estimados en el orden $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.0023$, lo cual indica una geometría de pirámide de base cuadrada (estado fundamental, $d_{x^2-y^2}$) para el centro metálico del complejo **1**.^{12,53,54}

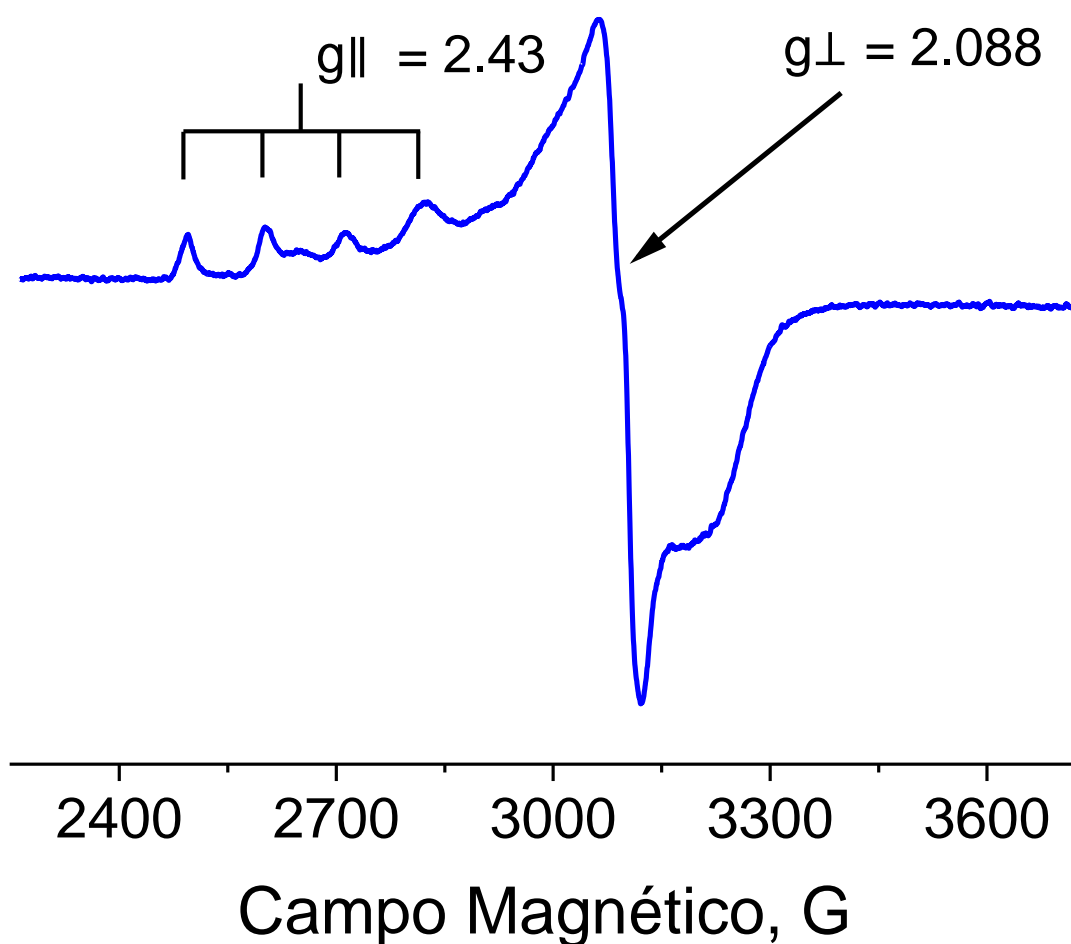
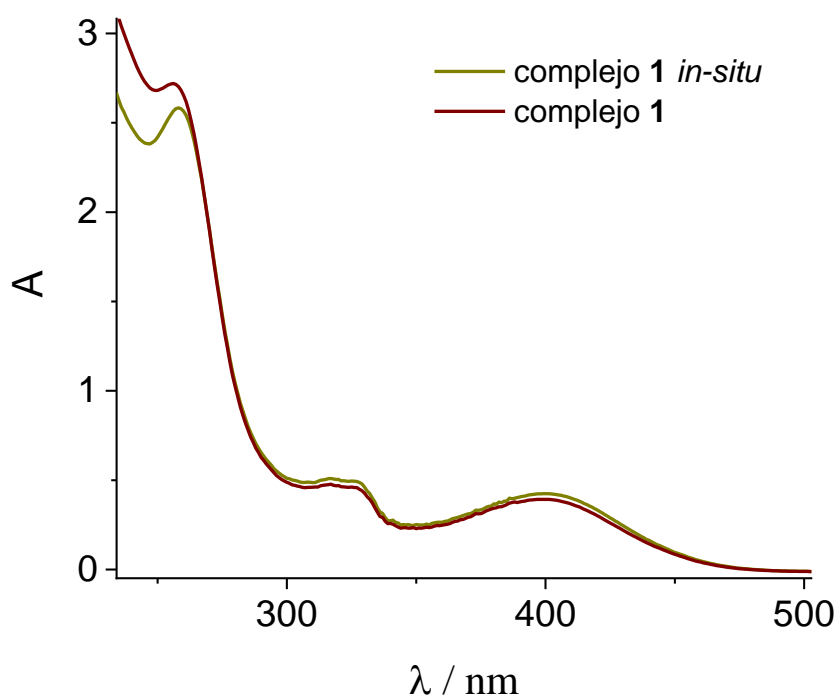


Figura 15. Espectro RPE tomado a 77 K de una solución 0.002 M de **1** en MeOH, frecuencia= 9.04 GHz.

VIII.2 Estudios de complejación de **L** con **Cu(II)** en agua

Es bien conocido que la complejación de iones metálicos paramagnéticos a fluoróforos extingue fuertemente la emisión y la posterior descoordinación del centro metálico por un agente externo como un analito puede restaurar la emisión original del fluoróforo.^{12,53} Con el propósito de desarrollar un quimiosensor fluorescente del tipo turn-on, capaz de operar en medios acuosos, se estudió como primer etapa la complejación y estabilidad química del fluoróforo orgánico **L** con el ion **Cu(II)** en agua a pH= 7.4 (10 mM, MOPS). La constante de formación fue estimada por titulaciones espectroscópicas bajo estas condiciones.



En la

Figura 16. Espectros de UV-Vis del complejo 1 preparado in-situ y en forma sintética en agua a pH= 7.4.

Figura 16 vemos que el espectro del complejo **1** cuenta con dos máximos. El primero a 214 nm hace referencia a las transferencias de carga intraligante mientras que el segundo máximo a 308 nm hace referencia a la transferencia de carga metal-ligante de un compuesto de coordinación.

La Figura 17 muestra la familia de espectros de absorción cuando una solución acuosa de **L** (20 μM) es titulada con la sal de CuBr_2 (0 – 71 μM). La existencia de dos puntos isosbesticos a 331 y 360 nm indica que solo dos especies están en equilibrio (Esquema 11). El cambio hipercrómico de la absorbancia a 400 nm (Figura 17) puede ser bien ajustado a un modelo de complejación 1:1 usando la ecuación (1), donde el valor de la constante fue estimada en $K_{(\text{L-Cu})} = 4.07 (\pm 0.04) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Donde la A_{obs} es la absorbancia observada, A_L es la absorbancia del ligante libre, ΔA_∞ es el máximo cambio de absorbancia inducido por la presencia del Cu(II) a saturación, $[\text{Cu}]_T$ es la concentración total del ion metálico y $K_{(\text{L-Cu})}$ es la constante de unión. La comparación del espectro UV-Vis del complejo **1** preparado *in-situ*, a partir de su titulación, es prácticamente igual al espectro UV-Vis del complejo **1** preparado por la metodología sintética del Esquema 10, lo cual sugiere que en solución el ligante **L** tiene alta afinidad por los iones Cu(II) y forma la especie 1:1, independientemente de la ruta sintética por la que sea preparado. Adicionalmente, el espectro de masas tomado de una solución $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ confirma esta estequiometria 1:1.

$$A_{obs} = A_L + \frac{\Delta A_\infty \left\{ [L]_T + [\text{Cu}]_T + \frac{1}{K_{\text{L-Cu}}} - \left[\left([L]_T + [\text{Cu}]_T + \frac{1}{K_{\text{L-Cu}}} \right)^2 - 4[L]_T[\text{Cu}]_T \right]^{0.5} \right\}}{2[L]_T} \quad (1)$$

La titulación fluorimétrica ($\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$) de **L** con CuBr_2 se muestra en la Figura 18. La adición de 1.0 equivalente de Cu(II) extingue por completo la emisión verde (530 nm) del ligante, lo cual confirma la estequiometria 1:1 del complejo en agua. A partir del perfil fluorimétrico a 530 nm, Figura 19, se calculó una constante de unión de $K_{(\text{L-Cu})} = 7.32 (\pm 0.05) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ utilizando la ecuación (1).

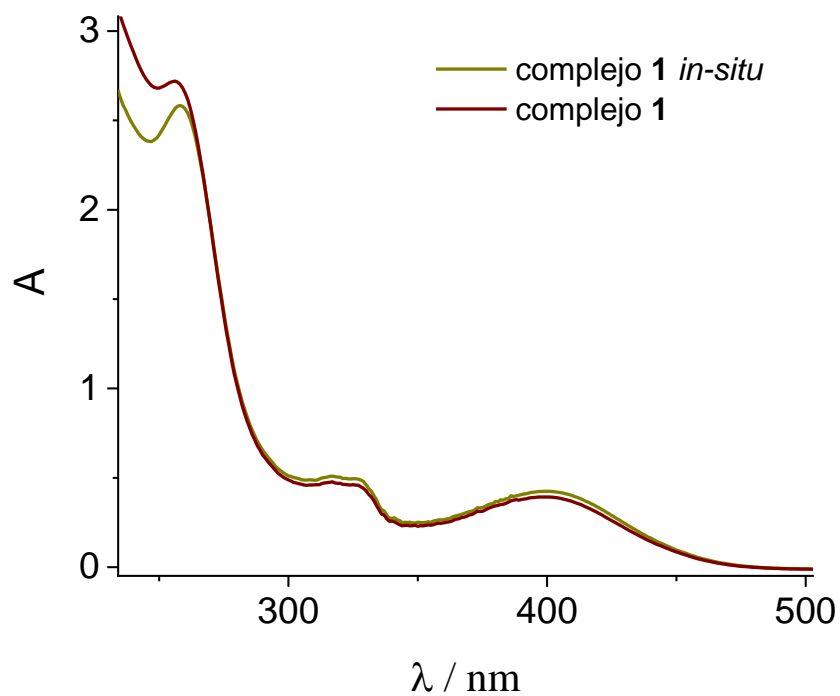


Figura 16. Espectros de UV-Vis del complejo **1** preparado *in-situ* y en forma sintética en agua a pH= 7.4.

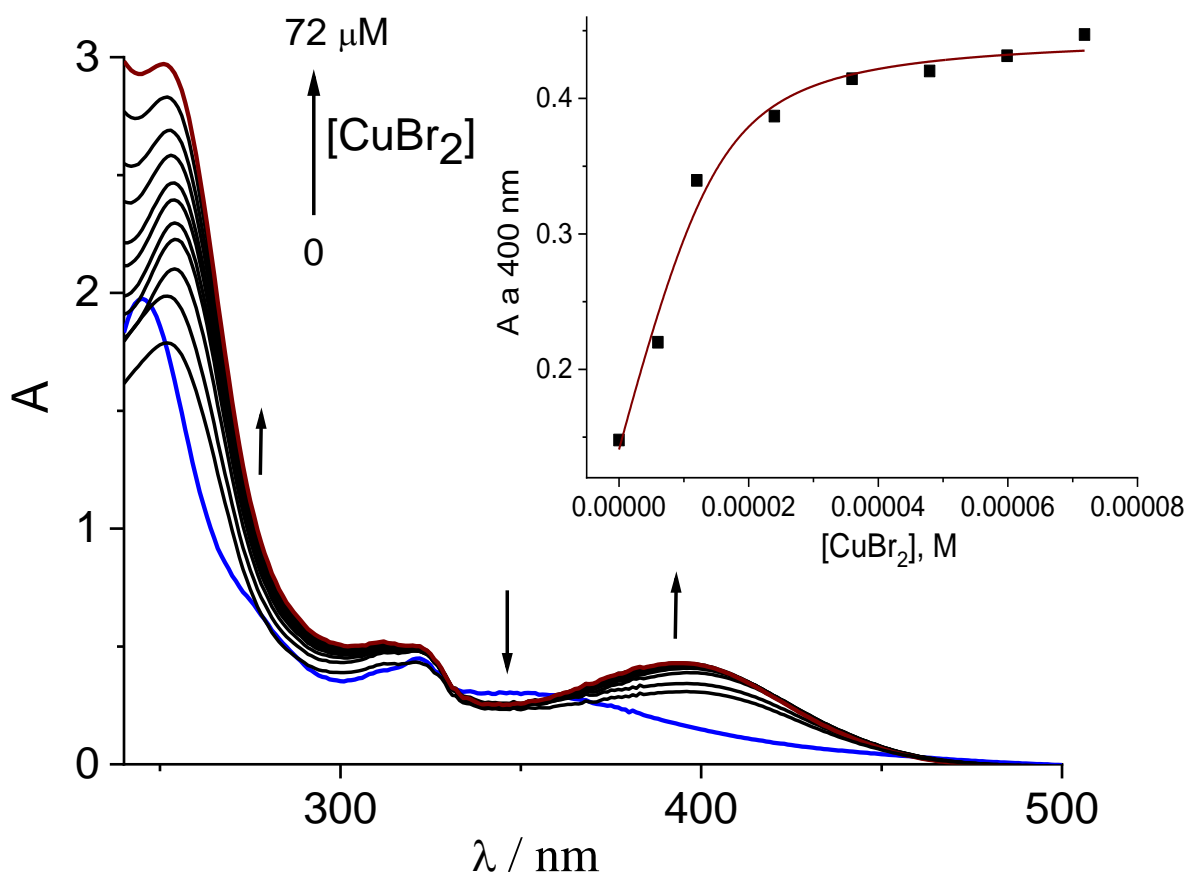
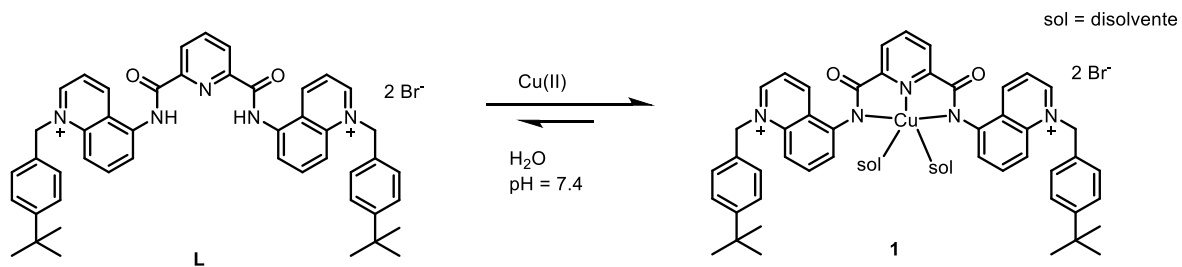
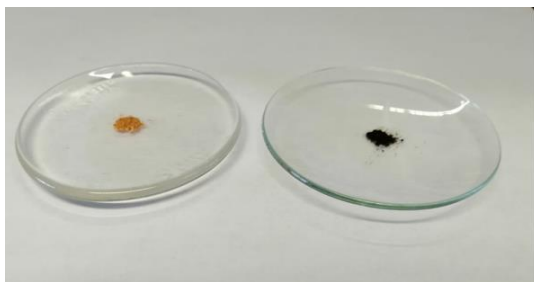


Figura 17. Titulación espectrofotométrica de **L** (20 μM) con CuBr_2 en una solución acuosa a $\text{pH} = 7.4$ (10 mM MOPS).



Esquema 11. Equilibrio alcanzado.

La constante de complejación estimada por fluorescencia es ligeramente mayor a la obtenida por UV-Vis, lo cual sugiere que la complejación por fluorescencia puede tener una contribución del estado excitado del **L**, lo cual no es inesperado.



*Imagen 1. Ligante **L** y complejo **1** en distintos estados de agregación (arriba: sólido, abajo: líquido) y a distintas longitudes de onda del espectro de la luz (izquierda:espectro visible, derecha:UV).*

La Imagen 1 muestra como tanto en disolución acuosa como en sólido, el ligante **L** presenta luminiscencia verde pero al acomplejarlo con Cu(II) ésta desaparece por el apagamiento.

VIII.3 Estabilidad del complejo en medios acuosos

Un requisito preliminar para los quimiosensores es su estabilidad química en el medio de detección. La Figura 20 muestra los máximos de absorción a 318 y 400 nm en función del tiempo (0 – 90 min.), prácticamente los valores de absorción permanecen constantes, lo cual indican que el complejo **1** es estable en medios acuosos en este intervalo de tiempo y se mantiene como especie monomérica.

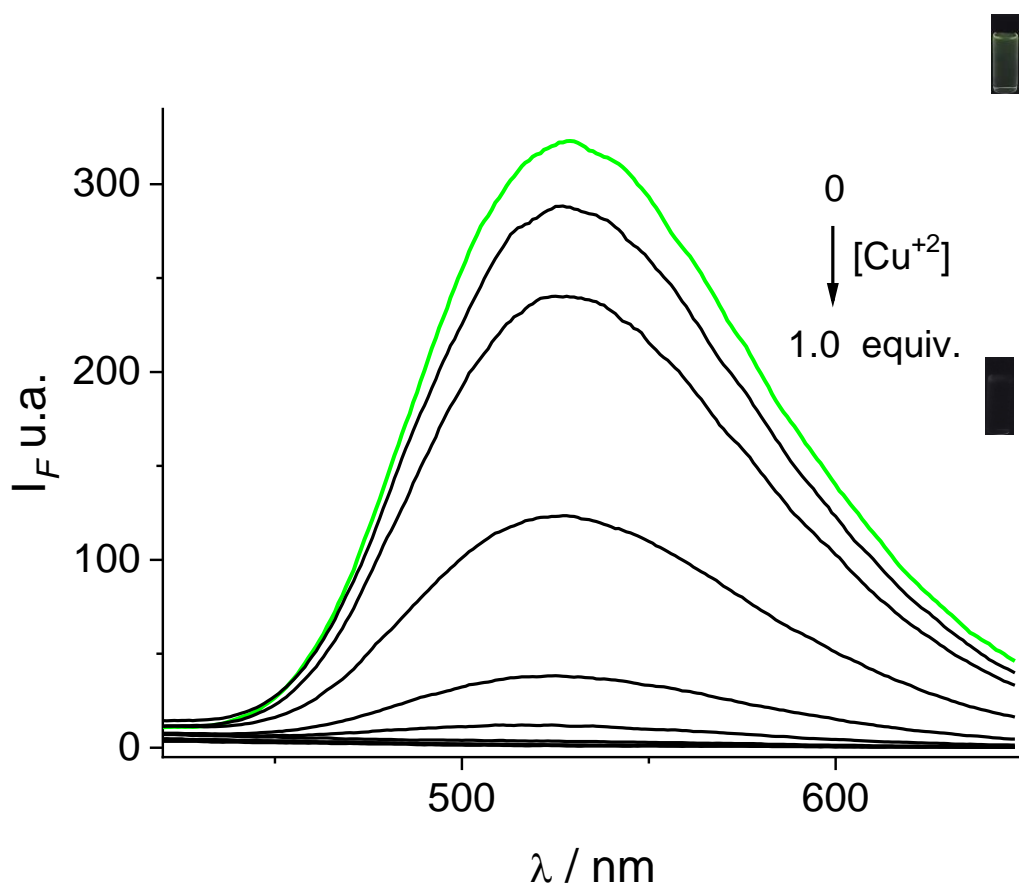


Figura 18. Titulación fluorimétrica ($\lambda_{ex} = 330$ nm) de **L** con adiciones crecientes de $Cu(II)$ hasta 1.0 equivalente en agua a $pH = 7.4$ (10 mM MOPS).

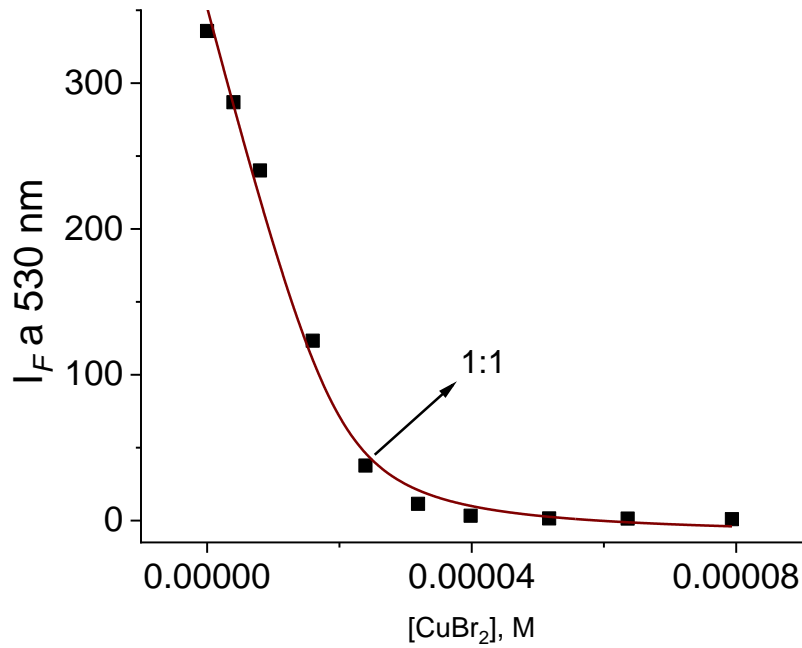


Figura 19. Perfil fluorimétrico de la titulación a 530 nm de **L** en función de $[Cu(II)]$. La línea sólida corresponde al ajuste de los datos experimentales para un modelo 1:1 usando la ecuación (1).

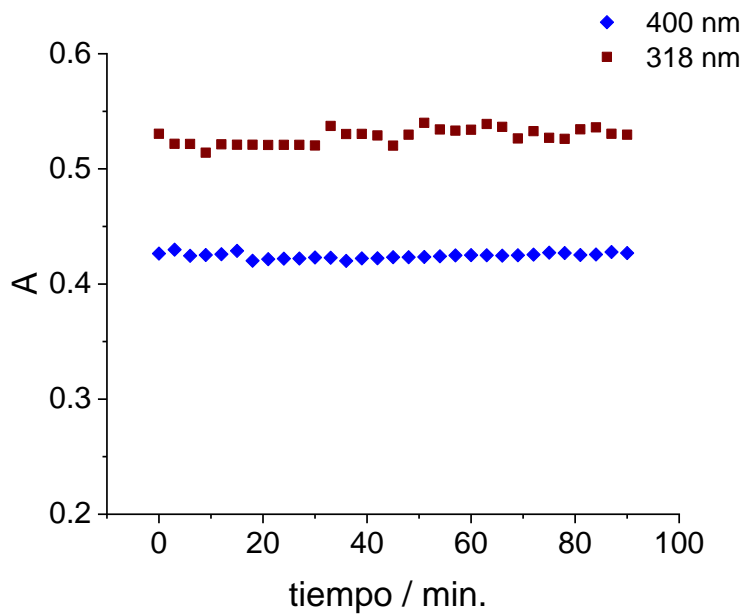
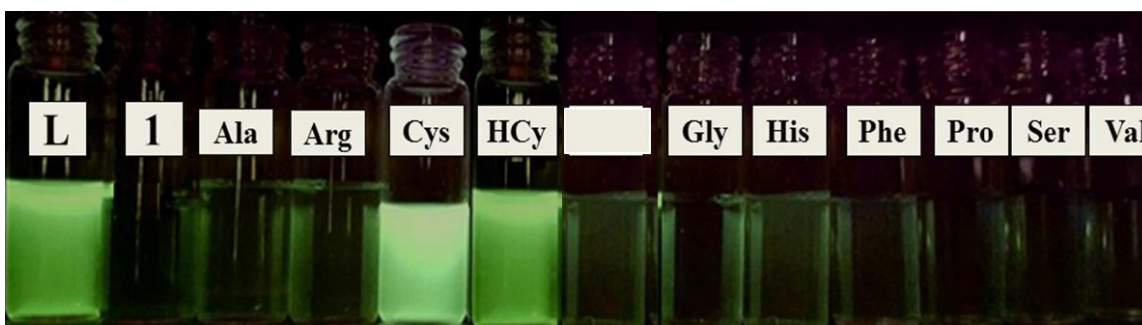


Figura 20. Máximos de absorción a 318 y 400 nm del complejo **1** ($20 \mu M$) en agua a $pH= 7.4$ en función del tiempo.

VIII.4 Detección fluorescente de biotioles.

La respuesta visual bajo la radiación de luz UV (365 nm) de una solución acuosa de **1** (50 μ M) a pH= 7.4 (10 mM, MOPS) por la presencia de 10 equivalentes de HCy, Cys y diferentes aminoácidos (Ala, Arg, Gly, His, Phe, Pro, Ser y Val) fue analizada.



*Imagen 2. Cambio visual de color de una solución acuosa del complejo **1** (50 mM) a pH= 7.4 por la adición de HCy, Cys y diferentes aminoácidos ([X]= 0.5 mM) bajo la radiación de luz UV (365 nm).*

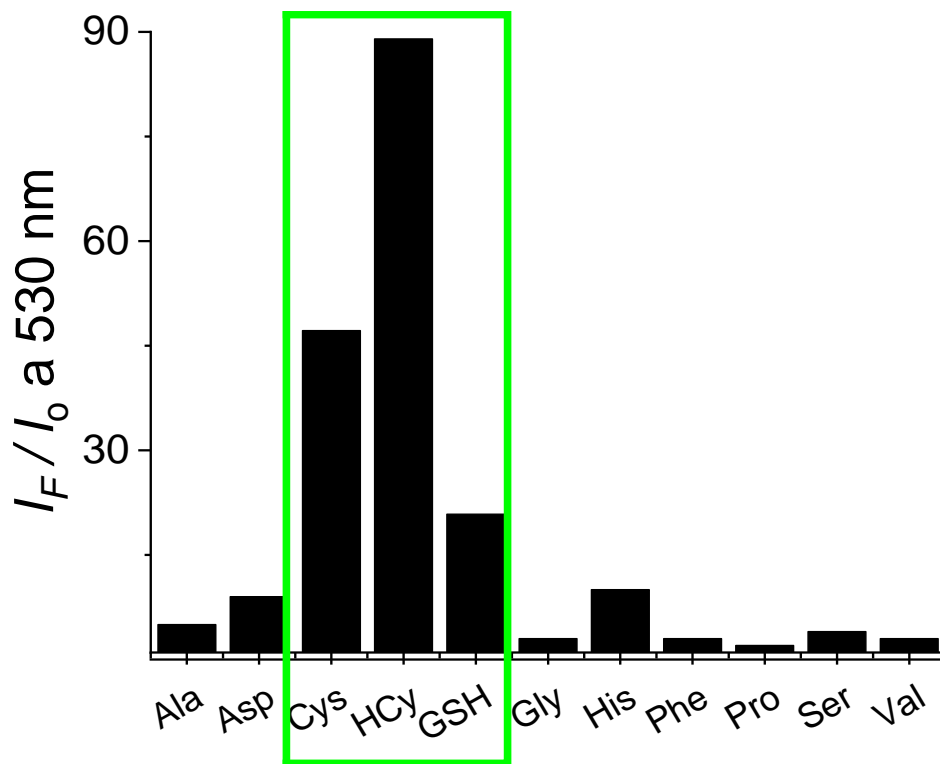


Figura 21. Selectividad fluorescente relativa de **1** con aminoácidos y biotioles en agua a pH= 7.4.

En principio, la emisión verde intensa del ligante libre desapareció por completo por la adición de un equivalente de la sal de bromuro de Cu(II) y esta fue restituida únicamente por las adiciones de HCY y Cys. En contraste, el resto de aminoácidos mostraron una emisión verde muy débil comparada con los biotioles como se observa en la Imagen 2. De forma cuantitativa, se muestra la selectividad fluorescente relativa en la Figura 21, llegando a la misma conclusión que con la prueba visual.

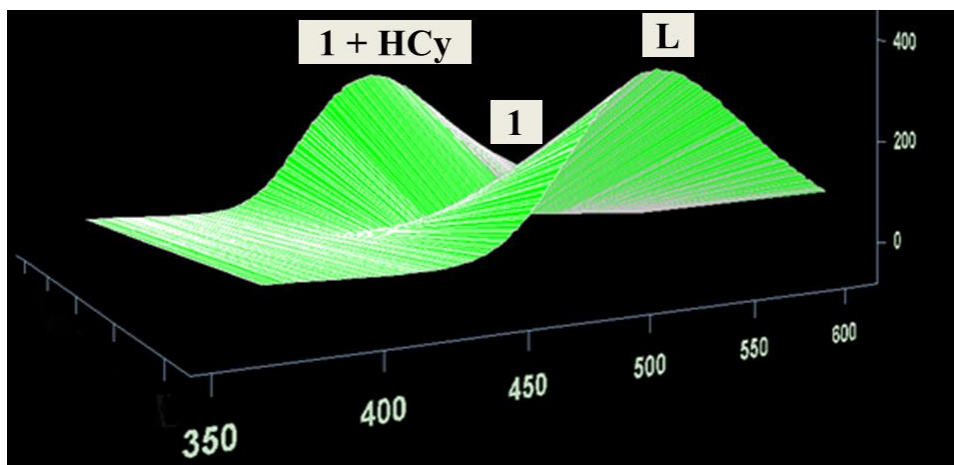


Figura 22. Espectros de emisión ($\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$) en 2D de **L**, **1** y el sistema **1** + HCy en agua a $\text{pH} = 7.4$.

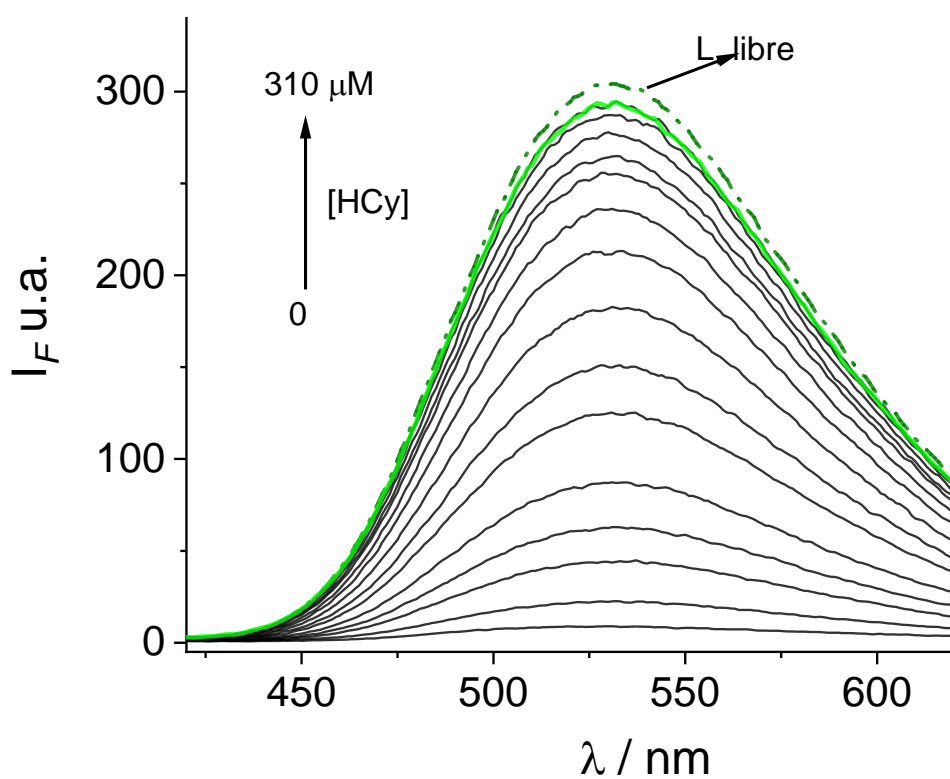


Figura 23. Titulación fluorimétrica ($\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$) del complejo **1** (20 μM) por adiciones de HCy.

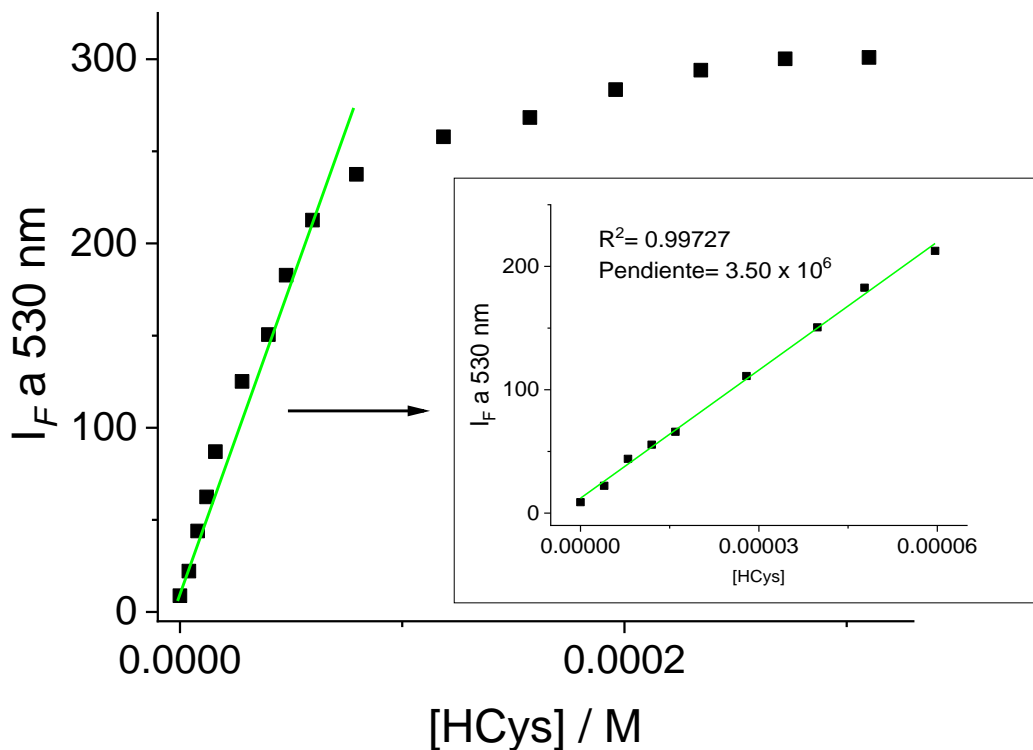


Figura 24. Perfil fluorimétrico a 530 nm, mostrando un ajuste lineal.

A continuación una prueba de selectividad relativa de los analitos fue realizada por espectros de fluorescencia. Alícuotas de soluciones stock concentradas de diferentes aminoácidos, HCys, Cys y GSH ($[X]_{\text{final}} = 200 \mu\text{M}$) fueron adicionados a una solución acuosa del complejo **1** la emisión a 530 nm fue grabada como se muestra en la Figura 23. La adición de HCys induce un aumento muy fuerte de la emisión verde (I_F/I_0), por otro lado, Cys y GSH encienden modernamente la emisión de la solución acuosa de **1**, pero con una menor intensidad que la observada para homocisteína. En contraste, el resto de los aminoácidos, que carecen del grupo tiol (-SH) en su estructura tienen una respuesta de emisión muy débil ($I_F/I_0 \leq 9$).

Para estudiar la reversibilidad de la emisión fluorescente por la coordinación/descoordinación del ion Cu(II) al ligante **L** inducida por la adición de HCy, se tomaron los espectros de emisión del ligante libre **L**, complejo **1** y el sistema **1** + HCy (3 equiv.). Las superficies de los espectros de emisión se muestran en la Figura 22.

Después de la adición de HCy, el espectro de emisión se restaura y es prácticamente igual al original del ligante libre tanto en el máximo, la forma y la intensidad, lo cual sugiere fuertemente que la señal analítica es originada por la liberación del ligante **L**.

Considerando la afinidad y selectividad de **1** por HCy, se realizó una titulación fluorimétrica para determinar el límite de detección de la HCy por el complejo **1**. La Figura 23 muestra la activación de la emisión verde de una solución acuosa de **1** (20 μM) por adiciones crecientes de HCy a pH= 7.4. El perfil del máximo de emisión tiene un comportamiento lineal en el intervalo 0 – 110 μM de HCy ($R^2= 0.99727$) (Figura 24). A partir de la pendiente en el intervalo lineal se determinó un límite de detección de $\text{LOD}= 285\pm 10$ nM. El límite de detección definido como $\text{LOD}= 3s/\sigma$ donde s es la desviación estándar el blanco y σ es la pendiente (3.5×10^6) de la curva de calibración.

Para investigar el posible mecanismo químico de detección, la solución del experimento de titulación fluorimétrica fue analizado por espectrometría de masas ESI(+), Figura 25. El pico a 793.8 m/z corresponde al ligante libre $\{\mathbf{L} + \text{Br}\}^+$ ($\text{C}_{47}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{BrO}_2$, 793.83 m/z) y el pico a 565.9 corresponde a una fragmentación del ligante libre, específicamente a la pérdida de un fragmento 1-(terbutil)-4-metilbenzeno. Estructuras de ambos compuestos se muestran en la Figura 26. La liberación del ligante **L**, por adición de Hcy o Cys puede ser el resultado de una reacción de oxidoreducción. Los biotioles son agentes reductores que pueden reducir el ion

Cu(II) a Cu(I) en agua,⁵⁵ lo cual puede resultar en la descoordinación de centro metálico debido a que Cu(I) no es estabilizado por el sitio de coordinación [NNN], lo cual restaura la fluorescencia original del ligante como se observó en los experimentos espectroscópicos.

Este mecanismo es llamado como ensayo de desplazamiento por indicador y un equilibrio hipotético de este mecanismo se muestra en el Esquema 11.

Para comprobar la reducción del Cu(II) a Cu(I), se realizaron mediciones de RPE de una solución del complejo **1** en ausencia y presencia de HCy. La Figura 27 muestra las mediciones y se observa que la adición de HCy induce la desaparición de la señal característica del ion Cu(II), lo cual soporta la reducción a Cu(I).

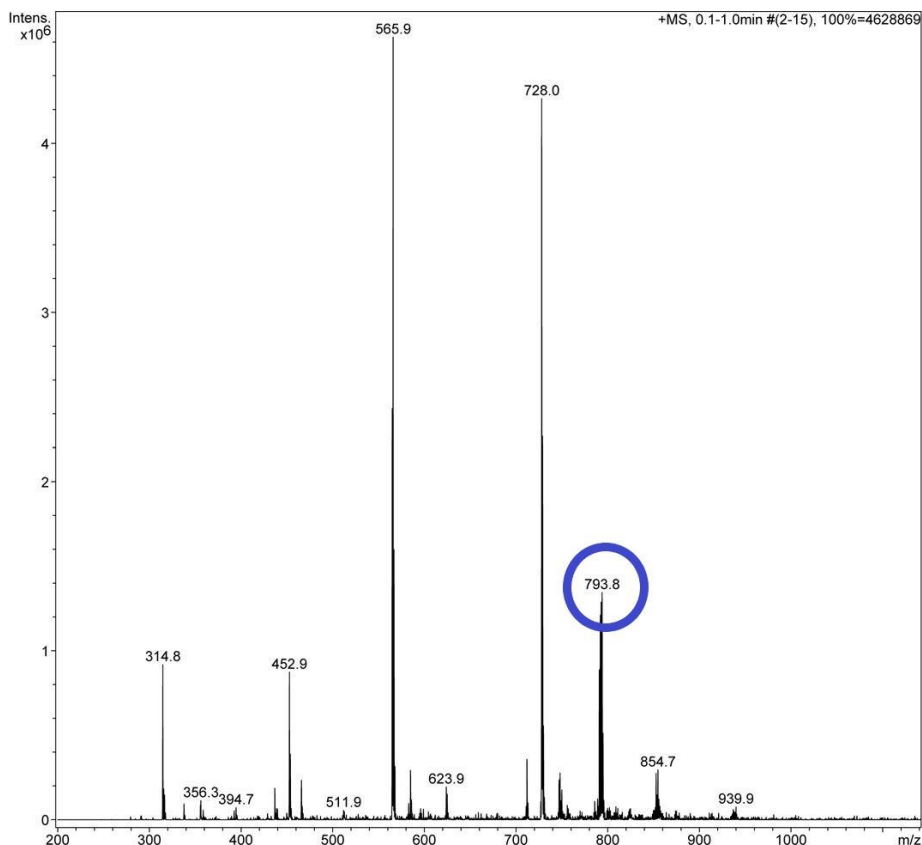


Figura 25. Espectro de masas ESI(+) del complejo **1** en MeOH tras la adición de 5 eq de HCy para la titulación por RPE.

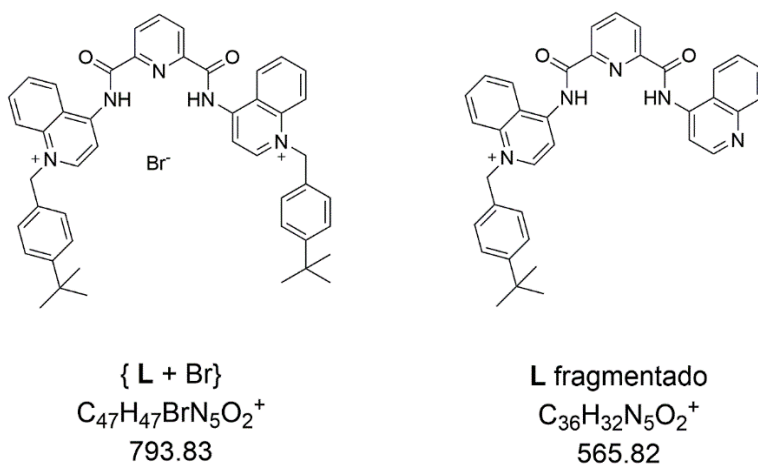


Figura 26. Especies catiónicas encontradas en el análisis por ESI de la mezcla del complejo **1** + HCy.

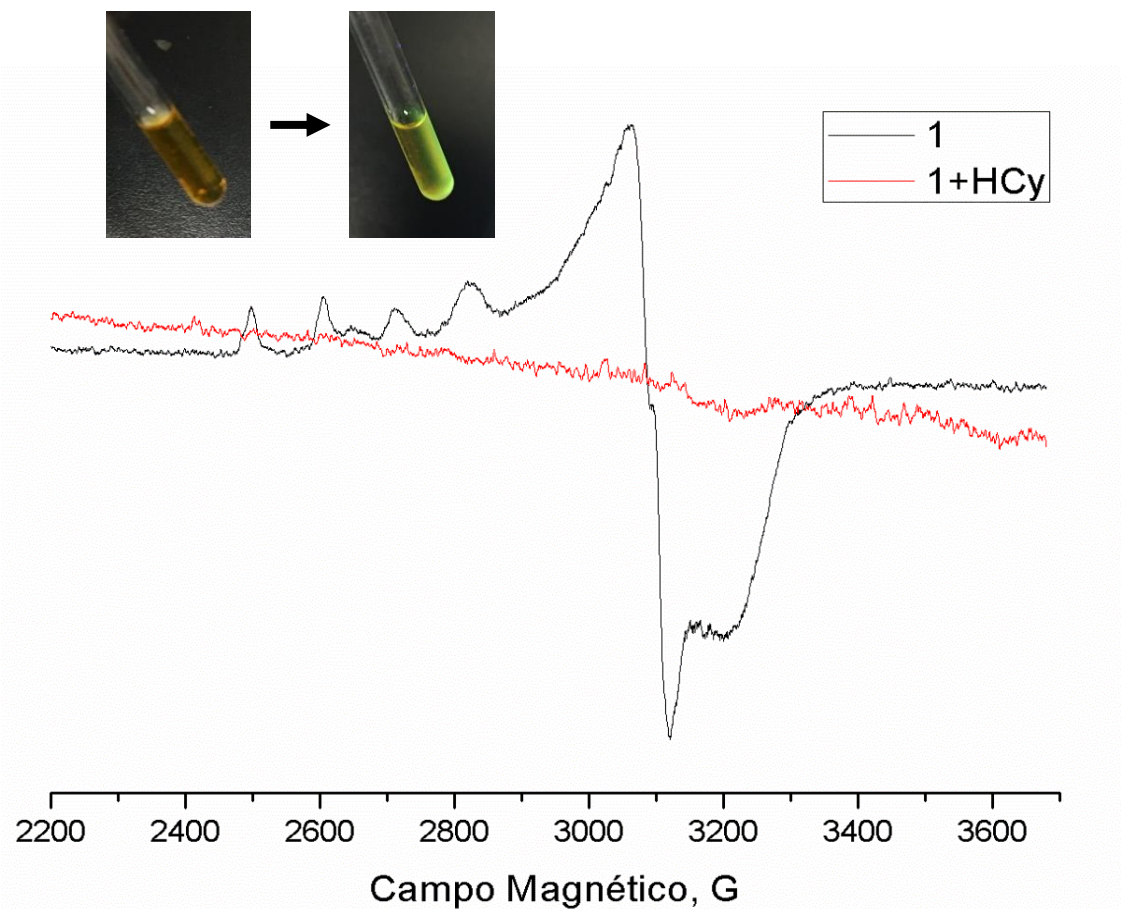


Figura 27. Espectro RPE tomado a 77 K de una solución MeOH de **1** en ausencia y presencia Hcy (5 equivalentes), frecuencia= 9.04 GHz, mostrando las soluciones del análisis bajo irradiación de luz UV.

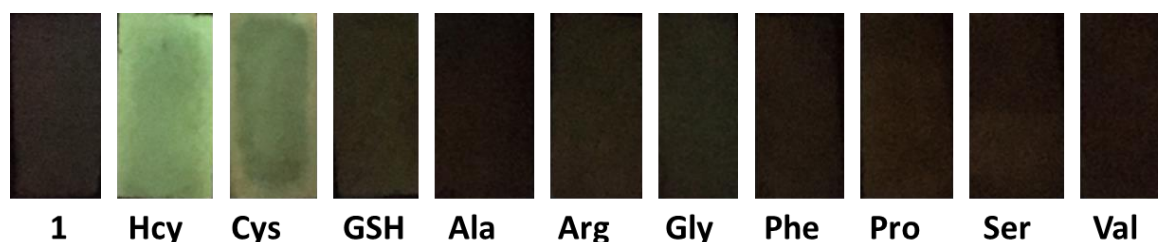
VIII.5 Detección visual por tiras reveladoras

Con el objetivo de mostrar una aplicación práctica del quimiosensor **1**, se desarrollaron tiras reveladoras con el siguiente procedimiento. Para impregnar las tiras con el quimiosensor y posteriormente el analito, se tomó papel filtro de la marca Whatman no. 2 de 185 mm de espesor y se cortaron tiras de 2x4 cm. Posteriormente, en cajas Petri, se colocaron gotas de 300 μ L de la solución stock del quimiosensor (0.1M en MeOH) sobre la cual se puso a reposar cada tira reveladora. Se dejó secar a temperatura ambiente por 15 min. Una vez ya secas, se procedió a

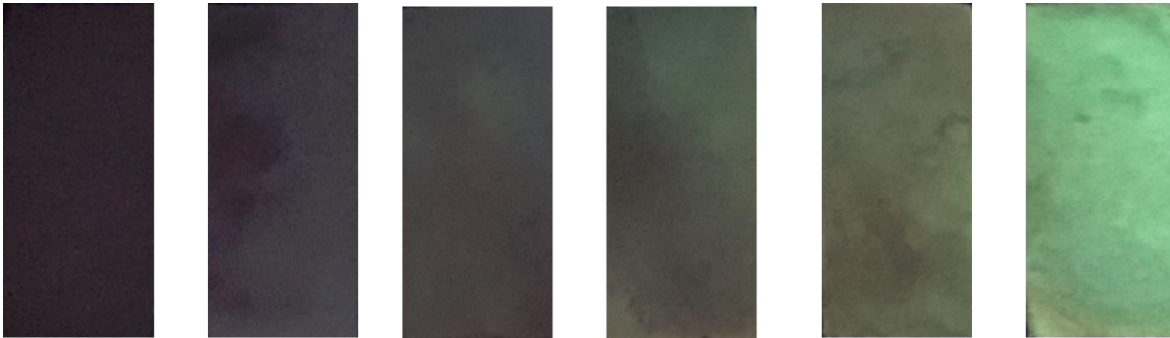
impregnar con el analito de interés.

Para la primera ronda, se usó una solución stock de homocisteína de 0.1M en agua destilada la cual fue diluida para crear la rampa de concentración que se muestra en la Imagen 3 (complejo **1** libre, +20/100 HCy, +40/100 HCy, +60/100 HCy, +80/100 HCy, +stock HCy). Nuevamente, depositando gotas de 300 µL sobre las cajas Petri, se dejó impregnar una tira sobre cada gota de las diferentes soluciones. Éstas se dejaron secar 24 h. Para la segunda ronda, se usaron 10 analitos distintos entre aminoácidos y biotioles (complejo **1** solo, Hcy, Cys, GSH, Ala, Arg, Gly, Ph, Pro, Ser and Val). Al igual que para la Hcy se prepararon soluciones 0.1M y con la ayuda de la micropipeta, se dejaron gotas de 300 µL en una caja Petri de cada solución para impregnar cada tira. También se dejaron secar por 24h a temperatura ambiente. Estas tiras se muestran en la Imagen 4.

Una vez teniendo todas las tiras, se pusieron debajo de la lámpara UV donde se fotografiaron. Adicionalmente, se creó una tira donde al añadir HCy en ciertos lugares, se eliminó el quencheo de manera estratégica para que debajo de la luz UV se lea UNAM pero a luz natural no se vea ningún cambio (Imagen 5).



*Imagen 3. Tiras reveladoras de **1** bajo radiación de UV-Vis mostrando el cambio visual inducido por la presencia de HCy, Cys y diferentes aminoácidos.*



*Imagen 4. Tiras reveladoras de **1** bajo radiación de UV-Vis después de ser inmersas en soluciones acuosas de Hcy a diferentes concentraciones (0, 20, 40, 60, 80 y 100 μM).*

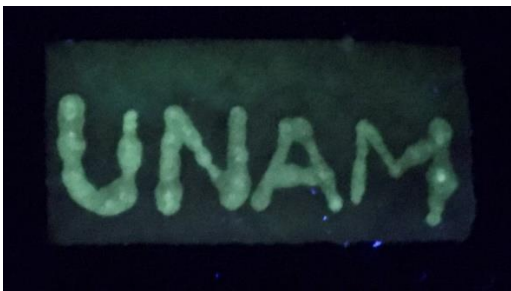


Imagen 5. Tira reveladora con acrónimo de la universidad donde se realizó el proyecto.

Después de obtenidas las tiras reveladoras de la Imagen 4 se concluyó que el límite de detección visible para el sensor es de 100 μM pues, aunque antes ya se empieza a ver una pequeña emisión, es en este punto donde se ve el salto más claro. Por otro lado, en la Imagen 3 se observa la especificidad del sensor **1** hacia Hcy y Cys con respecto a los otros analitos.

IX. Conclusiones

Se logró desarrollar y caracterizar un sensor químico luminiscente basado en un mecanismo de activación de la fluorescencia “turn-on” para biotioles.

Para la síntesis del complejo **1** se calculó una constante de unión del complejo $K_{(L-Cu)} = 7.32 (\pm 0.05) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

El complejo muestra estabilidad en medio acuoso en concentraciones micromolares. Dentro de este intervalo se observó que la luminescencia verde presentada por el ligante se apagaba por la presencia del metal en la esfera de coordinación pero volvía a encenderse cuando a la solución se le añadía Hcy o Cys. El perfil del máximo de emisión tiene un comportamiento lineal en el intervalo 0 – 110 μM de HCy ($R^2 = 0.99727$), con un límite de detección de $285 \pm 10 \text{ nM}$.

El mecanismo por el cual sucede el desplazamiento del centro metálico es conocido como ensayo de desplazamiento por indicador. En este, el biotiol reduce al ion Cu(II) y al no ser el Cu(I) estable en un sitio de coordinación tipo pinza, este es expulsado.

Estos resultados son positivos para la utilización del complejo **1** como sensor luminiscente, soluble y selectivo en aplicaciones analíticas para la cuantificación de Hcy y CYS.

Asimismo, las tiras reveladoras muestran gran potencial para la creación de una prueba visual, rápida, accesible y de bajo costo para la cuantificación de Hcy y Cys.

X. Referencias

1. You, L., Zha, D. & Anslyn, E. V. Recent Advances in Supramolecular Analytical Chemistry Using Optical Sensing. *Chem. Rev.* **115**, 7840–7892 (2015).
2. Jung, H. S., Chen, X., Kim, J. S. & Yoon, J. Recent progress in luminescent and colorimetric chemosensors for detection of thiols. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6019–6031 (2013).
3. Bazany-Rodríguez, I. J., Martínez-Otero, D., Barroso-Flores, J., Yatsimirsky, A. K. & Dorazco-González, A. Sensitive water-soluble fluorescent chemosensor for chloride based on a bisquinolinium pyridine-dicarboxamide compound. *Sensors Actuators, B Chem.* **221**, 1348–1355 (2015).
4. Dorazco-González, A., Alamo, M. F., Godoy-Alcántar, C., Höpfl, H. & Yatsimirsky, A. K. Fluorescent anion sensing by bisquinolinium pyridine-2,6-dicarboxamide receptors in water. *RSC Adv.* **4**, 455–466 (2014).
5. Portillo-Iedesma, S. *et al.* Deconstructing the Catalytic Efficiency of Peroxiredoxin - 5 Peroxidatic Cysteine. (2014).
6. Goswami, L. N., Everett, T. A., Khan, A. A. & Hawthorne, M. F. Rational Design of a Stable Two One-Electron Redox-Active closo-Dodecaalkoxyborane Ion as Biothiol Sensor. *Eur. J. Inorg. Chem.* 377–381 (2020) doi:10.1002/ejic.201901136.
7. Reddie, K. G. & Carroll, K. S. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 746–754 (2008).
8. Isago, H., Fujita, H., Nakai, S. & Sugimori, T. Syntheses of Water-Soluble Silver(II)-Phthalocyanines toward Optical Sensing for Thiol Detection. *Inorg. Chem.* (2021) doi:10.1021/acs.inorgchem.1c00567.
9. Pastore, A. *et al.* Fully automated assay for total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, cysteamine, and 2-mercaptopropionylglycine in plasma and urine. *Clin. Chem.* **44**, 825–832 (1998).

10. Sharma, H., Kaur, N., Singh, A., Kuwar, A. & Singh, N. Optical chemosensors for water sample analysis. *J. Mater. Chem. C* 5154–5194 (2016) doi:10.1039/c6tc00605a.
11. Yang, Y., Li, Y., Zhi, X., Xu, Y. & Li, M. A red-emitting luminescent probe for sequentially detecting Cu²⁺ and cysteine/histidine in aqueous solution and its imaging application in living zebrafish. *Dye. Pigment.* **183**, 108690 (2020).
12. Maheshwaran, D., Priyanga, S. & Mayilmurugan, R. Copper(II)-benzimidazole complexes as efficient fluorescent probes for L-cysteine in water. *Dalt. Trans.* **46**, 11408–11417 (2017).
13. Escobedo, J. O. *et al.* Detection of Biological Thiols. *Rev. Fluoresc.* 2006 139–162 (2007) doi:10.1007/0-387-33016-x_6.
14. Seshadri, S. *et al.* Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **346**, 476–483 (2002).
15. Soria, C., Chadefaux, B., Coude, M., Gaillard, O. & Kamoun, P. Concentrations of total homocysteine in plasma in chronic renal failure. *Clin. Chem.* **36**, 2137–2138 (1990).
16. Nygård, O. *et al.* Plasma Homocysteine Levels and Mortality in Patients with Coronary Artery Disease. *N. Engl. J. Med.* **337**, 230–237 (1997).
17. Morgenstern, I., Raijmakers, M. T. M., Peters, W. H. M., Hoensch, H. & Kirch, W. Homocysteine, Cysteine, and Glutathione in Human Colonic Mucosa: Elevated Levels of Homocysteine in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Dig. Dis. Sci.* **48**, 2083–2090 (2003).
18. Townsend, D. M., Tew, K. D. & Tapiero, H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* **57**, 145–155 (2003).
19. Steed, J. W. & Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*. (Wiley, 2009).
20. Huheey, J. E. *Química Inorgánica*. (Oxford University Press, 2003).
21. Wang, W. Introductory Chapter: What is Chemical Sensor? *Progresses Chem. Sens.* 3–8 (2016) doi:10.5772/64626.
22. Kaur, N. *et al.* Anion sensing with chemosensors having multiple -NH recognition units. **95**, 86–109 (2017).
23. Gunnlaugsson, T., Akkaya, E. U., Yoon, J. & James, T. D. Fluorescent

- chemosensors: the past, present and future. **46**, (2017).
24. Wu, P. & Yan, X. P. Doped quantum dots for chemo/biosensing and bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 5489–5521 (2013).
 25. Martínez-Máñez, R. & Sancenón, F. Chemodosimeters and 3D inorganic functionalised hosts for the fluoro-chromogenic sensing of anions. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 3081–3093 (2006).
 26. Francis, P. S., Hogan, C. F. Luminescence. in *Comprehensive Analytical Chemistry* 343–373 (2008).
 27. Shriver, D. F., Atkins, P. W., Langford, C. H. *Química Inorgánica*. (Reverté, 2004).
 28. Caspar, J. V, Kober, E. M., Sullivan, B. P. & Meyer, T. J. Application of the energy gap law to the decay of charge-transfer excited states. *Society* 630–632 (1982).
 29. 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.* **40**, 3483–3495 (2011).
 30. Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence*. John Wiley & Sons (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012). doi:10.1002/9783527650002.
 31. Wu, B., Xue, T. & He, Y. Design of activatable red-emissive assay for cysteine detection in aqueous medium with aggregation induced emission characteristics. *Chinese Chem. Lett.* **32**, 932–937 (2021).
 32. Dai, Y. *et al.* A novel fluorescent probe for rapidly detection cysteine in cystinuria urine, living cancer/normal cells and BALB/c nude mice. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **225**, 117490 (2020).
 33. Yip, Y. W., Yan, Z., Law, G. L. & Wong, W. T. Reaction-Based Europium Complex for Specific Detection of Cysteine Over Homocysteine and Glutathione with Variable-Temperature Kinetic Studies. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2019**, 813–820 (2019).
 34. Chen, T., Pei, X., Yue, Y., Huo, F. & Yin, C. An enhanced fluorescence sensor for specific detection Cys over Hcy/GSH and its bioimaging in living cells. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **209**, 223–

- 227 (2019).
35. Huerta-Aguilar, C. A., Ramírez-Guzmán, B., Thangarasu, P., Narayanan, J. & Singh, N. Simultaneous recognition of cysteine and cytosine using thiophene-based organic nanoparticles decorated with Au NPs and bio-imaging of cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* **18**, 1761–1772 (2019).
 36. Wang, P., Duan, L. & Liao, Y. A retrievable and highly selective peptide-based fluorescent probe for detection of Cd²⁺ and Cys in aqueous solutions and live cells. *Microchem. J.* **146**, 818–827 (2019).
 37. Liu, L. *et al.* A specific fluorescent probe for fast detection and cellular imaging of cysteine based on a water-soluble conjugated polymer combined with copper(II). *Talanta* **198**, 128–136 (2019).
 38. Maiti, P. *et al.* Selective and sensitive detection of L-Cysteine via fluorometric assay using gold nanoparticles and Rhodamine B in aqueous medium. *Mater. Chem. Phys.* **234**, 158–167 (2019).
 39. Kang, J., Huo, F., Chao, J. & Yin, C. Nitroolefin-based BODIPY as a novel water-soluble ratiometric fluorescent probe for detection of endogenous thiols. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **195**, 16–20 (2018).
 40. Zhang, B. & Wei, C. A Label-Free Fluorescent Sensor Based on Structure-Switching Oligonucleotides for the Detection of Ag⁺, Biothiols and Acetylcholinesterase Activity. *ChemistrySelect* **2**, 6844–6849 (2017).
 41. Ganguly, M., Jana, J., Mondal, C., Pal, A. & Pal, T. Green synthesis of highly fluorescent Au(i)@Ag₂/Ag₃-thiolate core-shell particles for selective detection of cysteine and Pb(ii). *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 18185–18197 (2014).
 42. Wang, L., Yao, T., Shi, S., Cao, Y. & Sun, W. A label-free fluorescent probe for Hg²⁺ and biothiols based on graphene oxide and Ru-complex. *Sci. Rep.* **4**, 1–6 (2014).
 43. Xie, F., Tan, H., Li, Z. & Yang, H. A europium-based fluorescence probe for detection of thiols in urine. *Anal. Methods* **6**, 6990–6996 (2014).
 44. Li, G. Y. *et al.* Colorimetric and luminescent dual-signaling responsive probing of thiols by a ruthenium(II)-azo complex. *J. Inorg. Biochem.*

- 121**, 108–113 (2013).
45. Yang, X., Guo, Y. & Strongin, R. M. A seminaphthofluorescein-based fluorescent chemodosimeter for the highly selective detection of cysteine. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 2739–2741 (2012).
 46. Zhang, W. *et al.* Photoluminescent and electrochemiluminescent dual-signaling probe for bio-thiols based on a ruthenium(II) complex. *Anal. Chim. Acta* **740**, 80–87 (2012).
 47. Housecroft, C. E. & Sharpe, A. G. *Química Inorgánica*. (Pearson Educación S.A., 2006).
 48. Wilkinson, G. Volume 5 Late Transition Elements. *Comprehensive Coordination Chemistry* (1987).
 49. A. Dorazco-González. Use of Pincer Compounds as Metal-Based Receptors for Chemosensing of Relevant Analytes. in *Pincer Compounds. Chemistry and Application*. 587–598 (Elsevier, 2018).
 50. Morales-Morales, D. *Pincer Compounds*. (Elsevier, 2018).
 51. Kumar, P. & Gupta, R. The wonderful world of pyridine-2,6-dicarboxamide based scaffolds. *Dalt. Trans.* **45**, 18769–18783 (2016).
 52. Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry*. (Wiley, 2008).
 53. Hathaway, B. J., Billing, D. E. The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper(II) ion. *Elsevier* **5**, 143–207 (1970).
 54. Labanowska, M., Bidzińska, E., Para, A. & Kurdziel, M. EPR investigation of Cu(II)-complexes with nitrogen derivatives of dialdehyde starch. *Carbohydr. Polym.* **87**, 2605–2613 (2012).
 55. Li, Q., Guo, Y. & Shao, S. A BODIPY based fluorescent chemosensor for Cu(II) ions and homocysteine/cysteine. *Sensors Actuators, B Chem.* **171–172**, 872–877 (2012).