

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**  
**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y MATERIALES**

**Estudio de ligantes acíclicos bis-cromóforicos derivados EDTA y DTPA  
funcionalizados con naftaleno como sensores de  $Zn^{2+}$ .**



Para obtener el título de:  
**Maestro en Ciencia de Materiales**

Presenta:  
**Moises Vera Pacheco**

**Hermosillo, Sonora**

**Junio 2014**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## Forma de Aprobación

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Moises Vera Pacheco**, le han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de Maestro en Ciencia de Materiales

---

Dra. Lorena Machi Lara  
Directora de Tesis

---

Dra. Karen Lillian Ochoa Lara  
Secretaria

---

Dra. Dora Evelia Rodríguez Félix  
Sinodal

---

Dr. Adrián Ochoa Terán  
Sinodal Externo

---

Dr. Fernando Rocha Alonzo  
Sinodal Suplente

*A esa mujer hermosa que me dio la vida*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mi directora de tesis Dra. Lorena Machi Lara por el tiempo y esfuerzo invertido en este trabajo, por las aportaciones e ideas, por la forma de guiarme académicamente, por todo lo que he aprendido de ella. Además de las siguientes personas e instituciones gracias a las cuales se pudo realizar este trabajo:

- Universidad de Sonora
- Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales
- Dra. Hisila Santacruz Ortega
- CONACYT (por el proyecto No. Ref. 79272 y la beca otorgada)

De igual manera a mis sinodales quienes me aportaron sus opiniones y sugerencias que fueron bien recibidas para mejorar este trabajo, por el tiempo y paciencia para fortalecer este trabajo: Dra. Karen Lillian Ochoa Lara, Dra. Dora Evelia Rodríguez Félix, Dr. Adrián Ochoa Terán y al Dr. Fernando Rocha Alonzo

A mi familia que siempre está conmigo, por depositar una esperanza en lo que hago a mi hermano Omar que me inspira a ser mejor en lo que hago, a mis compañeros de laboratorio que ahora son mis amigos (Cuco, Lalo, Blanca, Vianey, Johanna, Yesenia, Yedith, Jan, Luis Miguel, Sheyla, Adilene y Sara) y a mis amigos que siempre me alientan a seguir adelante y siempre dar un poco más (Efraín, Mike, Monse, Gino, Fabián y Angelina), a mis compañeros de clases (Julieta, Judas, Jesús, Tomasa y Elizabeth) con quienes compartí y de los cuales también aprendí.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABLAS .....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
OBJETIVOS .....	3
Objetivo General .....	3
Objetivos Particulares.....	3
INTRODUCCIÓN .....	4
ANTECEDENTES .....	7
Importancia Biológica del Zinc .....	7
Absorción y excreción del Zinc.....	9
Deficiencia de zinc .....	10
Toxicidad del zinc .....	11
La Fluorescencia Molecular Como Herramienta Analítica.....	12
Quimiosensores Fluorescentes .....	14
Quimiosensores Fluorescentes de Zinc .....	19
Quimiosensores de Zinc Basados en Quinolina .....	20
Quimiosensores de Zinc Derivados de bis-(2-piridilmetil)amina .....	23
Poliaminas Cíclicas y Acíclicas Como Receptores Fluorescentes de Zinc .....	24
METODOLOGÍA.....	26
Materiales .....	26
Síntesis del Ligante <b>2</b> , (edta2nap)H <sub>2</sub> .....	27
Estudios de Coordinación Metálica en Solución.....	27
Estudios de Competencia .....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29

CONCLUSIONES .....	39
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES .....	40
REFERENCIAS .....	41
ANEXOS.....	45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quimiosensores <i>bis</i> -cromóforicos derivados de edta y dtpa funcionalizados con naftaleno. ....	6
Figura 2. Principales funciones del zinc en sistemas biológicos. ....	8
Figura 3. Quimiosensores espaciados de tipo CEQ y CEF. ....	15
Figura 4. Quimiosensores fluorescentes de calcio Fura-2 e Indo-1, <b>7</b> y <b>8</b> respectivamente. ....	16
Figura 5. Principales aspectos de un sensor molecular fluorescente para el reconocimiento de cationes (fluoroionóforos). ....	17
Figura 6. Diseño de quimiosensores fluorescentes de tipo <i>bis</i> -cromofóricos con respuesta monómero ( $\lambda_1$ ) y excímero ( $\lambda_2$ ). ....	18
Figura 7. Quimiosensores fluorescentes <i>bis</i> -cromóforicos solubles en agua funcionalizados con pireno. ....	19
Figura 8. 8-aminoquinolina (8-AQ) y la 8-hidroxiquinolina (8-HQ u oxina), <b>16</b> y <b>17</b> respectivamente. ....	21
Figura 9. Quimiosensores fluorescentes derivados de quinolinas. ....	22
Figura 10. Quimiosensor de zinc derivado de bis-(2-piridilmetil)amina. ....	24
Figura 11. Receptores tipo poliaminas acíclicas ....	25
Figura 12. Ecuación de reacción para la síntesis de (edta2nap)H <sub>2</sub> , <b>2</b> . ....	27
Figura 13. Espectros de emisión de los ligantes <b>1-6</b> , tomados a pH 7.2 en amortiguador MOPS, $\lambda_{exc}$ = 280 para los ligantes <b>2-6</b> y 330 nm para el ligante <b>1</b> . [ <b>1</b> ]= 5x10 <sup>-5</sup> M, [ <b>2</b> ]= 1x10 <sup>-5</sup> M y [ <b>3-6</b> ]= 1x10 <sup>-6</sup> M. ....	29
Figura 14. Espectros de emisión de los ligantes <b>1-6</b> en presencia de diferentes concentraciones de zinc, pH 7.2 (amortiguador MOPS). $\lambda_{exc}$ = 280 nm para los ligantes <b>2-6</b> y 330 nm para el ligante <b>1</b> . [ <b>1</b> ]= 5x10 <sup>-5</sup> M, [ <b>2</b> ]= 1x10 <sup>-5</sup> M y [ <b>3-6</b> ]= 1x10 <sup>-6</sup> M. ....	30
Figura 15. Variación en la intensidad de emisión a $\lambda$ = 350 nm (monómero) y 410 (excímero) en función de [Zn <sup>2+</sup> ]/[L] para los ligantes <b>2-6</b> y a 380 nm y 440 nm para el ligante <b>1</b> . Simbología: Ligante: <b>1</b> , ■; <b>2</b> , ●; <b>3</b> , ▲; <b>4</b> , ◆; <b>5</b> , ★; <b>6</b> , ×. ....	31
Figura 16. Espectros de emisión de los ligantes <b>1-6</b> en presencia de diferentes concentraciones de magnesio, pH 7.2 (amortiguador MOPS). $\lambda_{exc}$ = 280 nm para los ligantes 2-6 y 330 nm para el ligante <b>1</b> . [ <b>1</b> ]= 5x10 <sup>-5</sup> M, [ <b>2</b> ]= 1x10 <sup>-5</sup> M y [ <b>3-6</b> ]= 1x10 <sup>-6</sup> M. ....	32



Figura 17. Variación en la intensidad de emisión a $\lambda= 350$ nm (monómero) y 410 (excímero) en función de $[Mg^{2+}]/[L]$ para los ligantes <b>2-6</b> y 380 nm y 440 nm para el ligante <b>1</b> . Simbología: Ligante: <b>1</b> , ■; <b>2</b> , ●; <b>3</b> , ▲; <b>4</b> , ◆; <b>5</b> , ★; <b>6</b> , ×. ....	32
Figura 18. Espectros de emisión de los ligantes <b>1-6</b> en presencia de diferentes concentraciones de calcio, pH 7.2 (amortiguador MOPS). $\lambda_{exc}= 280$ nm para los ligantes <b>2-6</b> y 330 nm para el ligante <b>1</b> . $[1]= 5 \times 10^{-5}$ M, $[2]= 1 \times 10^{-5}$ M y $[3-6]= 1 \times 10^{-6}$ M. ....	33
Figura 19. Variación en la intensidad de emisión a $\lambda= 350$ nm (monómero) y 410 (excímero) en función de $[Ca^{2+}]/[L]$ para los ligantes <b>2-6</b> y 380 nm y 440 nm para el ligante <b>1</b> . Simbología: Ligante: <b>1</b> , ■; <b>2</b> , ●; <b>3</b> , ▲; <b>4</b> , ◆; <b>5</b> , ★; <b>6</b> , ×. ....	33
Figura 20. Cambios en la intensidad de fluorescencia de la banda de emisión de excímero y monómero del ligante <b>6</b> en presencia de los cationes metálicos Ca(II), Mg(II) y Zn(II) a pH 7.2 (amortiguador MOPS); el número de equivalentes del metal se indica con un coeficiente estequiométrico; $[L]= 1 \times 10^{-6}$ M, $\lambda_{em}= 410$ nm (excímero), 335 nm (monómero); $\lambda_{exc}= 280$ nm. ....	35
Figura 21. Cambios en la intensidad de fluorescencia de la banda de emisión de excímero y monómero del ligante <b>5</b> en presencia de los cationes metálicos Ca(II), Mg(II) y Zn(II) a pH 7.2 (amortiguador MOPS); el número de equivalentes del metal se indica con un coeficiente estequiométrico; $[L]= 1 \times 10^{-6}$ M, $\lambda_{emi}= 410$ nm (excímero), 335 nm (monómero); $\lambda_{exc}= 280$ nm. ....	36
Figura A 1. Espectro de RMN $^1H$ de <b>2</b> ((edta2nap)H <sub>2</sub> ) en D <sub>2</sub> O, pH 10.47. ....	45
Figura A 2. Espectro de Infrarrojo de <b>2</b> ((edta2nap)H <sub>2</sub> ). ....	45

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones y $\lambda_{\text{exc}}$ utilizadas en los diferentes estudios de coordinación para los ligantes <b>1-6</b> . .....	28
Tabla A 1. Diámetro iónico, densidad de carga y número de coordinación de algunos cationes.	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

DMF: N,N-dimetilformamida

DPA: *bis*-(2-piridilmetil)amina

DTPA: ácido dietilentriaminopentaacético

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

IR: Infrarrojo

L: Ligante

M: Metal

MOPS: ácido-3-(*N*-morfolino)-propanosulfónico

nm: nanómetros

RMN: resonancia magnética nuclear

RPE: resonancia paramagnética electrónica

UV: ultravioleta

$\lambda$ : longitud de onda

$\lambda_{em}$ : longitud de onda de emisión

$\lambda_{exc}$ : longitud de onda de excitación

## RESUMEN

En este trabajo se realizaron estudios de coordinación metálica dirigidos a los iones  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  mediante espectroscopia de fluorescencia en amortiguador MOPS a  $pH=7.2$ , con seis ligantes acíclicos derivados de edta o dtpa:  $(edta1nap)H_2$ , **1**;  $(edta2nap)H_2$ , **2**;  $(edta1mnap)H_2$ , **3**;  $(edta2mnap)H_2$ , **4**;  $(dtpa1nap)H_3$ , **5** y  $(dtpa2nap)H_3$ , **6**. Los ligantes **1-6** presentan respuestas fluorescentes de diferente tipo al coordinar con los metales, dicha respuesta depende de la longitud de la cadena de interconexión, el sitio de unión de los grupos cromóforos y la presencia de grupos espaciadores metileno en la estructura. Los ligantes derivados de dtpa **5** y **6** fueron insensibles a la presencia de calcio o magnesio, pero presentan cambios de tipo radiométrico en sus espectros de fluorescencia al coordinar a zinc. Esta respuesta se mantiene aún en presencia de calcio y/o magnesio, lo cual indicó el potencial de los compuestos **5** y **6** de ser aplicados como quimiosensores fluorescentes de zinc en amortiguador MOPS a  $pH=7.2$ .

## ABSTRACT

In this work, was performed a coordination study of  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  by fluorescence spectroscopy in buffer MOPS at pH= 7.2, with six acyclic ligands EDTA or DTPA derivatives: (edta1nap) $H_2$ , **1**; (edta2nap) $H_2$ , **2**; (edta1mnap) $H_2$ , **3**; (edta2mnap) $H_2$ , **4**; (dtpa1nap) $H_3$ , **5** y (dtpa2nap) $H_3$ , **6**. The fluorescent ligands **1-6** have different responses to coordination with metals, such a response depends on the chain length of interconnection, the binding site of the groups chromophores and the presence of methylene groups spacers in the structure. The DTPA derivatives **5** and **6** were insensitive to the presence of calcium or magnesium, but their fluorescence spectra change in a radiometric mode to coordination to zinc. This response is maintained even in the presence of calcium or/and magnesium, which indicated the potential for compounds **5** and **6** to be applied as fluorescent chemosensors zinc in buffer MOPS at pH= 7.2.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

- Evaluar las propiedades de coordinación a zinc de una serie de ligantes acíclicos tipo *bis*-naftil derivados de edta o dtpa con el propósito de establecer su potencial de aplicación como quimiosensores fluorescentes de dicho metal.

### Objetivos Particulares

- Realizar estudios de coordinación dirigidos hacia zinc, calcio y magnesio, en medio acuoso a pH=7.2, utilizando la técnica de espectroscopia de fluorescencia, con los ligantes: (edta1nap)H<sub>2</sub>, **1**; (edta2nap)H<sub>2</sub>, **2**; (edta1mnap)H<sub>2</sub>, **3**; (edta2mnap)H<sub>2</sub>, **4**; (dtpa1nap)H<sub>3</sub>, **5** y (dtpa2nap)H<sub>3</sub>, **6**.
- Llevar a cabo estudios de competencia para determinar la selectividad de los ligantes **1-6** por el ion metálico zinc frente a los cationes interferentes calcio y magnesio.
- Evaluar el efecto de las diferencias estructurales entre los compuestos **1-6** en el tipo de respuesta fluorescente a la coordinación metálica.
- Establecer el potencial de aplicación de los compuestos **1-6** como quimiosensores fluorescentes de zinc en agua a pH fisiológico (pH= 7.2).

## INTRODUCCIÓN

El zinc se caracteriza por ser un metal que está distribuido ampliamente en la corteza terrestre, y ocupa la posición número 23 de la lista de elementos más abundantes (0.12% de abundancia).<sup>1,2</sup> El zinc es muy importante en los sistemas biológicos como componente estructural o funcional de cientos de enzimas implicadas en procesos tales como la replicación de ADN y ARN, apoptosis, expresión génica, catálisis metaloenzimática, neurotransmisión, respiración celular, entre otras.<sup>2,3</sup>

Los niveles de zinc en nuestro organismo están regulados por la metalotioneína y proteínas transportadoras como es el caso de la albúmina. Gran parte de las funciones del zinc están a nivel neurobiológico, por lo que valores anormales de este metal se relacionan fácilmente con la muerte selectiva de células neuronales, lo cual provoca enfermedades tales como epilepsia, isquemia global transitoria, daño cerebral, Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Wilson y esclerosis lateral amiotrófica. Incluso, valores anormales de zinc han sido relacionados con algunos tipos de cáncer.<sup>2,3</sup>

Aunque la significancia del zinc en los sistemas biológicos ha sido muy reportada, muchos de los mecanismos de acción específicos aún son desconocidos, al igual que la función del catión en su forma libre. En consecuencia, detectar zinc en un intervalo nanomolar-milimolar en condiciones fisiológicas tiene una gran importancia y es una de las razones de la demanda creciente de sensores de este analito en sistemas vivos. De igual manera la imagenología del zinc es crucial para la elucidación de la concentración, distribución, cinética y funciones de dicho metal en las células y los tejidos.<sup>4</sup>

Las técnicas de fluorescencia son herramientas poderosas y atractivas para la detección de diversos elementos debido a su simplicidad y sensibilidad. Así, un gran número de sensores moleculares fluorescentes han sido diseñados y se encuentran disponibles para detectar tipos diferentes de iones metálicos, incluido el zinc, en células vivas.<sup>5</sup>

En el proceso de detección por fluorescencia de los iones, el aumento de fluorescencia ("turn-on") es preferible a la extinción de la fluorescencia ("turn-off"), ya que esto disminuye la probabilidad de falsos positivos provocados por la presencia de otros extintores presentes en la

muestra.<sup>1</sup> Muchos sensores fluorescentes “turn-on” han sido aplicados para imagenología intracelular. Sin embargo, la mayoría de estas moléculas presentan cambios en la intensidad de emisión a una sola longitud de onda (señal de detección única), por lo que su respuesta tiende a ser afectada por varios factores tales como la eficiencia instrumental, condiciones ambientales y la concentración de la sonda. En cambio, el uso de sondas radiométricas, las cuales presentan cambios simultáneos en bandas de fluorescencia a dos longitudes de onda, pueden eliminar la mayoría de estas interferencias en función de la corrección interna de estas dos bandas.<sup>6</sup>

En el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora (DIPM-UNISON), en el área de Química Supramolecular, se trabaja en el desarrollo de quimiosensores fluorescentes específicos para la detección y cuantificación de metales pesados como el zinc. Se espera que estos compuestos puedan ser utilizados como herramienta de análisis químico cualitativo y cuantitativo aprovechando su selectividad y sensibilidad. Entre los quimiosensores que se han preparado en el DIPM-UNISON se encuentran los ligantes biscromóforos de naftaleno con cadenas de interconexión tipo edta y dtpa. Los compuestos reportados por L. Machi *et al.*<sup>7-9</sup> son: (edta1nap)H<sub>2</sub>, (edta2nap)H<sub>2</sub>, (edta1mnap)H<sub>2</sub>, (edta2mnap)H<sub>2</sub>, (dtpa1mnap)H<sub>3</sub> y (dtpa2mnap)H<sub>3</sub> (**1-6**, Figura 1). Los compuestos **1-6** son solubles en agua y presentan bandas de emisión de fluorescencia tanto de naftaleno monomérico (~330-350 nm) como de excímeros de naftaleno (~ 400-410 nm). La coordinación de algunas de estas moléculas a zinc a pH= 10 produce atractivas respuestas fluorescentes. Por ejemplo, el ligante **2** respondió de manera radiométrica a la coordinación a zinc con incremento en la intensidad de emisión de excímero y disminución en la intensidad de emisión de monómero.<sup>7</sup> De igual forma, el ligante **4** se comportó como sensor radiométrico de zinc,<sup>8</sup> en este caso con un efecto inverso al que presentó el ligante **2**. Por otro lado, al formarse el complejo de zinc, la banda de emisión de excímero del ligante **1** incrementó casi tres veces su intensidad y se desplazó 20 nm hacia al azul.<sup>7</sup> A pesar de la relevancia de estos resultados, es importante realizar estudios adicionales de coordinación a zinc con los ligantes **1-6** bajo condiciones fisiológicas. Esto debido a que, como se describió en los párrafos anteriores, el zinc es un metal de gran importancia a nivel biológico.

Con base en lo anteriormente descrito, en este trabajo de tesis se planteó la realización de estudios de coordinación metálica a zinc en medio acuoso y bajo condiciones fisiológicas de pH (pH=7.2) con los ligantes **1-6** y la evaluación del efecto que tiene la longitud de la cadena de



interconexión, la posición de los grupos cromóforos y la presencia de grupos espaciadores metileno en las propiedades fluorescentes de dichos compuestos.

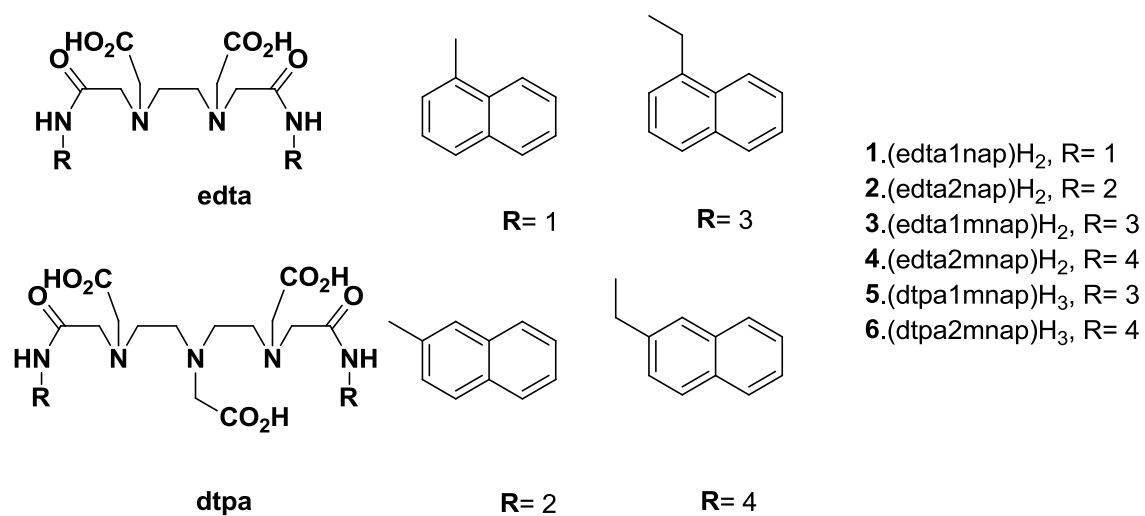


Figura 1. Quimiosensores *bis*-cromóforicos derivados de edta y dtpa funcionalizados con naftaleno.

## ANTECEDENTES

### Importancia Biológica del Zinc

El zinc juega un papel muy importante en los sistemas biológicos, es un oligoelemento esencial que actúa como componente estructural o en el sitio activo de las enzimas.<sup>1</sup> Actúa como cofactor y como integrante de al menos 300 enzimas (como aldolasas, deshidrogenasas, esterases, peptidasas, fosfatasa alcalina, anhidrasa carbónica, superóxidodismutasa, ADN- y ARN-polimerasas, entre otras) implicadas en el metabolismo energético y de los carbohidratos, en las reacciones de biosíntesis y degradación de proteínas, en procesos biosintéticos de ácidos nucleicos y compuestos hemo, en el transporte de CO<sub>2</sub>, etc. Por ser un ion intracelular, el zinc se encuentra en su mayoría en el citosol.<sup>2</sup> Este metal participa en procesos muy importantes como son la replicación tanto de ADN como de ARN, la apoptosis, transducción de señales, la expresión génica, la catálisis metaloenzimática, la neurotransmisión, la respiración celular, el mantenimiento de la integridad de la membrana celular y la eliminación de radicales libres. Este último es un proceso que se hace a través de una cascada de sistemas enzimáticos y es esencial para el crecimiento desde la concepción.<sup>2,3</sup>

Los iones de zinc son bien conocidos por jugar papeles diferentes en los procesos biológicos, tales como los que se muestran en la Figura 2.<sup>10</sup> El papel más importante y el más conocido para el zinc es como un cofactor estructural en metaloproteínas. Durante el último medio siglo, cientos de proteínas que poseen uno o más motivos estructurales de zinc han sido identificadas y clasificadas en varias grandes familias. Inicialmente el zinc fue encontrado en el factor de transcripción IIIA (TF IIIA), el motivo estructural Cis<sub>2</sub>His<sub>2</sub> interactúa con Zn<sup>2+</sup> para proveer un dominio de unión a ácidos nucleicos. Dichos dominios son conocidos como "dedos de zinc".<sup>11</sup> Los iones de zinc son directamente asociados con la regulación de la expresión génica a través de proteínas metal-reguladoras como el factor de transcripción factor-1(MTF-1) que actúa como un sensor de zinc celular. Muchas enzimas hidrolíticas contienen iones de Zn<sup>2+</sup> en el sitio activo, ya que el zinc coordinado al agua o al hidróxido, es un excelente agente nucleofílico. Por ejemplo, en el centro catalítico de la anhidrasa carbónica humana II (CA II), el zinc está coordinado por tres fragmentos de histidina y una molécula de agua. En pruebas *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que el zinc puede ser un importante regulador de la apoptosis celular. Además, los iones de Zn<sup>2+</sup> se presentan en la mayoría de ADN o ARN polimerasas.<sup>12</sup>

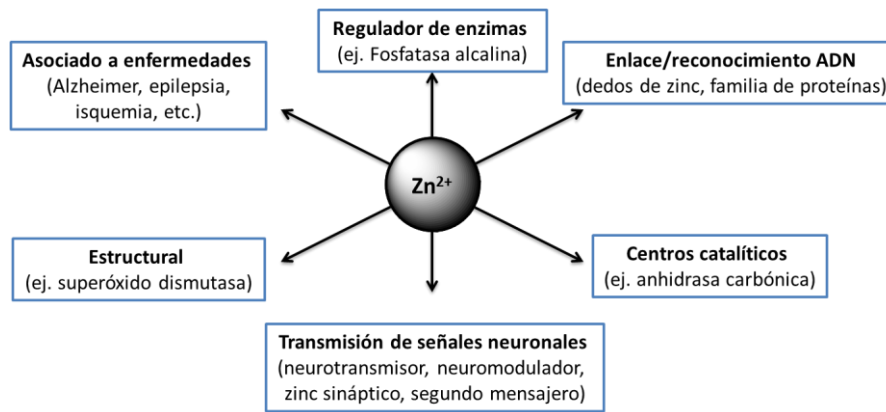


Figura 2. Principales funciones del zinc en sistemas biológicos.

Los roles neurológicos del zinc han tenido una atención especial, se ha postulado que el  $Zn^{2+}$  liberado sinápticamente modula la excitabilidad del cerebro a través del alojamiento de los receptores de aminoácidos. Los iones de zinc no sólo funcionan como neurotransmisores o neuromoduladores convencionales para las neuronas presinápticas, sino que también funcionan como una señal neuronal transmembranal que atraviesa las neuronas post-sinápticas y compartimentos en vesículas sinápticas. En esta vía de señalización, los transportadores de zinc (Zn-Ts) son los responsables de la transferencia de iones de  $Zn^{2+}$  a través de la membrana y de compartimentar al zinc en las vesículas sinápticas. El zinc liberado sinápticamente puede actuar como un segundo mensajero, como el  $Ca^{2+}$  para la potenciación a largo plazo en el hipocampo. Recientemente, se ha reportado que la metaloproteína-III (MT-III), en su forma cerebral de la familia MT, podría ser responsable de la conversión de señales de NO (Óxido nítrico) en señales de  $Zn^{2+}$ .<sup>12</sup>

Un trastorno del metabolismo del zinc está asociado estrechamente con muchas enfermedades neurológicas graves tales como la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, isquemia por hipoxia y epilepsia. Los iones de  $Zn^{2+}$  liberados durante la neurotransmisión pueden inducir la formación de placas seniles de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). Estas placas se producen en la enfermedad de Alzheimer. La correlación entre la superóxido dismutasa de cobre-zinc (Cu-Zn SOD) y de la enfermedad de esclerosis lateral amiotrófica ha sido conocida durante casi por una década. Además, la evidencia clínica ha mostrado que el zinc nutricional ayuda a la cicatrización de las heridas a través de una familia de endopeptidasas dependientes de zinc con nombre metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Hay un margen amplio para la exploración de las diversas funciones fisiológicas del zinc, especialmente

la neural "zinc libre" (a veces referido, como no ligado o zinc débilmente unido). Por lo tanto, es deseable una técnica sensible y no invasiva con el fin de lograr imágenes locales en tiempo real.

El zinc es un metal indispensable para la vida y un cuerpo humano adulto contiene 2-3 g de zinc.<sup>2</sup> Las concentraciones más elevadas de zinc se encuentran en el cerebro, hígado, páncreas, riñones, huesos y músculos voluntarios, aunque se encuentran también concentraciones importantes en el ojo, próstata, espermatozoides, piel, pelo y uñas. Este metal puede ser visualizado por un colorante fluorescente. Para valorar su estatus en el organismo se usan principalmente como biomarcadores los niveles en suero, plasma y eritrocitos.<sup>13</sup> En el cerebro, el zinc libre existe a una concentración milimolar en las vesículas de las neuronas presinápticas y es liberado por la actividad sináptica o despolarización, así como por la modulación de las funciones de ciertos canales iónicos y receptores. Aunque la función del  $Zn^{2+}$  en algunos procesos biológicos es conocida, el mecanismo de acción específico es aún desconocido.<sup>4</sup>

### ***Absorción y excreción del Zinc***

Entre el 3 y el 38% del zinc de la dieta se absorbe en el tubo digestivo proximal. Esta absorción del zinc parece estar regulada por la síntesis de una proteína intestinal denominada metalotioneína (proteína de bajo peso molecular rica en cisteína) que tiene la capacidad de ligar diferentes metales como el  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ . Esta proteína actúa como ligando que amortigua la absorción del zinc. La absorción también depende de las cantidades de zinc en la dieta y la presencia de sustancias que interfieren con él, tales como:

- Fibra y fitatos, que forman complejos y disminuyen su absorción
- Calcio, cobre y cadmio, que compiten y pueden reemplazar al zinc en la proteína transportadora, por lo que dificultan su absorción.
- La glucosa, la lactosa y determinadas proteínas que favorecen la absorción de zinc.

El zinc liberado por las células intestinales en los capilares mesentéricos es transportado hasta el hígado siendo la albúmina la proteína transportadora más importante, de forma que el 70% del zinc plasmático se encuentra unido a la albúmina y el resto a la alfa-2-macroglobulina, transferrina y algunos aminoácidos como cisteína e histidina. La mayor parte del zinc es intracelular. El 90% se distribuye principalmente en los tejidos óseo y muscular y el resto se localiza en la piel, el hígado, el páncreas, la retina, las células hemáticas y los tejidos gonadales en el varón. El zinc contenido en los hematíes, músculo, pelo y testículos se intercambia más

rápidamente que el contenido en el esqueleto y dientes. La sangre total contiene aproximadamente diez veces más zinc que el plasma, debido a la presencia de este catión en la enzima eritrocitaria anhidrasa carbónica.<sup>2, 13</sup>

El zinc se excreta por las heces a través de las secreciones pancreáticas e intestinales y en menos de un 2% por la orina, viéndose aumentadas las pérdidas renales en pacientes con nefrosis, alcoholismo, cirrosis hepática, y con estados de estrés metabólico. Otras vías de excreción de zinc son el sudor, el crecimiento del pelo y la descamación de la piel.<sup>13</sup>

### ***Deficiencia de zinc***

Los estados carenciales de zinc pueden estar causados por factores diferentes como ingesta insuficiente, problemas en la absorción intestinal o pérdidas corporales excesivamente elevadas, así como el padecimiento de determinadas enfermedades. Las manifestaciones clínicas secundarias a la deficiencia de zinc en adultos se han descrito principalmente en pacientes que recibían nutrición parenteral pobre o exenta de este elemento, en pacientes con pérdidas importantes de líquidos gastrointestinales y en los sometidos a diálisis crónica. En pacientes quemados, con disfunciones renales y hemodializados también es frecuente el desarrollo de deficiencias. La deficiencia de este elemento en niños y jóvenes se debe a la falta o escasez de alimentos de origen animal, dieta con un alto contenido en fitatos, ingesta inadecuada de alimentos y por un incremento de las pérdidas fecales, puede ocasionar retraso en el crecimiento y en el desarrollo neuronal, diarrea, alteraciones inmunitarias e incluso en algunos casos la muerte.<sup>13</sup>

Las manifestaciones principales de la deficiencia de zinc son dermatitis, alopecia, alteraciones en el sentido del gusto, anorexia, retraso en la cicatrización de las heridas, alteraciones inmunológicas y disminución de los niveles de fosfatasas alcalinas, habiéndose postulado la deficiencia de zinc como un factor importante en la patogenia de la esquizofrenia. Hay estudios epidemiológicos que sugieren que una deficiencia de zinc puede estar asociada con un incremento en el riesgo de padecer cáncer. Esto es debido a que tanto su participación en la función inmunológica, como sus propiedades antioxidantes y frente al estrés oxidativo, proporcionan a este elemento una actividad preventiva frente al cáncer. Las carencias de zinc causadas por defectos congénitos de la capacidad de absorción intestinal, dan lugar a

acrodermatitis enteropática acompañada de lesiones cutáneas, diarreas, pérdidas de cabello, conjuntivitis, fotofobia, opacidad corneal, irritabilidad, temblores y ataxia ocasional. Asimismo se ha asociado a estados carenciales de zinc el tratamiento de la enfermedad de Wilson con penicilamina. Normalmente concentraciones de zinc en plasma y cabello inferiores a 50 mg/100 mL ó 70 mg/100 mL, respectivamente, son indicativas de deficiencia, aunque es conveniente la determinación del contenido de anhidrasa carbónica de hematíes, fosfatasa alcalina en suero y saliva y medición de la absorción y excreción utilizando zinc.<sup>13</sup>

### ***Toxicidad del zinc***

El exceso de zinc en el cuerpo humano resulta nocivo y está asociado a una variedad de reacciones contraproducentes para nuestro organismo, principalmente reacciones citotóxicas. El metabolismo anormal de zinc está asociado con muchos problemas de salud, que van desde enfermedades de la piel hasta el cáncer de próstata, diabetes y enfermedades del cerebro. Hay alrededor de 0.1-0.5 mmol de zinc en el tejido cerebral, más alto que en cualquier otro órgano. Una gran cantidad de zinc se acumula en las células nerviosas, donde el nivel de zinc iónico es estrictamente regulado por proteínas transportadoras de zinc y metalotioninas, variaciones de estos requerimientos son perjudiciales para la supervivencia de las células. Se ha reportado que valores anormales de zinc o alteraciones en la homeostasis del zinc puede causar una muerte selectiva de células neurales con graves efectos, incluyendo epilepsia, isquemia global transitoria, daño cerebral y problemas como Alzheimer, Parkinson y enfermedad Wilson, esclerosis lateral amiotrófica y algunas enfermedades causadas por priones.<sup>2</sup>

A pesar de que el zinc es el menos tóxico de todos los oligoelementos, y aunque su margen de seguridad (diferencia entre la dosis tóxica y la dosis recomendada) es muy amplio, es necesario evaluar su toxicidad. Ello se puede establecer mediante el estudio de la Tolerable Upper Intake Level (UL), que se define como el nivel más alto de la ingesta diaria de un nutriente que no supone un riesgo o efectos adversos sobre la salud de casi todos los individuos. Este parámetro se calcula a partir de la ingesta total. Para el Zn proveniente tanto de los alimentos, como del agua y suplementos el UL es de 40 mg/día.<sup>13</sup>

Existen ciertos trabajos que indican el desarrollo de posibles alteraciones como consecuencia de la ingestión de dosis moderadamente elevadas durante períodos de tiempo más o menos largos. Se ha demostrado como en hombres, un consumo elevado de suplementos de zinc

produce un riesgo significativamente mayor de cáncer avanzado de próstata, así como la inhibición de los efectos beneficiosos de los biofosfonatos, el incremento de los niveles de testosterona, incremento de colesterol, reducción de los niveles de HDL (High Density Lipoprotein) y puede fomentar una disfunción inmune. Una suplementación con zinc, especialmente en dosis altas, también puede producir otros efectos adversos como interferir y disminuir el estatus corporal de cobre. La inhalación de cantidades altas de este metal, concretamente en forma de cloruro de zinc, puede causar neumonitis y un síndrome respiratorio en el adulto. El zinc produce citotoxicidad por un detrimento de los niveles de glutatión reducido y un incremento de los niveles de la forma oxidada del glutatión *in vitro*. También *in vitro* a niveles elevados, produce muerte celular debido a que en primer lugar es capaz de generar especies reactivas de oxígeno y en segundo lugar a que activa la cascada de la MAP-kinasa.<sup>13</sup>

### **La Fluorescencia Molecular Como Herramienta Analítica.**

A diferencia de otros metales de transición biológicos como el  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ , el  $\text{Zn}^{2+}$  no tiene señales espectroscópicas o magnéticas por su configuración electrónica  $3d^{10}4s^0$ , y las técnicas analíticas comunes tales como espectroscopia UV-Vis, espectroscopia de Mössbauer, resonancia magnética nuclear (RMN) y la resonancia paramagnética electrónica (RPE) no se pueden aplicar para detectar este ion metálico en los sistemas biológicos. Por lo tanto, el método de fluorescencia se destaca como un método analítico de elección.<sup>12</sup>

Las técnicas analíticas basadas en detección por fluorescencia son muy utilizadas debido a su sensibilidad alta y selectividad elevada, junto con las ventajas de resolución espacial y temporal y la posibilidad de sensado remoto mediante fibras ópticas.<sup>14</sup> La aplicación de técnicas basadas en fluorescencia se ha reportado en áreas diversas, como son: análisis de los contaminantes del aire y el agua, aceites, alimentos, medicamentos, monitorización de procesos industriales, de especies de relevancia clínica, criminología, etc.

Cuando un analito es fluorescente, la detección fluororimétrica directa es posible por medio de un espectrofluorómetro que opere a las longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas para el análisis de dicha molécula.<sup>14</sup> Sin embargo, la mayoría de los iones y moléculas no son fluorescentes y los principales métodos fluorimétricos indirectos que se utilizan en este caso son los siguientes:

- Formación de un complejo fluorescente, esta es la base de la mayoría de los métodos de reconocimiento de iones y moléculas.
- Derivación, es decir: la reacción del analito con un reactivo apropiado que conduce a formar un compuesto fluorescente. Este método a menudo se utiliza en combinación con cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia. En la actualidad los campos de aplicación de la derivación son en bioquímica y en la química clínica.
- Apagamiento de la fluorescencia resultante de la colisión del analito con un compuesto fluorescente. Este método está particularmente bien adaptado a la detección de gases como el oxígeno disuelto en agua o sangre, SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, amoníaco, HCl, Cl<sub>2</sub>, clorocarbonos, etc.

Los fluoróforos se dividen en dos clases generales como intrínsecos y extrínsecos. Los fluoróforos intrínsecos son aquéllos que se producen de forma natural, mientras que fluoróforos extrínsecos son aquellos que añaden a una muestra que no presenta las propiedades espectrales deseadas.<sup>14</sup>



## Quimiosensores Fluorescentes

El uso de la fluorescencia se ha expandido y es ahora una metodología dominante utilizada ampliamente en citometría de flujo en biotecnología, diagnóstico médico, secuenciación de ADN, análisis forense y análisis genético, por mencionar algunas. La detección por fluorescencia es muy sensible, y ya no hay que preocuparse por los costos y dificultades de manipulación de marcadores radiactivos para la mayoría de las mediciones bioquímicas. Ha habido un crecimiento dramático en el uso de la fluorescencia de imagen celular y molecular; por medio de imagenología por fluorescencia se puede revelar la localización e incluso realizar mediciones de moléculas intracelulares, en ocasiones el nivel de detección de una sola molécula. En pocas palabras la tecnología de fluorescencia es utilizada por los científicos de muchas disciplinas.<sup>15</sup>

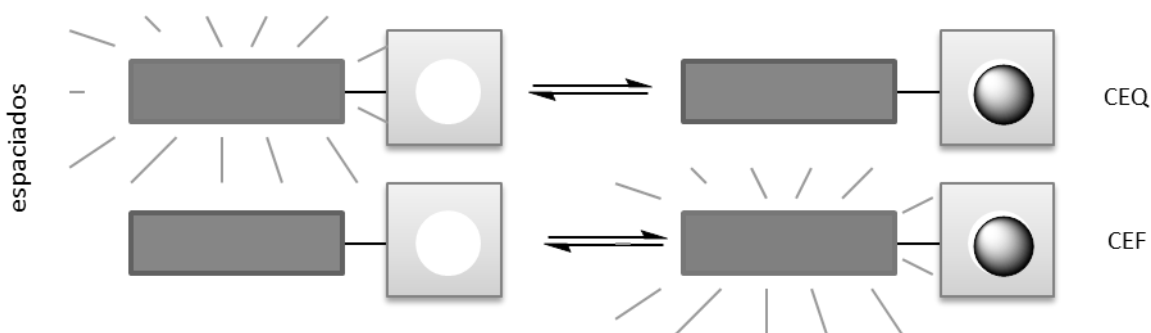
El estudio moderno de la fluorescencia comenzó a mediados del siglo XIX, después de los trabajos de Stokes,<sup>16</sup> quien propuso el uso de este fenómeno físico para la detección de sustancias orgánicas. De inmediato, la fluorescencia fue utilizada ampliamente como una herramienta analítica poderosa, pero el concepto de quimiosensor apareció después de los años 70's.<sup>14</sup>

Es importante hacer una distinción clara entre una unidad molecular que responde a la presencia de un analito, por ejemplo un fluoróforo que experimenta cambios en sus propiedades fluorescentes, y un dispositivo sensor óptico completo que incluye la fuente de luz, la unidad molecular indicadora inmovilizada apropiadamente (ej. en polímeros plastificados, matrices sol-gel, etc.), el sistema óptico (que puede o no involucrar fibra óptica) y el detector de luz (fotomultiplicador o fotodiodo) conectado a la electrónica apropiada para mostrar la señal. En principio, un sensor fluorescente es el dispositivo completo, aunque con frecuencia se asigna este término a la unidad molecular fluorescente encargada de emitir la señal de reconocimiento. Para evitar confusión, es recomendable nombrar a esta última como “sensor molecular fluorescente” o bien “quimiosensor fluorescente”.<sup>17</sup>

En los últimos años, dentro del área de la química supramolecular, los esfuerzos se han enfocado en el diseño de quimiosensores fluorescentes que cumplan con la finalidad de coordinarse específicamente a algún analito de interés y lo expresen mediante algún tipo de señal fluorimétrica,<sup>18</sup> ya sea por efecto de apagamiento o incremento de la intensidad de emisión, o bien por desplazamiento de las bandas en el espectro. Esto permite no solo detectar la presencia

del analito sino también abre la posibilidad de llevar a cabo determinaciones cuantitativas.<sup>19</sup> Czarnik fue quien introdujo el concepto de quimiosensor, definido como una molécula que contiene un sitio de enlace (receptor), un fluoróforo (sensor) y un mecanismo de comunicación entre los dos (a través de un espaciador).<sup>20</sup>

El diseño de sensores fluorescentes de metales ha sido recientemente una de las áreas más activas de investigación ya que estos materiales pueden proveer información *in situ* y en tiempo real, para un gran número de aplicaciones como la monitorización ambiental, control de procesos industriales, metaloneuroquímica y diagnóstico biomédico. Principalmente la detección de iones metálicos específicos bajo condiciones fisiológicas resulta importante en aplicaciones biológicas y ambientales.<sup>5</sup> Para esta tarea una estrategia utilizada ampliamente es unir a través de un espaciador la porción para el reconocimiento metálico (unidad ionófora) con un residuo o unidad fluorescente (fluoróforo) (ver Figura 3).<sup>21</sup> En estos casos, las características del grupo espaciador son un aspecto muy importante en el diseño del quimiosensor, ya que se busca lograr una perturbación mayor de las propiedades fotofísicas del fluoróforo al coordinarse al catión.



CEQ (Chelation Enhancement of Quenching) *quelación que apaga de la fluorescencia.*  
CEF (Chelation Enhancement of Fluorescence) *quelación que incrementa la fluorescencia.*

Figura 3. Quimiosensores espaciados de tipo CEQ y CEF.

A pesar de la flexibilidad deseable en el diseño de quimiosensores basados en la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda única, hay desventajas inherentes a este tipo de sistemas de señalización. La desventaja más importante es que la intensidad de fluorescencia también puede variar en muestras complejas por razones distintas a la concentración del analito, entre ellas: cambios en el pH, fotoblanqueo (descomposición del fluoróforo mediada por la fuente de luz), la compartimentación al interior de las células (en el caso de sensores para determinación intracelulares), cambios en el microambiente y dispersión de la luz. Una estrategia que se ha

seguido para evitar estos inconvenientes es diseñar quimiosensores radiométricos, los cuales presenten cambios simultáneos en la fluorescencia (emisión o excitación) a dos longitudes de onda distintas. La corrección interna entre estas dos bandas elimina la mayoría de las interferencias mencionadas.<sup>6</sup>

Existen reportados en la literatura una diversidad de quimiosensores fluorescentes de metales con propiedades radiométricas.<sup>22</sup> Algunos de estos compuestos se han comercializado y se utilizan principalmente en áreas biológicas para la determinación de metales a nivel intracelular. Como ejemplo se pueden citar los indicadores de calcio intracelular Fura-2 e Indo-1 (**7** y **8**, Figura 4) los cuales al ser excitados con luz ultravioleta exhiben dependencias radiométricas de sus espectros de fluorescencia en función de la concentración de calcio. En el caso de Fura-2, el cambio se da en el espectro de excitación; el máximo se desplaza de 362 a 335 nm al incrementarse la concentración de calcio. En el caso de Indo-1, el desplazamiento se observa en la banda de emisión, de 485 a 410 nm. Ambos indicadores pertenecen a la categoría de los fluoroionóforos y su modo de señalización (cambio fotofísico) está basado en una transferencia de carga intramolecular inducida por la complejación (ver

Figura 5).

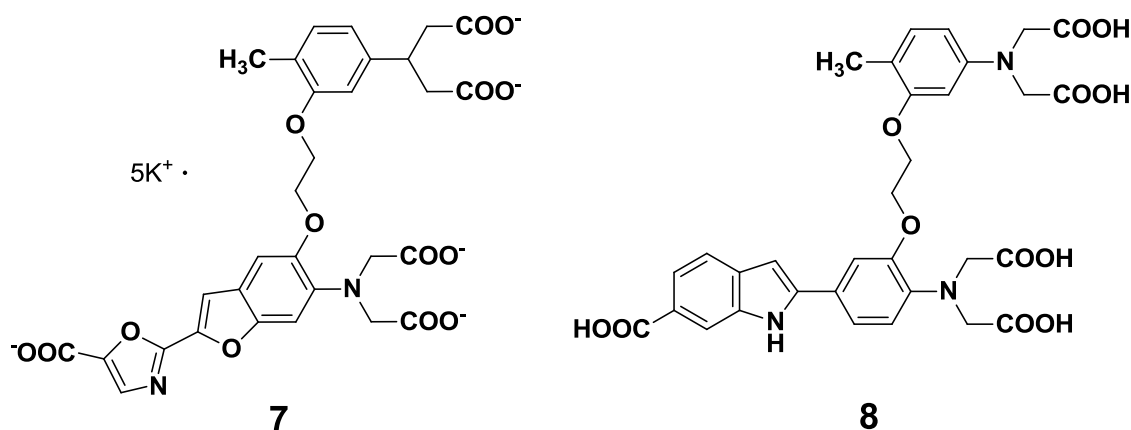


Figura 4. Quimiosensores fluorescentes de calcio Fura-2 e Indo-1, **7** y **8** respectivamente.

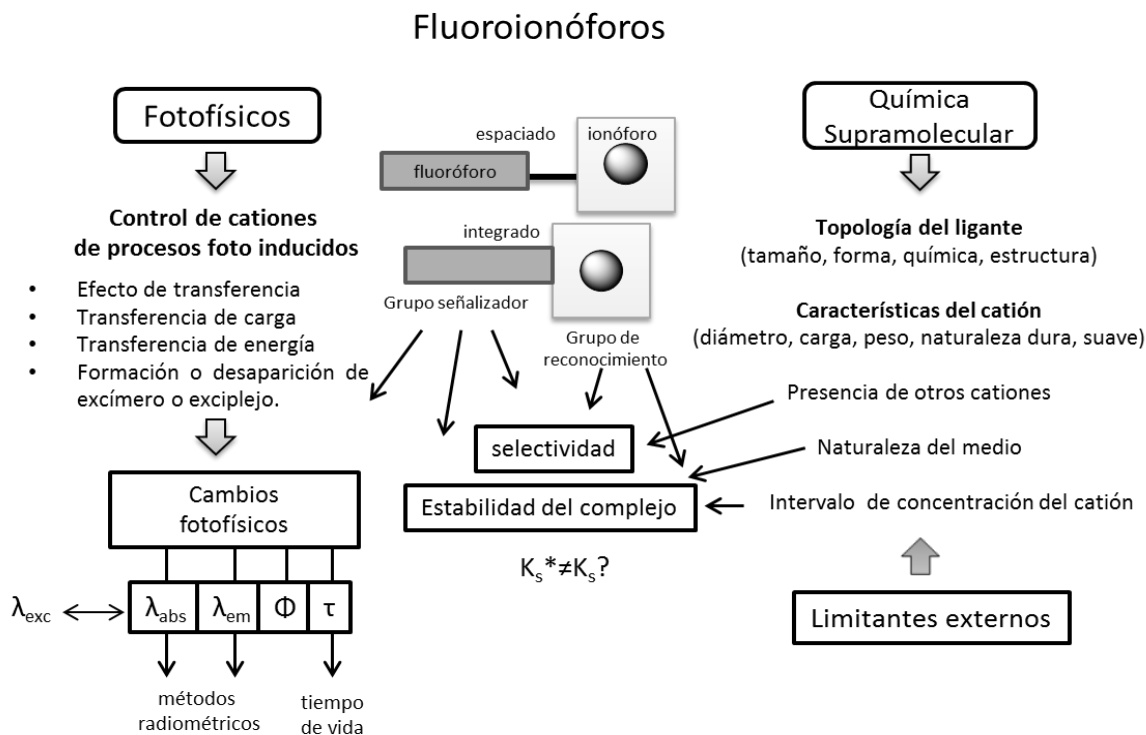


Figura 5. Principales aspectos de un sensor molecular fluorescente para el reconocimiento de cationes (fluoroionóforos).

Fuente: <sup>[14]</sup>

Una estrategia diferente en el diseño de quimiosensores fluorescentes radiométricos es la unión de dos fluoróforos idénticos a través de una cadena de interconexión con propiedades quelantes (ver Figura 6). Este tipo de compuestos, denominados ligantes *bis*-cromofóricos, presentan ventajas sobre los sensores fluorescentes clásicos. La interacción con el analito puede inducir cambios conformacionales que favorezcan la unión de las unidades fluoróforas y la consecuente formación de excímeros, que son dímeros en estado excitado.<sup>23</sup> La longitud de onda de emisión de excímero es mayor (menor energía) que la correspondiente a la de la unidad monomérica y en muchos casos se presenta dentro del intervalo visible, lo cual amplía la posibilidad de aplicación de estos compuestos. La variación en la razón de intensidades de excímero y monómero ( $I_E/I_M$ ) genera la respuesta radiométrica y puede correlacionarse de manera cuantitativa con la concentración del analito de interés (ver Figura 6).

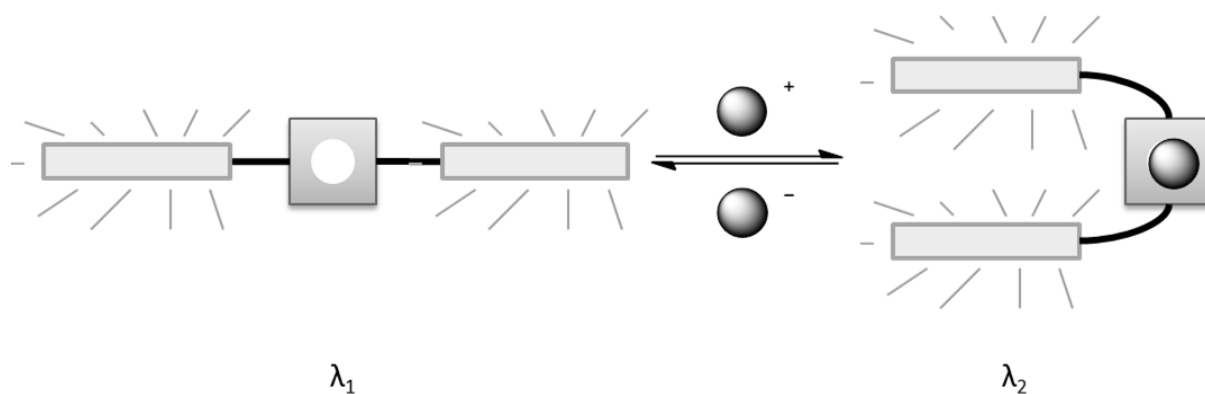


Figura 6. Diseño de quimiosensores fluorescentes de tipo *bis*-cromofóricos con respuesta monómero ( $\lambda_1$ ) y excímero ( $\lambda_2$ ).

Los fluoróforos más utilizados en el diseño de quimiosensores *bis*-cromofóricos son los policíclicos aromáticos naftaleno, antraceno y pireno.<sup>24</sup> A pesar de que pireno y antraceno presentan propiedades fotofísicas mejores que naftaleno (rendimientos cuánticos de fluorescencia mayores, tiempos de vida en estado excitado más largos, entre otras), su hidrofobicidad alta reduce la solubilidad en agua de la mayoría de sus derivados, lo cual limita su aplicación en sistemas biológicos. Entre los pocos quimiosensores fluorescentes solubles en agua funcionalizados con pireno reportados se encuentran el derivado de dietiléntriamina **9** reportado por Shiraishi *et al.*<sup>25, 26</sup> y los derivados de edta, dtpa y ttha **10-15** reportados por L. Machi, *et al.*<sup>27</sup> y R. Pérez-González, *et al.*<sup>28</sup> (ver Figura 7)

Las poliaminas funcionalizadas con naftaleno reportadas por García-España *et al.*<sup>29</sup> muestran la diferencia entre el uso de un cromóforo y dos cromóforos en el mismo ligante, ya que solo los ligantes *bis*-cromofóricos muestran la formación de excímero intramolecular, y presentan sus máximos de emisión cuando se encuentran totalmente desprotonados, es decir son dependientes del pH. Esto es debido a que en estado protonado los ligantes tienen una conformación bastante rígida que no les permite apilar sus unidades cromóforas y al estar totalmente desprotonadas son más flexibles.

Otra estrategia para generar quimiosensores fluorescentes solubles en agua basados en naftaleno fue la de L. Machi *et al.*;<sup>7, 8, 30</sup> quienes utilizaron unidades edta y dtpa como cadenas de interconexión para generar los *bis*-cromóforos **1-6** (ver Figura 1). El ligante **2** presentó una respuesta radiométrica al enlazar a  $Zn^{2+}$  (incremento de emisión de excímero y disminución de emisión de monómero), con una estequiometría de coordinación 1:1 metal-ligante, a pH 10.0 en

solución reguladora Tris. Bajo estas mismas condiciones, el ligante **4** presenta respuestas radiométricas al coordinar a los iones  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ , con cambios espectrales de encendido de monómero (335 nm) y de apagado de excímero (400 nm) para los iones  $Zn^{2+}$  y lo opuesto para los iones  $Cd^{2+}$ . Las estequiometrías de coordinación son de 1:1 y 2:1 L:M, respectivamente.

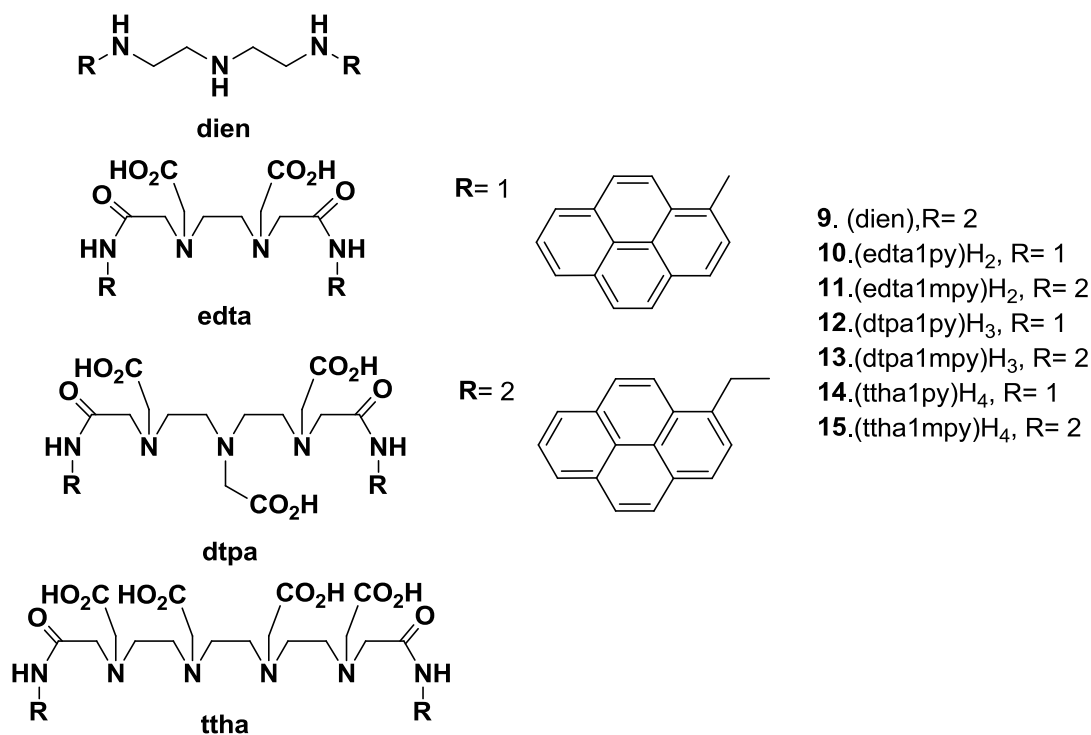


Figura 7. Quimiosensores fluorescentes bis-cromóforicos solubles en agua funcionalizados con pireno.

### Quimiosensores Fluorescentes de Zinc

La detección y separación de zinc en un intervalo de concentraciones que van desde la escala milimolar hasta nanomolar tienen un gran interés e importancia,<sup>1</sup> debido a las funciones biológicas del zinc, en especial en su forma libre las cuales son menos conocidas,<sup>4</sup> además de la correlación con muchas enfermedades que afectan al cerebro.<sup>2</sup> Por lo que gran número de herramientas para la detección de  $Zn^{2+}$  en las células vivas se han vuelto disponibles en los últimos años. Estas moléculas sensor se pueden utilizar para visualizar  $Zn^{2+}$  en las células vivas. Algunas de las funciones biológicas de  $Zn^{2+}$  se han aclarado gracias al uso de estas moléculas sensoras,<sup>4</sup> la imagenología del zinc es crucial para la elucidación de la concentración de zinc, distribución, cinética y funciones en células y tejidos.<sup>2</sup> Para la imagenología es deseable lograr una técnica no invasiva, selectiva y además en tiempo real.<sup>2</sup> El propósito más importante para

este avance es crear herramientas de sensores selectivos y sensibles;<sup>4</sup> utilizando generalmente moléculas sensores fluorescentes, el cual ha sido el método más popular. Esta es una de las razones de la creciente demanda de detección de  $Zn^{2+}$  en sistemas vivos. Para este fin, una variedad de sensores fluorescentes  $Zn^{2+}$  se han documentado sobre la base de fluoróforos diferentes, tales como acridina, antraceno, benzoxazol, boradiazaindaceno, cumarina, dansilo, fluoresceína, naftalimida, nitrobenzoxadiazol, quinolina, y escuarinas.<sup>3</sup> Un desafío importante en la detección de zinc es la interferencia de otros iones de transición, en particular del cadmio.<sup>1</sup>

Una molécula fluorescente sensor de  $Zn^{2+}$  debe inducir cambios característicos en la emisión al unirse al metal, ya sea en la intensidad, en la longitud onda de excitación o emisión, o en ambas.<sup>4</sup> Este es un método viable para la formación de imágenes en tiempo y espacio real de las células vivas sin dañarlas. El diseño de un ligante fluorescente apropiado es el paso clave y requiere esfuerzos multidisciplinarios en áreas como la química de coordinación, fotofísica, síntesis orgánica, técnicas analíticas, la biología celular, histología, neurofisiología clínica y de imagen.<sup>12</sup>

Con el fin de marcar los iones de zinc en los sistemas vivos, se deben considerar muchos aspectos. Por ejemplo, se prefiere la longitud de onda de excitación en el intervalo visible ( $\geq 400$  nm) debido a que se sabe que la luz UV es perjudicial para los organismos vivos. Se busca la solubilidad y permeabilidad de la membrana, este es un punto muy importante en el que se debe hacer hincapié para ensayos *in vitro* y ensayos *in vivo*. Aunque los valores de pH no se separarían demasiado de la neutralidad en condiciones fisiológicas, la dependencia de la fluorescencia con el pH debe considerarse para una mayor estabilidad y una mayor fiabilidad de seguimiento cuantitativo en situación de complejos. También se busca tener una respuesta con un intervalo lineal amplio. A pesar de que se han diseñado y sintetizado varios sensores fluorescentes de zinc, ninguno puede aún satisfacer perfectamente todos los criterios mencionados anteriormente. Por lo tanto, esta es una razón para seguir diseñando y sintetizando sensores de zinc mejores y más eficaces, que cumplan estos requisitos.<sup>12, 14</sup>

### ***Quimiosensores de Zinc Basados en Quinolina***

Para el ensayo químico cuantitativo de  $Zn^{2+}$  se han utilizado ampliamente las quinolinas y sus derivados, entre los que se encuentran la 8-aminoquinolina (8-AQ) y la 8-hidroxiquinolina (8-

HQ u oxina) (**16** y **17**, Figura 8). Este tipo de compuestos son denominados agentes quelantes fluorogénicos. Aunque la oxina es considerada como el segundo agente quelante más importante después de EDTA para el análisis de cationes, la mayoría de los indicadores derivados de ella no son lo suficientemente específicos. Los compuestos **17**, **16** y sus derivados no fluorescen y no son influenciados por el cambio en el pH. Sin embargo cuando las quinolinas y derivados se coordinan al  $Zn^{2+}$  y otros iones metálicos, exhiben una emisión de fluorescente intensa de color entre amarillo y verde, debido a que los cationes son capaces de extinguir el proceso de transferencia de electrones que ocurre entre el átomo de nitrógeno heterocíclico y el grupo 8-sustituido (es decir, OH y  $NH_2$ ). Curiosamente, sólo  $Zn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  pueden romper el puente de hidrógeno intramolecular que existe entre el  $-NH_2$  y el nitrógeno heterocíclico en **16** y de ese modo estimular la fluorescencia. Debido a esto, los derivados de **16** son la base para la detección selectiva de estos dos cationes y por lo tanto, **16** es una forma más útil para el diseño de sensores para Zinc que **17**. Sin embargo, **16** y **17** en sí mismos no son adecuados para aplicaciones biológicas, debido a que los átomos de hidrógeno activos (es decir, OH o NH) son propensos a reaccionar con algunas especies activas en los entornos biológicos afectando su fluorescencia y su selectividad.<sup>12</sup>

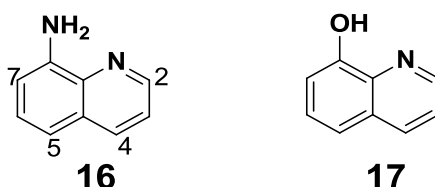


Figura 8. 8-aminoquinolina (8-AQ) y la 8-hidroxiquinolina (8-HQ u oxina), **16** y **17** respectivamente.

En la década de 1960, comenzaron a utilizar la quinolina sulfonamida como un sensor químico fluorescente para iones de  $Zn^{+2}$  o  $Cd^{2+}$ . Sin embargo, fue hasta 1987 que uno de los compuestos sulfonamidas, la 6-metoxi-8-p-toluenosulfonamido-quinolina (TSQ, **18**, Figura 9), se utilizó para la formación de imágenes “*in vitro*” de iones divalentes de zinc.<sup>31</sup> Este trabajo es considerado como un hito en el desarrollo de sondas fluorescentes para  $Zn^{2+}$  biológico. El compuesto **18** ha demostrado ser un sensor fluorescente selectivo a zinc, independiente del pH y no tóxico, por lo que es el compuesto utilizado más ampliamente como marcador de zinc biológico.<sup>32</sup> Sin embargo, el compuesto **18** tiene varias limitaciones, entre ellas, la solubilidad en agua baja es el más notable, lo que requiere una solución madre de TSQ preparada con sulfóxido de dimetilo (DMSO) o etanol.<sup>12</sup>



Con el fin de mejorar la solubilidad y permeabilidad a la membrana celular del compuesto **18** (TSQ), Zalewski *et al.*; añadieron grupos carboxilo o grupos éster para extender al grupo 6-metoxilo (Zinquin, **19** forma de éster, **20** forma ácida, Figura 9).<sup>33,34,35</sup> Este diseño se basa en la teoría esterificación de carga acetoximetil ("AM-loading") propuesta por Tsien para sondas fluorescentes de calcio.<sup>36</sup> De acuerdo a esta teoría, la modificación de los grupos carboxilo a grupos AM hace que la sonda sea permeable a la membrana celular, una vez que la sonda AM se difunde en el citoplasma, el grupo AM se adhiere a una esterasa endógena, para formar la forma ácida de la sonda, la cual actúa como un indicador de fluorescencia citoplásmico para el  $Zn^{2+}$ . Esta característica permite la formación de imágenes en tiempo real de las actividades dinámicas de zinc celular.<sup>37,38</sup>

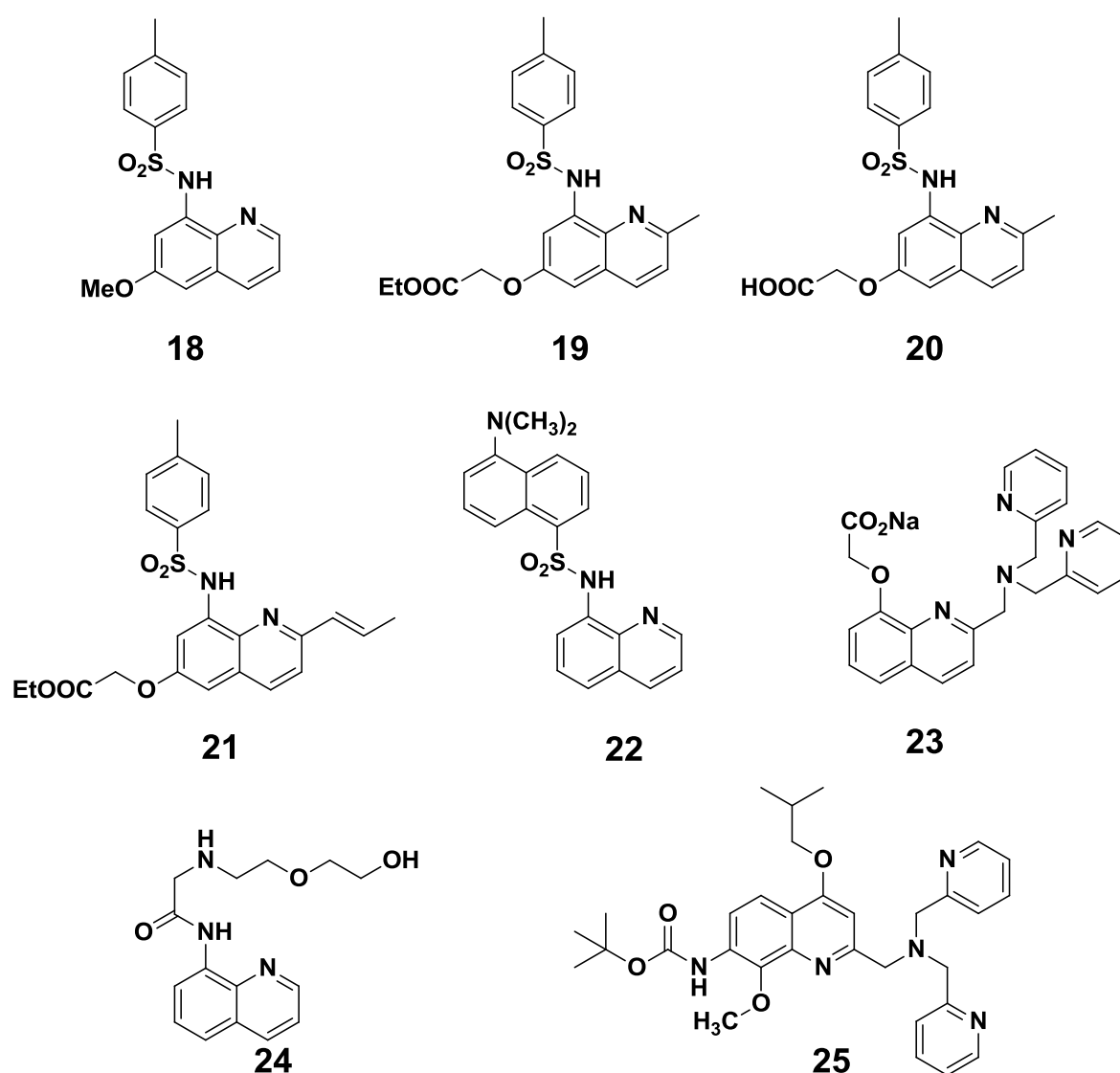


Figura 9. Quimiosensores fluorescentes derivados de quinolinas.

Sin duda alguna muchos de los sensores de zinc están basados en quinolinas, y la mayoría de estos sensores buscan resolver algunas de las limitaciones que presentan la aminoquinolina y la oxina. Un ejemplo es el derivado **21** (ver Figura 9) publicado por Ward *et al.*, el cual busca aumentar la intensidad de fluorescencia extendiendo el sistema conjugado dentro de la molécula.<sup>39</sup> Otro problema a resolver es que la excitación de las quinolinas está dentro del UV y puede causar daño a las células vivas; en este sentido las modificaciones están orientadas a recorrer la banda de excitación hacia el rojo, otro ejemplo es el de la sonda fluorescente para zinc Danquin **22** (Figura 9) en el cual se observa la condensación del grupo dansilo con aminoquinolina.<sup>40</sup>

Para aumentar su afinidad hacia zinc, Jiang *et al.* incorporaron *bis*-(2-piridilmetil)amina (DPA) en la posición 2 de la 8-hidroxi-2-metilquinolina y un resto éster se une en la posición 8 (ver compuesto **23** Figura 9). El compuesto **23** es muy soluble en agua y dado que cuenta con sitios de unión adicionales, la constante afinidad aumentó notablemente.<sup>41,42</sup>

Yu Zhang (2008) presentó el quimiosensor **24** (AQZ) (ver Figura 9) diseñado en base a una unidad carboxiamidaquinolina con una cadena alcoxiethylamino, aunque se trabajó en una mezcla de solventes metanol-agua (1:9) este sensor presenta una respuesta radiométrica selectiva a iones de  $Zn^{2+}$ , y fue utilizado para teñir y formar una imagen de los iones libres de  $Zn^{2+}$  en células vivas.<sup>43</sup>

Lin Xue *et al.*<sup>44</sup> en 2009 presentaron el derivado **25** denominado (Qb) (ver Figura 9), el cual está basado en quinolina con DPA como unidad receptora. Dicho sensor presenta una respuesta radiométrica a  $Zn^{2+}$ , el cual puede ser desplazado por iones de  $Cd^{2+}$  también con una respuesta radiométrica, sin embargo, presenta solubilidad baja en agua para ser aplicado como sensor de zinc a nivel biológico.<sup>44</sup>

### ***Quimiosensores de Zinc Derivados de bis-(2-piridilmetil)amina***

El compuesto **26** (Zinpyr-1) reportado por Burdette *et al.* (ver Figura 10), está basado en *bis*-(2-piridilmetil)amina y fluoresceína como fluoróforo, y ha sido diseñado para detectar zinc en células vivas. Este compuesto es permeable a las células y no tiene afinidad esencialmente

comparable para calcio o magnesio. No obstante que tras la adición de zinc en condiciones fisiológicas la fluorescencia aumenta, aunque no presenta una respuesta radiométrica <sup>45</sup>.

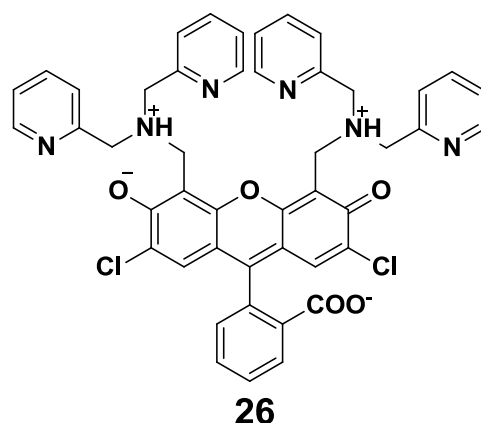


Figura 10. Quimiosensor de zinc derivado de bis-(2-piridilmetil)amina.

### *Poliaminas Cíclicas y Acíclicas Como Receptores Fluorescentes de Zinc*

Las poliaminas son usadas ampliamente como ionóforos para  $Zn^{2+}$ , porque el nitrógeno donador exhibe una fuerte afinidad por el zinc. Los átomos de nitrógeno del grupo amino de las poliaminas son considerados como buenos donadores de electrones para fluoróforos adyacentes. Algunos de estos sensores presentan la complejidad de responder a algunos metales de transición como  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ . Existen muchos derivados basados en la poliamina cíclica cyclen (ácido 1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano) y una unidad fluorofórica, sin embargo, muchos de estos derivados solo emiten una intensidad de fluorescencia fuerte en ausencia de zinc. Se ha visto que derivados de cyclen totalmente sustituidos disminuyen su afinidad por el zinc, mientras que los derivados que no están totalmente sustituidos son dependientes del pH y raramente son usados en sistemas biológicos <sup>12</sup>.

Scott A. Van Arman *et al.*, reportaron en 2005 la poliamina acíclica **27** (Figura 11) con antraceno como fluoróforo, el cual presenta un respuesta radiométrica específica para zinc, y no para otros iones como mercurio o cadmio. Aunque este sensor presenta la desventaja de no ser totalmente soluble en agua por lo que fue necesario emplear metanol al 25%.<sup>46</sup> En 2012 Arvind Misra *et al.* publicaron una serie de sensores **28** y **29** (ver Figura 11) éstas son sondas derivadas de anhídrido naftálico y antraceno, dichas moléculas presentan una respuesta de encendido al coordinarse con iones de  $Zn^{2+}$ , sin embargo, pese a la buena respuesta a iones de zinc a pH

fisiológico, estas sondas no son aptas ya que la fluorescencia disminuye en este intervalo de pH, además de ser solubles en una mezcla de agua-acetonitrilo (50:50).<sup>47</sup>

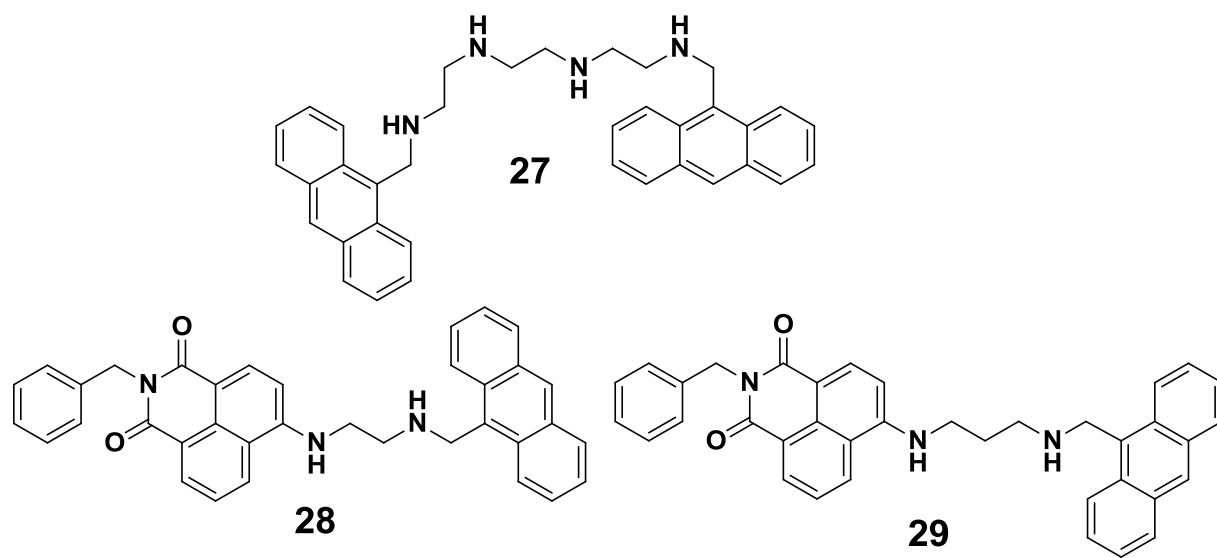


Figura 11. Receptores tipo poliaminas acíclicas

Además de las moléculas citadas, se han reportado sensores fluorescentes para zinc basados en polipéptidos, los cuales pueden presentar cierta desventaja por la dificultad de su síntesis, su poca flexibilidad y la afinidad variable. Con dichos compuestos se trata de emular la afinidad de algunas proteínas o bioligandos, lo cual es difícil de superar, ya que tienen millones de años de selección natural. Por otra parte, el uso de proteínas puede ser también potencialmente una estrategia aplicable en sistemas biológicos empleando fluoróforos apropiados como marcadores.<sup>12</sup>

## METODOLOGÍA

### Materiales

En este trabajo se utilizaron los compuestos ya reportados por L. Machi *et al.*:<sup>7-9, 30</sup> (edta1nap)H<sub>2</sub>, (edta2nap)H<sub>2</sub>, (edta1mnap)H<sub>2</sub>, (edta2mnap)H<sub>2</sub>, (dtpa1mnap)H<sub>3</sub> y (dtpa2mnap)H<sub>3</sub>, (**1-6**, Figura 1). Todos los ligantes, excepto el compuesto **2** del que ya no existía material disponible, fueron proporcionados y puestos a disposición gracias a la amable colaboración de la Dra. Hisila Santacruz Ortega. La síntesis del compuesto **2** fue realizada en este trabajo con el propósito de completar un cuadro comparativo entre ligantes de diferentes cadenas de interconexión, presencia o no del grupo metileno espaciador y diferente posición de unión de la unidad cromófora a la unidad quelante. Los reactivos utilizados en la preparación del compuesto **2** se enlistan a continuación:

- Dianhídrido dietilentriaminopentaacético 98% (Aldrich) grado reactivo
- 2-aminonaftaleno 95% (Aldrich)
- *N,N*-Dimetilformamida anhídrido 99.8% (Sigma-Aldrich)
- Etanol grado reactivo ACS (Faga Lab)
- Acetona grado reactivo ACS (Faga Lab)
- Tolueno 99.5% (Reproquifin)
- Oxido de deuterio (D<sub>2</sub>O) (Sigma-Aldrich 99.9%)
- Carbonato de Sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 99.8% (Aldrich)

En los estudios de coordinación se utilizaron los siguientes compuestos:

- Cloruro de calcio hexahidratado (CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) 99.99% (Puratronic)
- Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 97% (Sigma)
- Cloruro de zinc (ZnCl<sub>2</sub>) 97% (Monterrey)
- MOPS (ácido3-(*N*-morfolino)-propanosulfónico) 99.53% (Sigma)
- Hidróxido de Sodio (NaOH) 99% (Merk)
- Ácido Clorhídrico (HCl) 37% (Fermont)

## Síntesis del Ligante 2, (edta2nap)H<sub>2</sub>

La síntesis de **2** (edta2nap)H<sub>2</sub>) se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por L. Machi *et al.* en 2006 para la preparación de este compuesto, con ciertas modificaciones.<sup>7</sup> Se hicieron reaccionar el dianhídrido del edta (196 mg, 0.767 mmol) y un exceso de la amina aromática 2-aminonaftaleno (275.5 mg, 1.91 mmol) en una proporción molar 1:2.5, en 10 mL de DMF anhidro como medio de reacción (Figura 12).

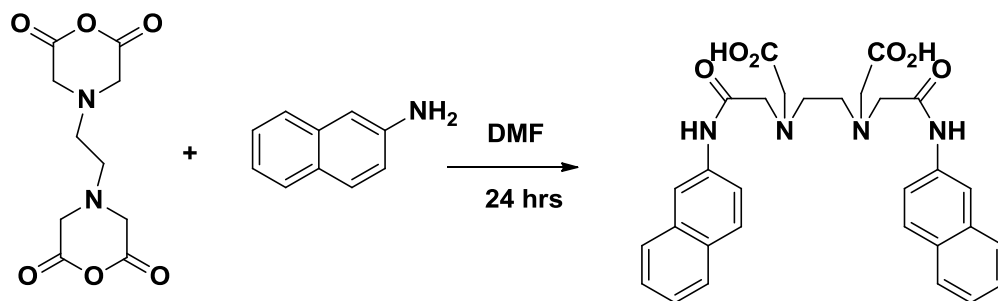


Figura 12. Ecuación de reacción para la síntesis de (edta2nap)H<sub>2</sub>, **2**.

Los reactivos y el disolvente fueron añadidos a un matraz bola de 50 mL y puestos en agitación por 24 h. Trascurrido este tiempo, se filtró la solución de reacción para separar cualquier sólido presente. El filtrado obtenido se trató con etanol frío (4 °C) por 72 h para precipitar el producto. La suspensión obtenida fue centrifugada para separar el sólido, el cual se lavó varias veces con acetona fría (4 °C) y se secó a vacío por 6 h. Se obtuvieron 273.1 mg de **2** (rendimiento= 36%) con un punto de fusión de 200 °C. El compuesto fue caracterizado por RMN de <sup>1</sup>H e IR (ver Figura A 1 y Figura A 2, respectivamente en la sección de anexos) y los resultados coinciden con los reportados en la tesis doctoral de Hisila Santacruz.<sup>9</sup>

## Estudios de Coordinación Metálica en Solución

Se llevaron a cabo titulaciones espectrofluorométricas a pH y temperatura constantes (pH= 7.2, 25 °C) para conocer el efecto de la coordinación de los diferentes ligantes con zinc. La selección de este pH fue para emular las condiciones fisiológicas de nuestro organismo. Para realizar estos ensayos se utilizó un espectrofotómetro de luminiscencia marca Perkin-Elmer modelo LS50B.

Las titulaciones se realizaron directamente en la celda del espectrofotómetro. En cada una de ellas se colocaron 3 mL de solución del ligante a la concentración apropiada (ver Tabla 1) y se agregaron alícuotas de 10  $\mu$ L de solución del metal para llevar la relación ligante: ion metálico [L: M] desde 1:0 hasta 1:2.5. Todos los experimentos se realizaron al menos por duplicado.

<i>Tabla 1. Concentraciones y <math>\lambda_{exc}</math> utilizadas en los diferentes estudios de coordinación para los ligantes 1-6.</i>		
<b>Ligante</b>	<b>Concentración [M]</b>	<b><math>\lambda_{exc}</math> (nm)</b>
<b>1;</b> (edta1nap)H <sub>2</sub>	5x10 <sup>-5</sup>	330
<b>2;</b> (edta2nap)H <sub>2</sub>	1x10 <sup>-5</sup>	280
<b>3;</b> (edta1mnap)H <sub>2</sub>	1x10 <sup>-6</sup>	280
<b>4;</b> (edta2mnap)H <sub>2</sub>	1x10 <sup>-6</sup>	280
<b>5;</b> (dtpa1mnap)H <sub>3</sub>	1x10 <sup>-6</sup>	280
<b>6;</b> (dtpa2mnap)H <sub>3</sub>	1x10 <sup>-6</sup>	280

Las soluciones de los cloruros metálicos se estandarizaron con edta disódico y fueron utilizados las soluciones reguladoras e indicadores según las metodologías reportadas.<sup>48-49</sup>

### **Estudios de Competencia**

Se realizaron estudios de competencia para aquellos sistemas que mostraban una respuesta fluorescente selectiva a cationes específicos. Se utilizaron las mismas concentraciones y condiciones empleadas en los experimentos de titulación espectrométrica con cationes metálicos individuales. Las titulaciones se realizaron directamente en la celda del espectrofotómetro. En cada experimento se colocaron 3 mL de solución del ligante en la celda de fluorescencia y se obtuvieron los espectros de emisión y excitación del ligante libre; posteriormente se añadieron alícuotas de 10  $\mu$ L de las soluciones metálicas, las cuales contenían un equivalente del catión en estudio (en el orden que se especifica más adelante) y se observó la variación en los espectros de fluorescencia. Cada adición estaba acompañada de un intervalo de agitación magnética antes de tomar el espectro. Se realizaron dos tipos de experimentos: Tipo A, se adicionaron primero los metales competidores y enseguida el metal de interés; Tipo B, se adicionó primero el metal de interés y enseguida los metales competidores.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 13 se muestran los espectros de emisión de los ligantes **1-6**, tomados a pH 7.2 en amortiguador MOPS,  $\lambda_{exc}= 280$  nm para los ligantes **2-6** y 330 nm para el ligante **1**, los espectros muestran características ligeramente distintas a las reportadas por Machi *et al.* <sup>7,8</sup> debido al cambio de pH y amortiguador. Todos los compuestos, excepto los ligantes **1** y **3**, presentan bandas de emisión de fluorescencia tanto de naftaleno monomérico (con máximos entre ~330-350 nm) como de excímeros de naftaleno (~ 400-410 nm). La razón de intensidades excímero/monómero ( $I_E/I_M$ ) es dependiente del tipo de cadena de interconexión y del sitio de unión de la unidad quelante al grupo naftaleno. Los ligantes **4** y **6** muestran las razones  $I_E/I_M$  mayores (~0.6 y 0.5, respectivamente), seguidos de **2** y **5** (~0.3 y 0.4, respectivamente). En el caso de los ligantes **1** y **3**, éstos presentan espectros de fluorescencia con bandas de emisión sólo de excímero y solo de monómero, respectivamente.

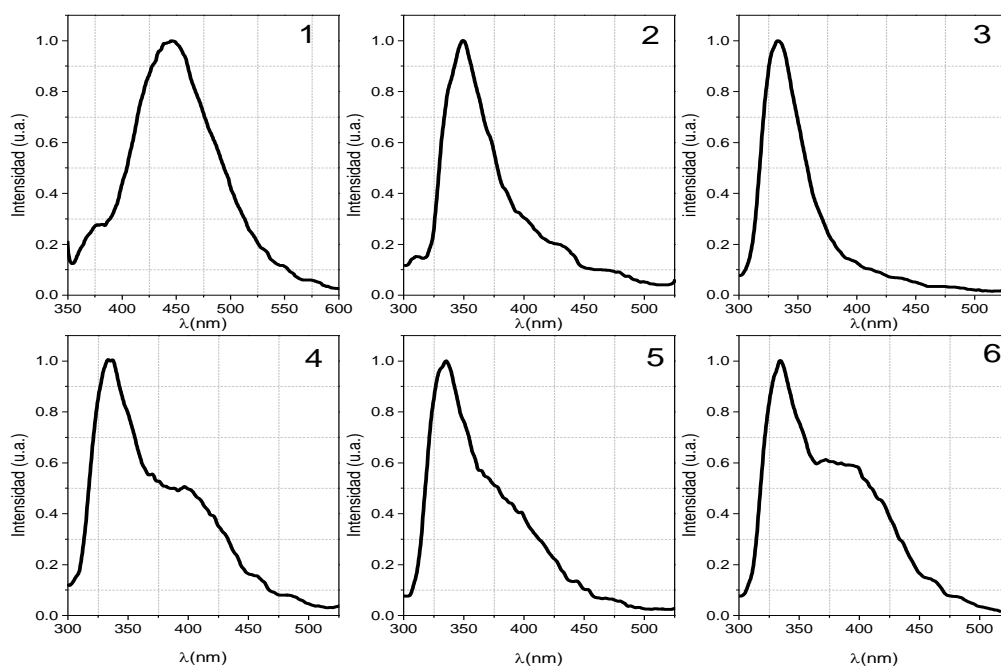


Figura 13. Espectros de emisión de los ligantes **1-6**, tomados a pH 7.2 en amortiguador MOPS,  $\lambda_{exc}= 280$  para los ligantes **2-6** y 330 nm para el ligante **1**.  $[1]= 5 \times 10^{-5}$  M,  $[2]= 1 \times 10^{-5}$  M y  $[3-6]= 1 \times 10^{-6}$  M.

Los ligantes **1-6** en presencia de zinc a diferentes concentraciones como se muestra en la Figura 14 los ligantes que tuvieron una respuesta fluorescente significativa al coordinarse con zinc fueron **2**, **5** y **6**. Mientras que **2** mostró una disminución de la intensidad de emisión en todo



el intervalo de longitudes de onda, **5** y **6** mostraron cambios radiométricos de intensidad: disminución de la emisión de excímero e incremento en la emisión de monómero. Las curvas de intensidad de emisión en función de la razón molar  $[M]/[L]$  mostraron saturación a valores  $[M]/[L]=1$  en el caso del ligante **2**, y  $[M]/[L]=0.5$  en los casos de **5** y **6**, lo que sugiere estequiometrias M:L 1:1 para el complejo **2**-Zn y 1:2 para los complejos **5**-Zn y **6**-Zn. A pesar de que la estequiometría encontrada para el complejo **2**-Zn en este trabajo coincide con la reportada por L. Machi *et al.*<sup>7</sup> a pH=10 (0.1 M NaOH/0.05M NaHCO<sub>3</sub>), la respuesta fluorescente fue distinta. Los autores reportan un cambio radiométrico de intensidad: consistente en un aumento de la emisión de excímero y disminución en la emisión de monómero.

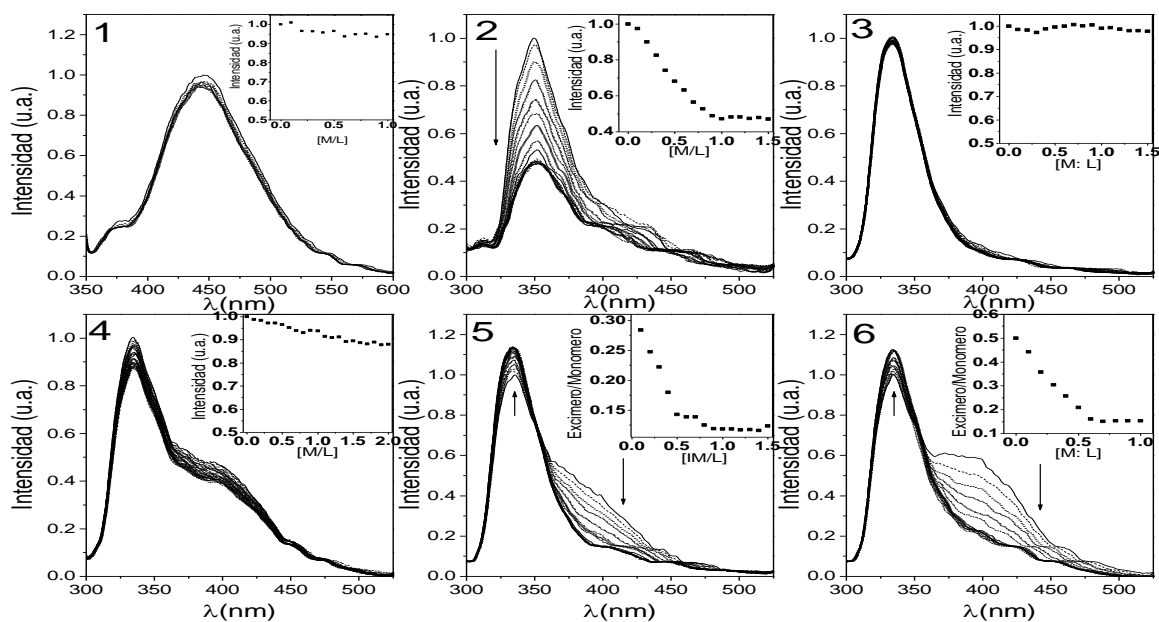


Figura 14. Espectros de emisión de los ligantes **1-6** en presencia de zinc a diferentes concentraciones, pH 7.2 (amortiguador MOPS).  $\lambda_{exc}= 280$  nm para los ligantes **2-6** y 330 nm para el ligante **1**.  $[1]= 5 \times 10^{-5}$  M,  $[2]= 1 \times 10^{-5}$  M y  $[3-6]= 1 \times 10^{-6}$  M.

En la Figura 15 se muestran las variaciones de intensidad de emisión,  $(I-I_0)/I_0$ , de todos los ligantes en función de  $[Zn]/[L]$ . Como ya se ha mencionado, los ligantes **2**, **5** y **6** destacan entre la serie de compuestos estudiada por el tipo de respuesta que presentan al coordinar a este metal.

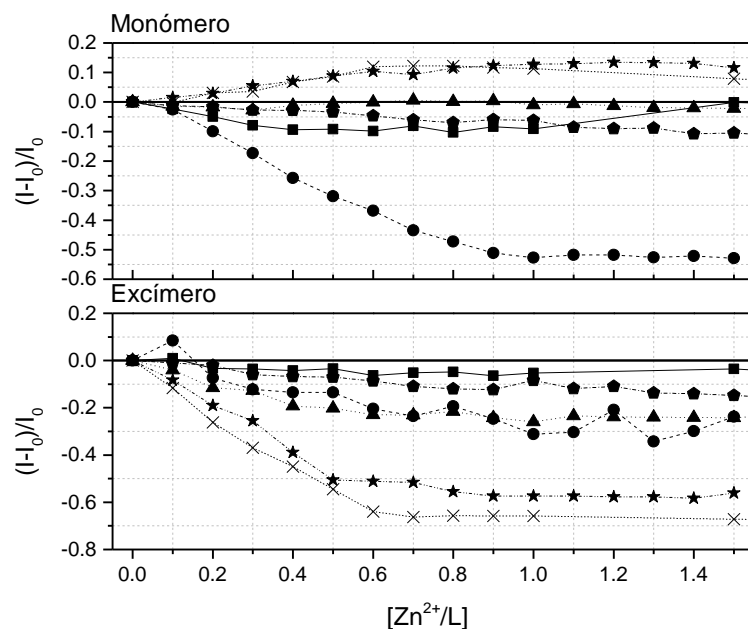


Figura 15. Variación en la intensidad de emisión a  $\lambda = 350$  nm (monómero) y 410 (excímero) en función de  $[Zn^{2+}]/[L]$  para los ligantes **2-6** y a 380 nm y 440 nm para el ligante **1**. Simbología: Ligante: **1**, ■; **2**, ●; **3**, ▲; **4**, ◆; **5**, ★; **6**, ×.

Con el propósito de conocer el efecto de la coordinación de los ligantes **1-6** a calcio y magnesio, dos de los principales cationes interferentes en las determinaciones de zinc intracelular, se realizaron dos series adicionales de experimentos de titulación y los resultados se muestran en las siguientes figuras (ver Figura 16- Figura 19). Como se aprecia en la Figura 16 y Figura 18, del grupo de ligantes **1-6**, solo el ligante **3** presenta una respuesta fluorescente significativa al coordinarse a los iones de magnesio o calcio. En la Figura 17 y Figura 19 se muestra la variación en la intensidad de emisión, tanto de monómero como de excímero, de los diferentes ligantes en función de  $[Mg]/[L]$  y  $[Ca]/[L]$ , respectivamente. Salvo en el caso del complejo **3-Mg**, la disminución de la intensidad de fluorescencia no supera el 20%.

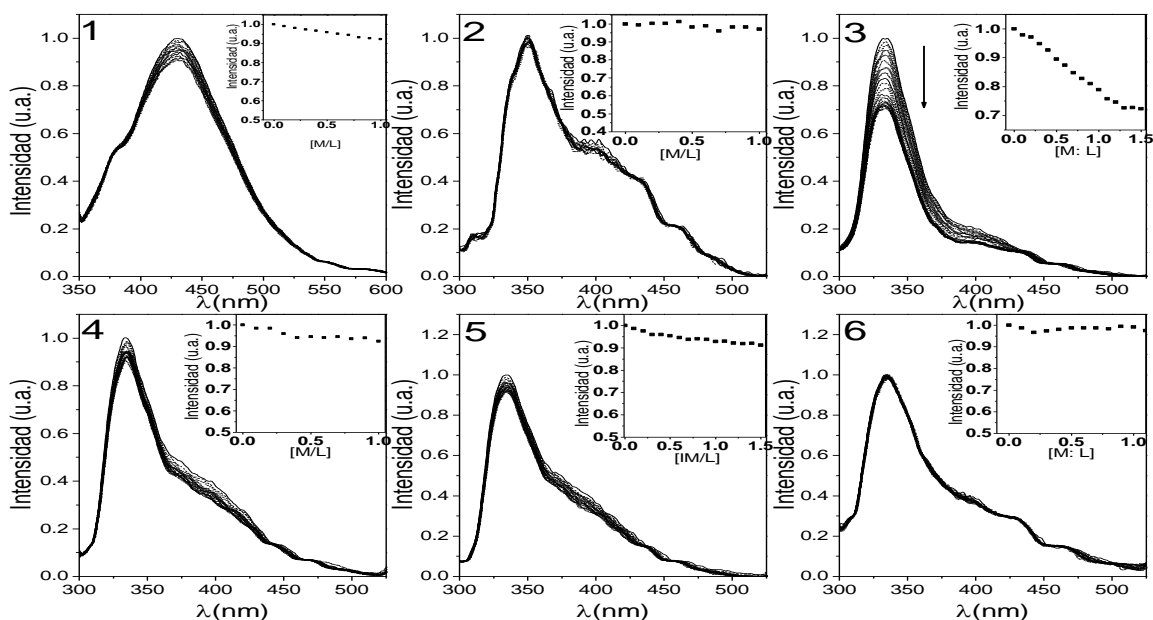


Figura 16. Espectros de emisión de los ligantes **1-6** en presencia de magnesio a diferentes concentraciones, pH 7.2 (amortiguador MOPS).  $\lambda_{exc}=280$  nm para los ligantes **2-6** y 330 nm para el ligante **1**.  $[1]=5 \times 10^{-5}$  M,  $[2]=1 \times 10^{-5}$  M y  $[3-6]=1 \times 10^{-6}$  M.

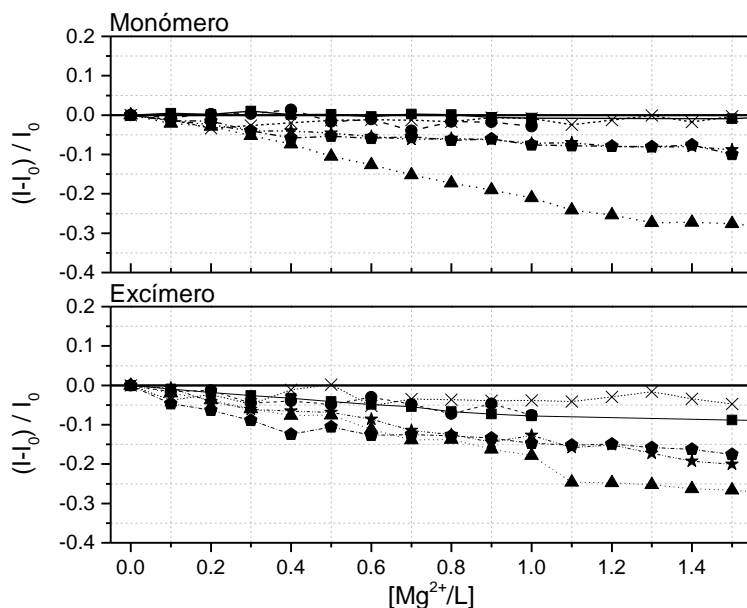


Figura 17. Variación en la intensidad de emisión a  $\lambda=350$  nm (monómero) y 410 (excímero) en función de  $[Mg^{2+}]/[L]$  para los ligantes **2-6** y 380 nm y 440 nm para el ligante **1**. Simbología: Ligante: **1**, ■; **2**, ●; **3**, ▲; **4**, ◆; **5**, ★; **6**, ×.

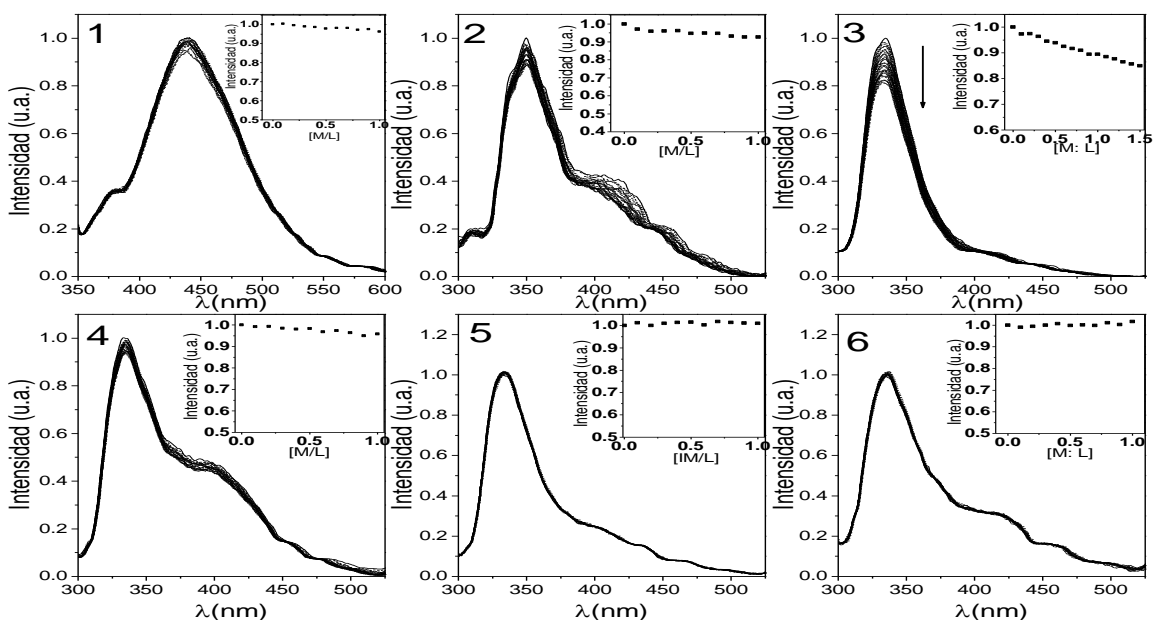


Figura 18. Espectros de emisión de los ligandos **1-6** en presencia de calcio a diferentes concentraciones, pH 7.2 (amortiguador MOPS).  $\lambda_{exc}= 280$  nm para los ligandos **2-6** y 330 nm para el ligante **1**.  $[1]= 5 \times 10^{-5}$  M,  $[2]= 1 \times 10^{-5}$  M y  $[3-6]= 1 \times 10^{-6}$  M.

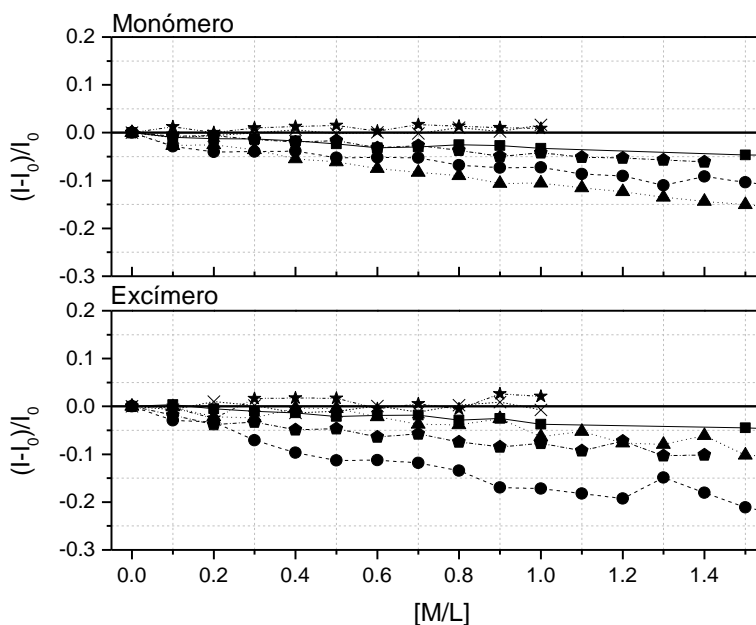


Figura 19. Variación en la intensidad de emisión a  $\lambda = 350$  nm (monómero) y 410 (excímero) en función de  $[Ca^{2+}]/[L]$  para los ligandos **2-6** y 380 nm y 440 nm para el ligante **1**. Simbología: Ligante: **1**, ■; **2**, ●; **3**, ▲; **4**, ◆; **5**, ★; **6**, ×.

Como puede apreciarse, la fluorescencia del ligante **6** es prácticamente insensible a la presencia de calcio o magnesio (ver Figura 16- Figura 19), mientras que al coordinar a zinc mostró una respuesta radiométrica (Figuras 14 y 15). Esto lo posiciona como un posible quimiosensor radiométrico selectivo a zinc. Para confirmar dicha selectividad, se llevaron a cabo estudios de competencia con la metodología que se describe en la sección experimental. Los resultados de los experimentos Tipo A y Tipo B se muestran en la Figura 20. En el experimentos Tipo A se muestra que tras adicionar un equivalente de calcio, o uno de calcio y uno de magnesio, la intensidad de excímero y monómero no varían de forma significativa. En cambio, la adición de un equivalente de zinc provoca una respuesta radiométrica como en el experimento previo, la cual es más marcada en presencia de un exceso del metal (2 o 3 eq). En el experimento Tipo B se muestra que tras la adición de un equivalente de zinc se presenta nuevamente una respuesta radiométrica y las intensidades de monómero y excímero no varían significativamente tras la adición de varios equivalentes de calcio y magnesio.

Al igual que para el ligante **6** también se realizaron estudios de competencia para el ligante **5**, cuya fluorescencia cambia en forma radiométrica al coordinar a zinc (Figura 14 y Figura 15) y es prácticamente insensible a la presencia de calcio o magnesio (Figura 16-Figura 19). Los resultados fueron similares a los obtenidos con el ligante **6** en ambos experimentos (ver Figura 21).

Como se ha mostrado en los anteriores experimentos, del grupo de compuestos estudiados, los ligantes **5** y **6** presentan una mejor respuesta fluorescente al coordinarse al zinc(II). La respuesta es radiométrica, además selectiva a los iones de zinc en presencia de calcio(II) y/o magnesio(II). La diferencia principal de los ligantes **5** y **6** respecto a los ligantes **1-4**, es que presentan una cadena de interconexión más larga entre las unidades fluoróforas, además de más sitios de coordinación. Esto permite una conformación de coordinación en la cual las unidades fluoróforas quedan en una posición que propicia la generación de una respuesta tipo radiométrica, en la cual la emisión de monómero se hace más eficiente y la de excímero menos eficiente. Esto puede atribuirse a que, al momento de coordinar a los iones de zinc, las unidades de naftaleno se separan y hace menos eficiente la formación de excímero.

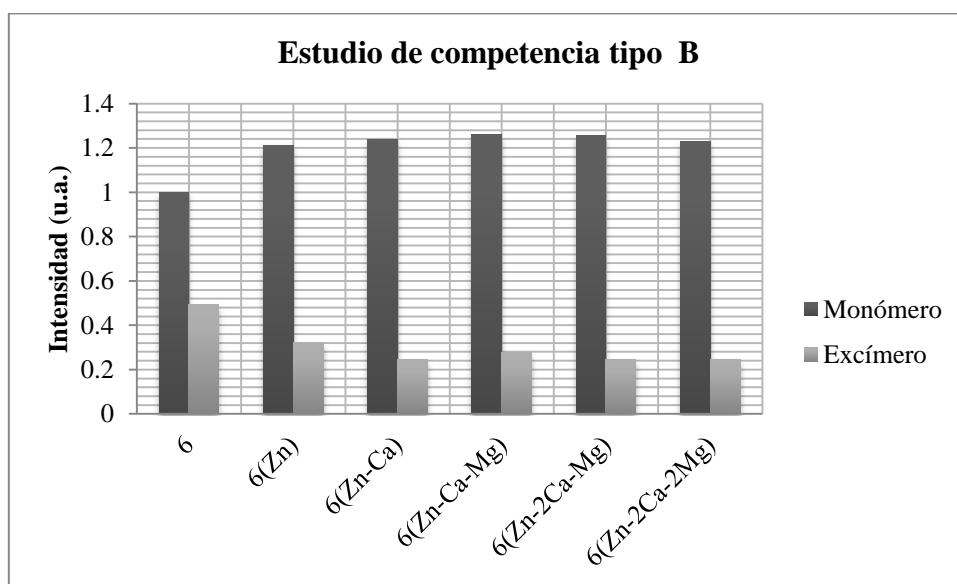
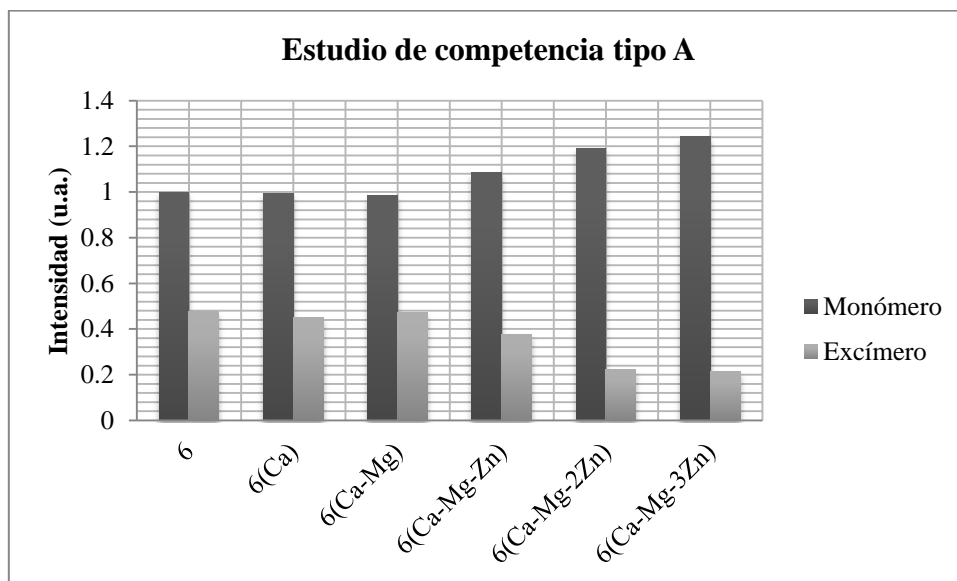


Figura 20. Cambios en la intensidad de fluorescencia de la banda de emisión de excímero y monómero del ligante **6** en presencia de los cationes metálicos Ca(II), Mg(II) y Zn(II) a pH 7.2 (amortiguador MOPS); el número de equivalentes del metal se indica con un coeficiente estequiométrico;  $[L]= 1 \times 10^{-6}$  M,  $\lambda_{em}= 410$  nm (excímero), 335 nm (monómero);  $\lambda_{exc}= 280$  nm.

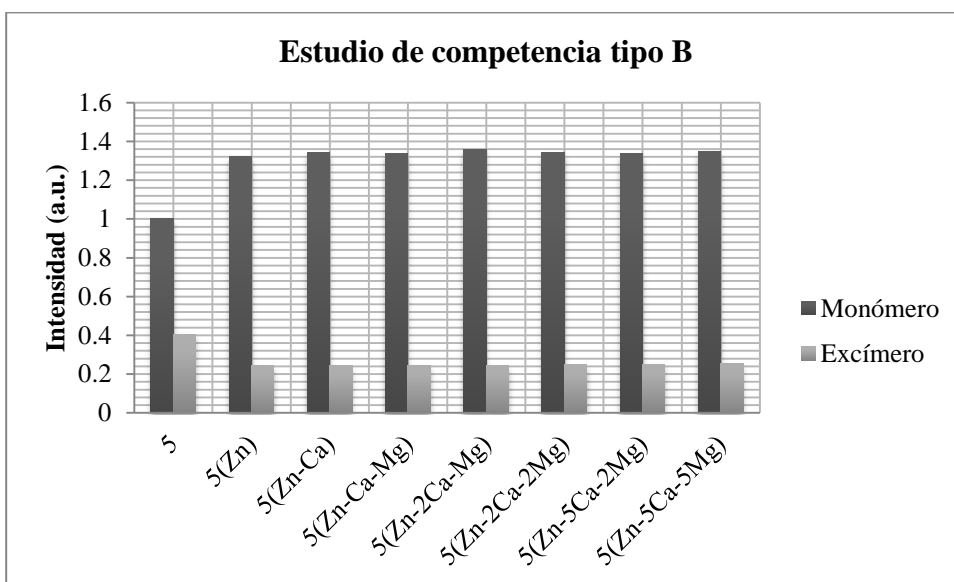
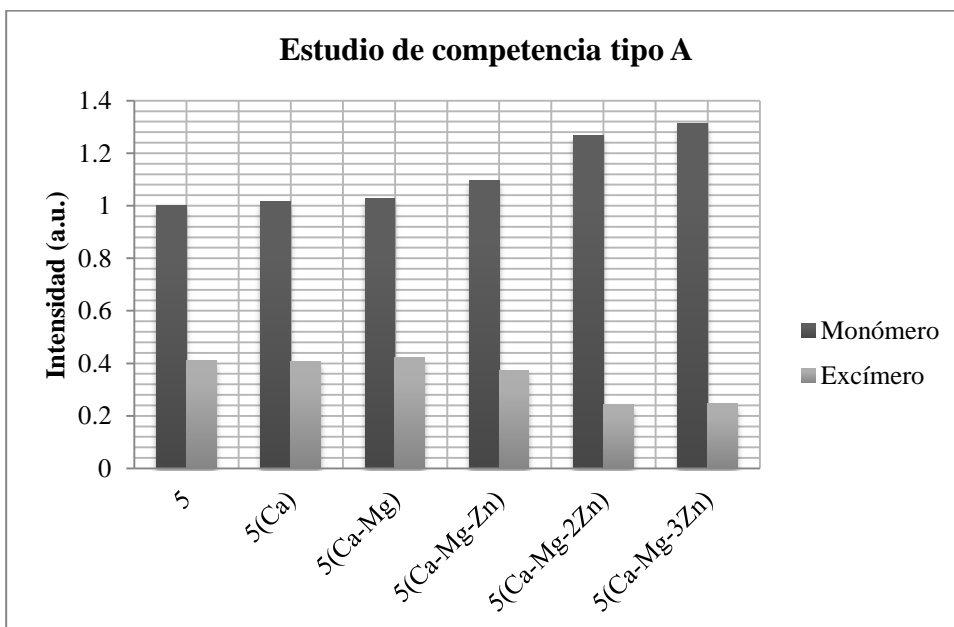


Figura 21. Cambios en la intensidad de fluorescencia de la banda de emisión de excímero y monómero del ligante **5** en presencia de los cationes metálicos Ca(II), Mg(II) y Zn(II) a pH 7.2 (amortiguador MOPS); el número de equivalentes del metal se indica con un coeficiente estequiométrico;  $[L]= 1 \times 10^{-6}$  M,  $\lambda_{emi}= 410$  nm (excímero), 335 nm (monómero);  $\lambda_{exc}= 280$  nm.

En la Tabla A 1 se muestran los diámetros iónicos y modos de coordinación de algunos cationes. Al comparar los diámetros iónicos de calcio, magnesio y zinc se observa que el diámetro de éste último tiene un valor intermedio y esta puede ser la razón de que los ligantes **5** y **6** prefieran coordinarse a este metal. Es decir, que el tamaño de la cadena sea más apropiado para el diámetro iónico del zinc y su modo de coordinación.

Otra forma de explicar la preferencia de los ligantes **5** y **6** por zinc, sobre calcio y magnesio, podría ser mediante la evaluación de la dureza de los átomos metálicos. Sin embargo, encontramos que los tres iones pertenecen al grupo de los átomos duros y presentan una configuración electrónica similar con todos los orbitales llenos en su capa de valencia.

Bajo las condiciones utilizadas en este estudio, la posición de unión de las unidades fluoróforas (1- o 2-naftil) a la unidad quelante, independientemente si ésta es de tipo edta o dtpa, no tuvo una gran importancia en la respuesta de coordinación hacia zinc. Sin embargo, hay una preferencia de coordinación hacia magnesio, respecto a zinc o calcio, de los dos ligantes derivados de edta con unidades 1-naftil (**1** y **3**). La formación de los complejos **1**-Mg y **3**-Mg provocó amortización de la fluorescencia de los ligantes en un 10 y 30%, respectivamente, con una disminución lineal de la intensidad hasta una razón molar  $[Mg]/[L] \approx 1$ , seguida de saturación, lo que indica formación de complejos con estequiometría 1:1 M:L (ver Figura 16 y Figura 17). En contraste, la fluorescencia del ligante **1** prácticamente no varía en presencia de zinc o calcio (ver Figura 14- Figura 15 y Figura 18- Figura 19), mientras que la fluorescencia del ligante **3** disminuye menos del 5% en presencia de 1 eq. de zinc y se reduce en forma lineal con la adición de cantidades crecientes de calcio, sin mostrar saturación (ver Figura 14- Figura 15).

En los trabajos previos<sup>7-8</sup> realizados a pH 10 (TRIS), se encontró que los ligantes **2** y **4** presentan una respuesta radiométrica al coordinarse con zinc y sus espectros muestran una banda de excímero más intensa. En este trabajo realizado a pH 7.2 (MOPS) no se observó dicha respuesta radiométrica, a pesar de que el ligante **2** si presentó una afinidad importante a los iones de zinc. Sin embargo, es importante mencionar que los ligantes **5** y **6**, que no habían sido evaluados previamente, presentaron una respuesta radiométrica y los resultados indican que podrían funcionar como sensores de zinc a pH fisiológico.

Para analizar el efecto de la estructura de los ligantes **1-6** en el modo de respuesta a la coordinación con iones de zinc a pH 7.2 (amortiguador MOPS), es útil agruparlos de acuerdo a sus características:

- a) En el grupo de cuatro ligantes derivados edta (**1-4**) se pueden comparar las respuestas fluorescentes de **1** vs **3** y de **2** vs **4**, cuyas estructuras se diferencian por la presencia del puente metileno como grupo espaciador. En estos dos casos, no se observó una diferencia importante en el comportamiento de la fluorescencia por efecto de la coordinación a zinc.



Esto significa que la presencia del grupo no-coordinante metileno, no es determinante en la respuesta de las moléculas frente a la coordinación.

- b) Por otro lado, dentro del grupo de cuatro ligantes que contienen como unidades fluoróforas unidades aminometilnaftaleno (**3-6**), se pueden comparar las respuestas de **3 vs 5** y **4 vs 6**, cuya única diferencia es el tamaño y tipo de la cadena de interconexión (edta vs dtpa). En estos dos casos, los ligantes más grandes y con mayor número de átomos coordinantes (**5 y 6**) presentaron las respuestas más notables. Esto implica que la mejor capacidad de coordinación de la cadena dtpa (mayor número de grupos donadores), así como su mayor flexibilidad respecto a edta, favorecen un mejor modo de respuesta fluorescente de los ligantes **5 y 6** respecto a **3 y 4**.
- c) Por último, al analizar las respuestas entre los miembros de cada par de derivados 1-naftil vs 2-naftil (**1 vs 2**, **3 vs 4** y **5 vs 6**) se observa que invariablemente la fluorescencia de los derivados 2-naftil presenta mayores cambios al coordinarse al zinc. Esta característica puede estar relacionada con efectos estéricos y las diferentes conformaciones que adquieren los derivados 1-naftil vs 2-naftil en solución, antes y después de la coordinación a zinc.

## CONCLUSIONES

- Los resultados de este trabajo muestran que los ligantes **1-6** presentan tipos diferentes de respuestas en sus espectros de fluorescencia al coordinar a zinc, calcio o magnesio en solución acuosa a pH= 7.2.
- La longitud de la cadena de interconexión, el sitio de unión de los grupos cromóforos y la presencia de grupos espaciadores metileno influyen en el modo de respuesta fluorescente de los ligantes al coordinar a los metales.
- Los ligantes derivados de dtpa **5** y **6** son prácticamente insensibles a la presencia de calcio o magnesio, además presentan cambios de tipo radiométrico en sus espectros de fluorescencia al coordinar a zinc, lo cual es muy atractivo desde el punto de vista analítico.
- Los estudios de competencia revelaron que la respuesta radiométrica de los ligantes **5** y **6** a zinc se mantiene aún en presencia de calcio y/o magnesio, lo cual indica la selectividad de los compuestos a dicho metal.
- Con base en las respuestas selectivas a zinc frente a calcio y magnesio, se puede establecer que los compuestos **5** y **6** tienen potencial de ser aplicados como quimiosensores fluorescentes de dicho metal en agua a pH=7.2.

## PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo estudios con más metales de transición de importancia biológica.
- Realizar estudios de competitividad cinética con los diferentes iones metálicos estudiados, así como algunos otros de interés biológico.
- Realizar estudios con los ligantes 1-6 utilizando buffer HEPES ya que es mucho más utilizado en el cultivo de celular.
- Realizar modelado molecular para apreciar cómo es que se dan las interacciones metal-ligante basado en los resultados de este trabajo.
- Buscar una metodología de aplicación para los ligantes **5** y **6** como sensores de zinc en concentraciones micro molar como por ejemplo en la imagenología de células neuronales.
- Sintetizar y caracterizar los ligantes derivados de dtpa sin el puente metileno que une a los grupos fluoróforos; y probarlos bajo las mismas condiciones de los experimentos realizados en este trabajo para analizar su comportamiento frente a zinc(II).

## REFERENCIAS

1. Safin, D. A.; Babashkina, M. G.; Garcia, Y., Crown ether-containing Schiff base as a highly efficient "turn-on" fluorescent sensor for determination and separation of Zn<sup>2+</sup> in water. *Dalton Transactions* **2013**, 42 (6), 1969-1972.
2. Dai, Z.; Canary, J. W., Tailoring tripodal ligands for zinc sensing. *New Journal of Chemistry* **2007**, 31 (10), 1708-1718.
3. Lu, X.; Zhu, W.; Xie, Y.; Li, X.; Gao, Y.; Li, F.; Tian, H., Near-IR Core-Substituted Naphthalenediimide Fluorescent Chemosensors for zinc Ions: Ligand Effects on PET and ICT Channels. *Chemistry – A European Journal* **2010**, 16 (28), 8355-8364.
4. Kikuchi, K.; Komatsu, K.; Nagano, T., Zinc sensing for cellular application. *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, 8 (2), 182-191.
5. Kim, K. S.; Jun, E. J.; Kim, S. K.; Choi, H. J.; Yoo, J.; Lee, C.-H.; Hyun, M. H.; Yoon, J., Fluorescent studies of two new binaphthyl–azacrown–anthracene fluorophores with metal ions and chiral guests: dual fluorescent detection via binaphthyl and anthracene groups. *Tetrahedron Letters* **2007**, 48 (14), 2481-2484.
6. Lohar, S.; Banerjee, A.; Sahana, A.; Banik, A.; Mukhopadhyay, S. K.; Das, D., A rhodamine-naphthalene conjugate as a FRET based sensor for Cr<sup>3+</sup> and Fe<sup>3+</sup> with cell staining application. *Analytical Methods* **2013**, 5 (2), 442-445.
7. Machi, L.; Santacruz, H.; Sánchez, M.; Inoue, M., Bichromophoric Naphthalene Derivatives of Ethylenediaminetetraacetate: Fluorescence from Intramolecular Excimer, Protonation and Complexation with Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. *Supramolecular Chemistry* **2006**, 18 (7), 561-569.
8. Machi, L.; Santacruz, H.; Sánchez, M.; Inoue, M., Cd<sup>2+</sup>-sensing bichromophore: Excimer emission from an EDTA-methylnaphthalene derivative. *Inorganic Chemistry Communications* **2007**, 10 (5), 547-550.
9. Santacruz Ortega, H. d. C. Síntesis y caracterización espectroscópica de agentes quelantes fluorescentes y sus complejos metálicos. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México, **2007**.
10. Berg, J. M.; Shi, Y., The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science-new york then washington-* **1996**, 1081-1085.
11. Clarke, N. D.; Berg, J. M., Zinc fingers in *Caenorhabditis elegans*: finding families and probing pathways. *Science* **1998**, 282 (5396), 2018-2022.
12. Jiang, P.; Guo, Z., Fluorescent detection of zinc in biological systems: recent development on the design of chemosensors and biosensors. *Coordination Chemistry Reviews* **2004**, 248 (1–2), 205-229.
13. Rubio, C.; González Weller, D.; Martín-Izquierdo, R. E.; Revert, C.; Rodríguez, I.; Hardisson, A., El zinc: oligoelemento esencial. *Nutrición Hospitalaria* **2007**, 22 (1), 101-107.
14. Valeur, B., *Molecular fluorescence: principles and applications*. Wiley-VCH: **2002**.
15. Lakowicz, J. R.; Masters, B. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edition. *Journal of Biomedical Optics* **2008**, 13 (2), 029901-2.

16. Stokes, G. G., The Conservation of Energy, Theories of Absorption and Resonating Molecules. 1851-1854. Thomson, A. J. Å. a. W., Ed. the Royal Society of London, 1983, 38 1 79-107; 1743-0178
17. Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N.; Martin, M. M., *Photophysics and Photochemistry of Supramolecular Systems*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: **2007**; p 220-264.
18. Zhang, Y.; Murphy, C. B.; Jones, W. E., Poly[p-(phenyleneethynylene)-alt-(thienyleneethynylene)] Polymers with Oligopyridine Pendant Groups: Highly Sensitive Chemosensors for Transition Metal Ions. *Macromolecules* **2001**, *35* (3), 630-636.
19. Arunkumar, E.; Chithra, P.; Ajayaghosh, A., A Controlled Supramolecular Approach toward Cation-Specific Chemosensors: Alkaline Earth Metal Ion-Driven Exciton Signaling in Squaraine Tethered Podands. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (21), 6590-6598.
20. Czarnik, A. W., Chemical Communication in Water Using Fluorescent Chemosensors. *Accounts of Chemical Research* **1994**, *27* (10), 302-308.
21. Liu, J.; Lu, Y., A DNAzyme Catalytic Beacon Sensor for Paramagnetic Cu<sup>2+</sup> Ions in Aqueous Solution with High Sensitivity and Selectivity. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (32), 9838-9839.
22. Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y., A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* **1985**, *260* (6), 3440-3450.
23. Czarnik Anthony, W., Supramolecular Chemistry, Fluorescence, and Sensing. In *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*, American Chemical Society: **1993**; Vol. 538, pp 1-9.
24. Lodeiro, C.; Pina, F., Luminescent and chromogenic molecular probes based on polyamines and related compounds. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253* (9-10), 1353-1383.
25. Shiraishi, Y.; Ishizumi, K.; Nishimura, G.; Hirai, T., Effects of metal cation coordination on fluorescence properties of a diethylenetriamine bearing two end pyrene fragments. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111* (30), 8812-8822.
26. Shiraishi, Y.; Tokitoh, Y.; Hirai, T., pH- and H<sub>2</sub>O-driven triple-mode pyrene fluorescence. *Organic Letters* **2006**, *8* (17), 3841-3844.
27. Machi L., M. I. C., Pérez-González R., Sánchez M. and Inoue M., Pyrene bichromophores composed of polyaminopolycarboxylate interlink: pH response of excimer emission. *Supramolecular Chemistry* **2009**, *21* (8), 665 - 673.
28. Pérez-González, R.; Machi, L.; Inoue, M.; Sánchez, M.; Medrano, F., Fluorescence and conformation in water-soluble bis(pyrenyl amide) receptors derived from polyaminopolycarboxylic acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2011**, *219* (1), 90-100.
29. Albelda, M. T.; Bernardo, M. A.; Díaz, P.; García-España, E.; de Melo, J. S.; Pina, F.; Soriano, C.; Luis, S. V., Polyamines containing naphthyl groups as pH-regulated molecular machines driven by light. Electronic supplementary information (ESI) available: synthesis and characterisation data for L1-L4, protonation constants and spectra. *Chemical Communications* **2001**, (16), 1520-1521.

30. Machi, L.; Santacruz Ortega, H.; Carrillo Moreno, E., Derivados dtpa-aminometilnaftaleno: nuevos quimiosensores fluorescentes de cationes metálicos en solución. In *Boletín de la sociedad química de México, The Journal of the Mexican Chemical Society*: México, DF, 2007; Vol. Vol. 1, p 95.
31. Frederickson, C. J.; Kasarskis, E. J.; Ringo, D.; Frederickson, R. E., A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. *Journal of neuroscience methods* **1987**, *20* (2), 91-103.
32. Thompson, R. B.; Peterson, D.; Mahoney, W.; Cramer, M.; Maliwal, B. P.; Suh, S. W.; Frederickson, C.; Fierke, C.; Herman, P., Fluorescent zinc indicators for neurobiology. *Journal of neuroscience methods* **2002**, *118* (1), 63-75.
33. Zalewski, P. D.; Forbes, I. J.; Betts, W. H., Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy) acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn (II). *Biochemistry journal* **1993**, *296*, 403-408.
34. Mahadevan, I. B.; Kimber, M. C.; Lincoln, S. F.; Tiekink, E. R. T.; Ward, A. D.; Betts, W. H.; Forbes, I. J.; Zalewski, P. D., The synthesis of zinquin ester and zinquin acid, zinc(II)-specific fluorescing agents for use in the study of biological zinc(II). *Australian journal of chemistry* **1996**, *49* (5), 561-568.
35. M. Hendrickson, K.; Rodopoulos, T.; Pittet, P.-A.; Mahadevan, I.; F. Lincoln, S.; David Ward, A.; Kurucsev, T.; A. Duckworth, P.; J. Forbes, I.; D. Zalewski, P.; Henry Betts, W., Complexation of zinc(II) and other divalent metal ions by the fluorophore 2-methyl-8-(toluene-p-sulfonamido)-6-quinolyloxyacetic acid in 50% aqueous ethanol. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1997**, (20), 3879-3882.
36. Tsien, R. Y., A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* **1981**. *290*, 527 - 528.
37. Coyle, P.; Zalewski, P. D.; Philcox, J. C.; Forbes, I. J.; Ward, A. D.; Lincoln, S. F.; Mahadevan, I.; Rofe, A. M., Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, zinquin: relationship to metallothionein and intracellular zinc. *Biochem. J* **1994**, *303*, 781-786.
38. Zalewski, P. D.; Millard, S. H.; Forbes, I. J.; Kapaniris, O.; Slavotinek, A.; Betts, W. H.; Ward, A. D.; Lincoln, S. F.; Mahadevan, I., Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1994**, *42* (7), 877-884.
39. Kimber, M. C.; Mahadevan, I. B.; Lincoln, S. F.; Ward, A. D.; Tiekink, E. R. T., The synthesis and fluorescent properties of analogues of the zinc(II) specific fluorophore Zinquin ester. *The Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65* (24), 8204-8209.
40. Jiang, P.; Chen, L.; Lin, J.; Liu, Q.; Ding, J.; Gao, X.; Guo, Z., Novel zinc fluorescent probe bearing dansyl and aminoquinoline groups. *Chemical Communications* **2002**, (13), 1424-1425.
41. Wang, H.-H.; Gan, Q.; Wang, X.-J.; Xue, L.; Liu, S.-H.; Jiang, H., A Water-Soluble, Small Molecular Fluorescent Sensor with Femtomolar Sensitivity for zinc Ion. *Organic Letters* **2007**, *9* (24), 4995-4998.

42. Xu, Z.; Yoon, J.; Spring, D. R., Fluorescent Chemosensors for Zn<sup>2+</sup>. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39* (42), 1996-2006.
43. Zhang, Y.; Guo, X.; Si, W.; Jia, L.; Qian, X., Ratiometric and water-soluble fluorescent zinc sensor of carboxamidoquinoline with an alkoxyethylamino chain as receptor. *Organic letters* **2008**, *10* (3), 473-476.
44. Xue, L.; Liu, Q.; Jiang, H., Ratiometric Zn<sup>2+</sup> Fluorescent Sensor and New Approach for Sensing Cd<sup>2+</sup> by Ratiometric Displacement. *Organic Letters* **2009**, *11* (15), 3454-3457.
45. Burdette, S. C.; Walkup, G. K.; Spingler, B.; Tsien, R. Y.; Lippard, S. J., Fluorescent Sensors for Zn<sup>2+</sup> Based on a Fluorescein Platform: Synthesis, Properties and Intracellular Distribution. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (32), 7831-7841.
46. Arman, S. A. V. a. n.; Sisk, T. M.; Zawrotny, D. M., A Novel Mechanism of Specificity of Response in Ratiometric Fluorescence Sensing of d10 Metal Ions. *Letters in Organic Chemistry* **2005**, *2* (1), 54-56.
47. Misra, A.; Shahid, M.; Srivastava, P., Optoelectronic behavior of bischromophoric dyads exhibiting Zn<sup>2+</sup>-ions induced "turn-On/Off" fluorescence. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, *169*, 327-340.
48. Vogel, A. I.; Mendham, J., *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis*. 5<sup>th</sup> ed.; Longman Scientific & Technical, **1989**.
49. Ueno, K., Guide for selecting conditions for EDTA titrations. *Journal of Chemical Education* **1965**, *42* (8), 432.

## ANEXOS

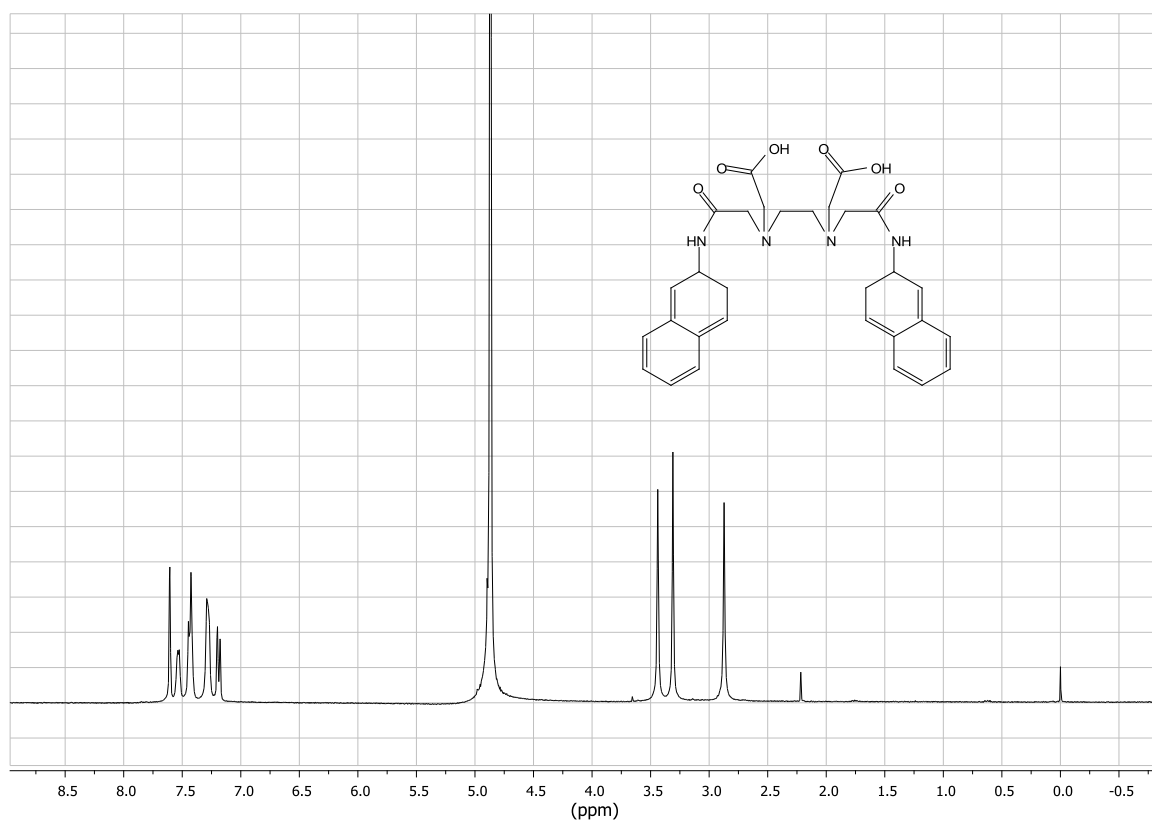


Figura A 1. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **2** ( $((\text{edta}2\text{nap})\text{H}_2)$ ) en  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 10.47.

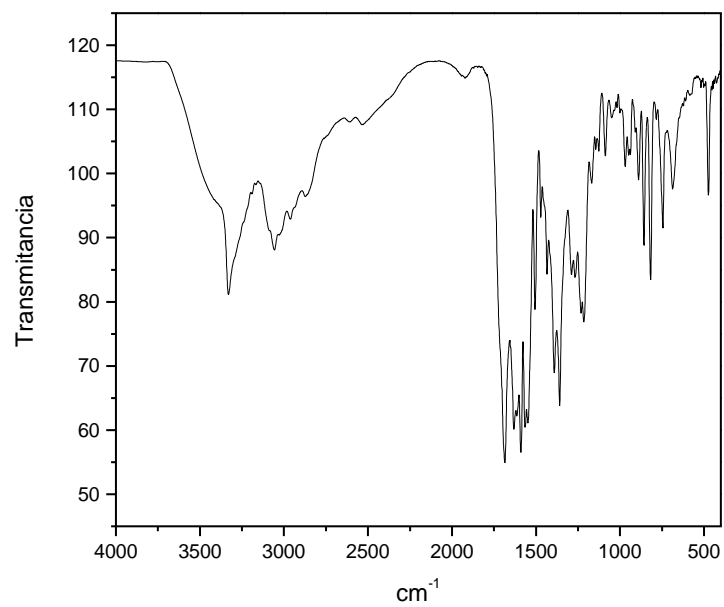


Figura A 2. Espectro de Infrarrojo de **2** ( $((\text{edta}2\text{nap})\text{H}_2)$ ).



**Tabla A 1**

<i>Tabla A 1. Diámetro iónico, densidad de carga y número de coordinación de algunos cationes.</i>			
<b>Catión</b>	<b>Diámetro iónico (Å)</b>	<b>Densidad de carga (qÅ)</b>	<b>Número de coordinación</b>
Li <sup>+</sup>	1.36	1.47	6
Na <sup>+</sup>	1.94	1.03	6
K <sup>+</sup>	2.66	0.75	6
Mg <sup>2+</sup>	1.32	3.03	4 ó 5
Ca <sup>2+</sup>	1.98	2.02	7 ó 9
Ba <sup>2+</sup>	2.68	1.49	9
Ni <sup>2+</sup>	1.38	2.9	4 ó 6
Cu <sup>2+</sup>	1.44	2.78	4 ó 6
Zn <sup>2+</sup>	1.48	2.7	4 ó 6
Cd <sup>2+</sup>	1.94	2.06	4 ó 6
Pb <sup>2+</sup>	2.4	1.67	4 ó 6

Ref: <sup>[14]</sup>

### **Actividades Derivadas de Este Trabajo.**

1. Estudio de ligantes acíclicos bis-cromóforicos derivados edta y dtpa funcionalizados con naftaleno como sensores de  $Zn^{2+}$ . **Vera M.\***, Machi L., Santacruz H. X Coloquio Bienal en Ciencia de Materiales. Marzo de **2013**.