

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de ingeniería

Departamento de Investigación de Polímeros y Materiales

Síntesis de nuevos receptores fluorescentes acíclicos tipo *bis*-naftil con capacidad de sensar selectivamente a los iones Zn(II) y Cd(II) en agua a pH

fisiológico

TODO · LO · ILUMINAN

TESIS

Para obtener el título de:

1942

DOCTOR EN CIENCIA DE MATERIALES

Por:

Moises Vera Pacheco

Hermosillo, Sonora

Enero de 2020

Repositorio Institucional UNISON



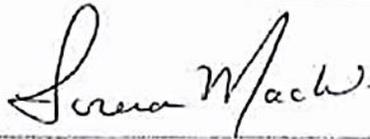
**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



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

Forma de Aprobación

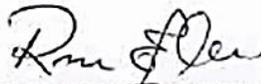
Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de doctorado de **Moises vera Pacheco** han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencia de Materiales otorgado por la Universidad de Sonora.



Dra. Lorena Machi Lara
Directora de Tesis



Dra. Hisila Santacruz Ortega
Sinodal



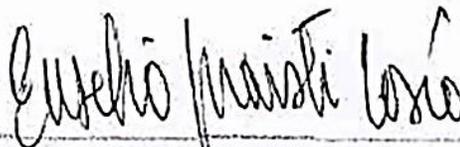
Dra. Rosa Elena Navarro Gautrin
Sinodal



Dr. Jesús Manuel Quiroz Castillo
Sinodal



Dr. Fernando Rocha Alonzo
Sinodal



Dr. Eusebio Juaristi Cosío
Sinodal Externo

*A todos los seres que brillan en mi vida. Sin ellos, no tendría el coraje de
perseguir mis sueños.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mi directora de tesis Dra. Lorena Machi Lara por todo este tiempo que he trabajado a su lado bajo su dirección, por la forma de guiarme académicamente y como me ha hecho crecer a largo de todos estos años, siempre buscando la mejor forma de hacer las cosas y a ponerle empeño a los detalles, por mostrarme que hasta de los experimentos fallidos siempre se puede rescatar algo, por la dedicación y esfuerzo invertido en este trabajo, por ideas aportadas estoy infinitamente agradecidos.

También quiero hacer un agradecimiento al Dr. Motomichi Inoe ya que una de las personas que más admiro y me inspiran en el mundo de la ciencia, gracias por su disponibilidad y amabilidad, así como las aportaciones realizadas en este trabajo.

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
- Conacyt por la beca Otorgada
- Red Temática de Química Supramolecular

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 y el impacto que tuvieron dentro de mi formación como Doctor: Dra. Rosa Elena Navarro, Dra. Hisila Santacruz, Dr. Fernando Rocha Alonzo, Dr. Jesús Quiroz y al Dr. Eusebio Juaristi.

También quisiera mencionar a otros doctores que aportaron en este trabajo como el Dr. Felipe Medrano y el Dr. José Cabellos.

A mi familia que siempre está conmigo y ser un gran soporte, 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 (Vianey Quevedo, Octavio Serna, Lalo Ávila, Jan Carlo Gómez, Adilene Grijalva, Claudia, Lorena Armenta, Refugio Pérez, Yedith Soberanes) y a mis amigos que siempre me alientan a seguir adelante y siempre dar un poco más Ramón Meza, Eliezer Sánchez, Miguel Aguiar, Ada García y Efraín Vázquez. Y a otro grupo de personas que resultan muy especiales y conozco desde hace mucho tiempo como Angelina Félix, Cristal Alcaraz, Carlos Gómez, Fabián Simental y Polet Camacho. A Mario Fontes y Lizeth Duarte por sus consejos de vida que me hacen crecer. A personas que recién han aparecido en mi vida para brillar como Lilian Mancillas, Carolina Gálvez y Karla García, todos ellos han hecho posible directa o indirectamente el poder concluir este trabajo.

Siempre he pensado que algunas cosas pasan por algo o están predestinadas a suceder, aunque no tengamos idea por qué. El universo esta ordenado y unido de una forma que nuestra mente aun no logra imaginar y por lo tanto comprender.

Buenos recuerdos encontré sin noción durante el aprendizaje, sin saber o apreciar muchos conocimientos, ninguna idea surgió sin guiarme. No obstante, hubo dificultades, pero son parte de cualquier proyecto y esto genera una gran satisfacción al concluirlo. Sabiduría, conocimiento y paciencia fueron grandes lecciones aprendidas durante la construcción de este proyecto, por lo anterior quiero dar infinitas gracias a todos por su apoyo.

INDICE

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE FIGURAS DE ANEXOS	XV
LISTA DE TABLAS	XVI
LISTA DE TABLAS ANEXOS	XVII
LISTA DE ESQUEMAS	XVIII
ABSTRACT	XIX
RESUMEN	XXI
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	6
<i>Objetivo general:</i>	6
<i>Objetivos particulares:</i>	6
1. ANTECEDENTES	7
1.1. Importancia biológica del Zinc	7
1.2. Efectos adversos del Cadmio en sistemas biológicos	9
1.3. Quimiosensores fluorescentes	11
1.3.1. Quimiosensores fluorescentes tipo PET	12
1.3.2. Quimiosensores fluorescentes tipo PCT	13
1.3.3. Quimiosensores fluorescentes basados en formación de excímeros	15
1.4. Quimiosensores fluorescentes capaces de discriminar entre los iones de cadmio y zinc	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. Materiales	21
2.2. Síntesis de los ligantes	22
2.2.1. Síntesis de $(dtpa1nap)H_3$ (1)	22
2.2.2. Síntesis de $(dtpa2nap)H_3$ (2)	24
2.2.3. Caracterización de los ligantes $(dtpa1nap)H_3$ (1) y $(dtpa2nap)H_3$ (2)	25
2.3. Mediciones espectroscópicas	25
2.3.1. RMN vs pD	25
2.3.2. Fluorescencia vs pH	25

2.3.3.	<i>Estudios de coordinación metálica en solución</i>	26
2.3.4.	<i>Determinación de los rendimientos cuánticos de los compuestos</i> <i>(dtpa1nap)H₃ (1), (dtpa2nap)H₃ (2), (dtpa1mnap)H₃ (3) y (dtpa2mnap)H₃ (4)</i>	27
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
3.1.	<i>Estudios de protonación por RMN ¹H de los compuestos (dtpa1nap)H₃ (1), (dtpa2nap)H₃ (2), (dtpa1mnap)H₃ (3) y (dtpa2mnap)H₃ (4)</i>	29
3.2.	<i>Estudios de fluorescencia de los compuestos (dtpa1nap)H₃ (1), (dtpa2nap)H₃ (2), (dtpa1mnap)H₃ (3) y (dtpa2mnap)H₃ (4)</i>	34
3.3.	<i>Estudios de coordinación a Zn²⁺ y Cd²⁺ de los ligantes (dtpa1nap)H₃ (1), (dtpa2nap)H₃ (2), (dtpa1mnap)H₃ (3) y (dtpa2mnap)H₃ (4)</i>	38
3.3.1.	<i>Ligantes (dtpa1nap)H₃ (1) y (dtpa2nap)H₃ (2)</i>	39
3.3.1.1.	Coordinación a Zn ²⁺	39
3.3.1.2.	Coordinación a Cd ²⁺	41
3.3.1.3.	Análisis de los resultados de la coordinación de (dtpa1nap)H ₃ (1) y (dtpa2nap)H ₃ (2) a Zn ²⁺ y Cd ²⁺	41
3.3.2.	<i>Ligantes (dtpa1mnap)H₃ (3) y (dtpa2mnap)H₃ (4)</i>	42
3.3.2.1.	Coordinación a Zn ²⁺	42
3.3.2.2.	Coordinación a Cd ²⁺	43
3.3.2.3.	Análisis de los resultados de la coordinación de (dtpa1mnap)H ₃ (3) y (dtpa2mnap)H ₃ (4) a Zn ²⁺ y Cd ²⁺	45
3.4.	<i>Estudio comparativo del efecto de la coordinación a diversos cationes metálicos en la fluorescencia de los ligantes (dtpa1nap)H₃ (1), (dtpa2nap)H₃ (2), (dtpa1mnap)H₃ (3) y (dtpa2mnap)H₃ (4)</i>	46
4.	CONCLUSIONES	49
5.	PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	51
6.	REFERENCIAS	52
7.	ANEXO 1	58
7.1.	<i>Determinación de las constantes de protonación mediante titulaciones espectrométricas</i>	58
7.2.	<i>Determinación de K_p mediante mediciones del desplazamiento químico de protón en función del pD</i>	59

7.3.	<i>Determinación de K_p mediante la medición de los cambios en la intensidad de fluorescencia en función del pH</i>	59
7.3.1.	<i>Descripción del efecto amida en la intensidad de fluorescencia para el cálculo de sus constantes.</i>	60
7.4.	<i>Determinación de K_{cond} para complejos metálicos en fluorescencia</i>	61
8.	ANEXO 2	63
9.	PRODUCTOS DE ESTE TRABAJO	67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principios de detección de H^+ o cationes metálicos (M^{n+}) por sensores fluorescentes de tipo PET.⁴⁵ 13
- Figura 2.** Cambios en las energías de los estados basal y excitado de los sensores PCT como resultado de la interacción de un catión con un grupo donador (D) o aceptor (A) de electrones.⁴⁵ 14
- Figura 3.** Diseño de quimiosensores fluorescentes de tipo bis-cromofóricos con respuesta monómero (λ_1) y excímero (λ_2). 15
- Figura 4.** Estructura de los derivados L_0 y L_{1a-1c} reportados por J. Fan et al.⁵⁰ y C. Lu et al.²⁵, respectivamente. 17
- Figura 5.** Estructura de los derivados ZTRS reportados por Z. Xu et al.²⁶ 18
- Figura 6.** Estructura de los derivados QB reportados por L. Xue et al.⁵¹ 19
- Figura 7.** Sensor basado en 8-aminoquinolina unida a 8-hidroxiquinolina.²⁸ 20
- Figura 8.** (Arriba) Relación de intensidades excímero/monómero (I_E/I_M) de (dtpa1nap) H_3 (**1**) en función de pH (cuadrados, $\lambda_{exc} = 280$ nm; concentración = 5×10^{-5} M), ajuste por mínimos cuadrados no-lineales basado en la **Ecuación 4** (línea punteada) con las constantes de equilibrio que se muestran en la **Tabla 3**, fracciones molares de las especies (dtpa1nap) $H_n^{(3-n)-}$ responsables de los cambios en la emisión (líneas sólidas) y de las determinadas por RMN 1H (líneas discontinuas, por claridad solo se etiquetó la especie monoprotonada con cursiva y negrita LH^{2-}). (Abajo) Desplazamientos químicos (δ) de protón en función del pD (círculos) y los mejores ajustes basados en la **Ecuación 3** (líneas sólidas). 30
- Figura 9.** (Arriba) Relación de intensidades excímero/monómero (I_E/I_M) de (dtpa2nap) H_3 (**2**) en función de pH (cuadrados, $\lambda_{exc} = 280$ nm; concentración = 5×10^{-5} M), ajuste por mínimos cuadrados no-lineales basado en la **Ecuación 4** (línea punteada) con las constantes de equilibrio que se muestran en la **Tabla 3**, fracciones molares de las especies (dtpa2nap) $H_n^{(3-n)-}$ responsables de los cambios en la emisión (líneas sólidas) y de las determinadas por RMN 1H (líneas discontinuas, por claridad solo se etiquetó la especie monoprotonada con cursiva y negrita LH^{2-}). (Abajo)

Desplazamientos químicos (δ) de protón en función del pD (círculos) y los mejores ajustes basados en la **Ecuación 3** (líneas sólidas). 31

Figura 10. (Arriba) Intensidad de emisión (u.a.) de (dtpa1mnap) H_3 (**3**) a $\lambda = 338$ nm en función del pH ($\lambda_{exc} = 280$ nm; concentración = 1×10^{-6} M), ajuste por mínimos cuadrados no-lineales basado en la **Ecuación 4** (línea punteada) con las constantes de equilibrio que se muestran en la **Tabla 3**, fracciones molares de las especies (dtpa1mnap) $H_n^{(3-n)-}$ responsables de los cambios en la emisión (líneas sólidas) y de las determinadas por RMN 1H (líneas discontinuas, por claridad solo se etiquetó la especie monoprotonada con cursiva y negrita ***LH*²⁻**). (Abajo) Desplazamientos químicos (δ) de protón en función del pD (círculos) y los mejores ajustes basados en la **Ecuación 3** (líneas sólidas). 32

Figura 11. (Arriba) Intensidad de emisión (a.u.) de (dtpa2mnap) H_3 (**4**) a $\lambda = 335$ nm en función del pH ($\lambda_{exc} = 280$ nm; concentración = 1×10^{-6} M), ajuste por mínimos cuadrados no-lineales basado en la **Ecuación 4** (línea punteada) con las constantes de equilibrio que se muestran en la **Tabla 3**, fracciones molares de las especies (dtpa1mnap) $H_n^{(3-n)-}$ responsables de los cambios en la emisión (líneas sólidas) y de las determinadas por RMN 1H (líneas discontinuas, por claridad solo se etiquetó la especie monoprotonada con cursiva y negrita ***LH*²⁻**). (Abajo) Desplazamientos químicos (δ) de protón en función del pD (círculos) y los mejores ajustes basados en la **Ecuación 3** (líneas sólidas). 33

Figura 12. Espectros de emisión de A) (dtpa1nap) H_3 y B) (dtpa2nap) H_3 en solución acuosa a diferentes valores de pH: para (dtpa1nap) H_3 , (a) pH 11.9, (b) 10.6 y (c) 4.1; para (dtpa2nap) H_3 , (a) pH 12.0, (b) 4.0 y (c) 2.1. Las intensidades de los espectros de emisión están normalizadas al pico máximo del espectro más intenso de cada compuesto. $\lambda_{exc} = 280$ nm; concentración = 5×10^{-5} M. 35

Figura 13. Espectros de emisión de (dtpa1mnap) H_3 (línea discontinua) y (dtpa2mnap) H_3 (línea continua) en solución acuosa a valores de pH seleccionados: para (dtpa1mnap) H_3 , (1a) pH 11.3, (1b) 7.6 y (1c) 3.1; para (dtpa2mnap) H_3 , (2a) pH 11.2, (2b) 7.6 y (2c) 3.1. Las intensidades de los espectros de emisión están normalizados por el pico máximo de intensidad para cada compuesto. $\lambda_{exc} = 280$ nm; concentración = 1×10^{-6} M. 37

- Figura 14.** Espectros de fluorescencia de (dtpa1nap)H₃ (izquierda) y (dtpa2nap)H₃ (derecha) en presencia de Zn²⁺ en diferentes relaciones de las concentraciones totales [Zn]_t/[L]_t a pH 7.2 en solución amortiguadora MOPS 0.01 M. [L]_t = 5 × 10⁻⁵ M, λ_{exc} = 280 nm. Recuadros: Intensidad del pico máximo en función de [Zn]_t/[L]_t; las líneas continuas muestran la regresión lineal para (dtpa1nap)H₃ y un ajuste de mínimos cuadrados basado en la estequiometría ZnL para (dtpa2nap)H₃. 40
- Figura 15.** Espectros de fluorescencia de (dtpa1mnap)H₃ (izquierda) y (dtpa2mnap)H₃ (derecha) en presencia de Zn²⁺ en diferentes proporciones de las concentraciones totales [Zn]_t/[L]_t a pH 7.2 en 0.01 M de tampón MOPS. [L]_t = 1 × 10⁻⁶ M, λ_{exc} = 280 nm. Recuadros: relación de intensidades excímero/monómero como función de [Zn]_t/[L]_t; las líneas continuas representan el ajuste por mínimos cuadrados basados en la estequiometría de ZnL₂. 43
- Figura 16.** Espectros de fluorescencia de (dtpa1mnap)H₃ (izquierda) y (dtpa2mnap)H₃ (derecha) en presencia de Cd²⁺ en diferentes proporciones de las concentraciones totales [Cd]_t/[L]_t a pH 7.2 en 0.01 M de tampón MOPS. [L]_t = 1 × 10⁻⁶ M, λ_{exc} = 280 nm. Recuadros: intensidades de emisión de excímero a 400 nm como función de [Cd]_t/[L]_t; las líneas continuas representan el ajuste por mínimos cuadrados basados en la estequiometría de CdL. 44
- Figura 17.** Tendencia de excímero y monómero para los complejos formados de dtpa2mnap con Cd²⁺ y Zn²⁺. 45
- Figura 18.** Variación de las intensidades de emisión, (I - I₀)/I₀, de monómero (barras negras) y excímero (barras grises) de (dtpa1nap)H₃ y (dtpa2nap)H₃ (arriba) y (dtpa1mnap)H₃ y (dtpa2mnap)H₃ (abajo) en presencia de varios iones metálicos (añadidos en forma de cloruros). I₀ es la intensidad de emisión del ligante solo, I es la intensidad en [M]_t/[L]_t = 5. El último se corrigió por dilución con base en la ley de Beer. En el caso de Pb-(dtpa1nap)H₃, la intensidad de emisión está dada por [M]_t/[L]_t = 0.5 y (Pb-dtpa2nap)H₃ [M]_t/[L]_t = 1 debido a la precipitación a mayores concentraciones de metal. [L]_t = 5 × 10⁻⁵ M para (dtpa1nap)H₃ y (dtpa2nap)H₃ y 1 × 10⁻⁶ M para (dtpa1mnap)H₃ y (dtpa2mnap)H₃; pH 7.2 en solución amortiguadora MOPS 0.01 M; λ_{exc} = 280 nm. 48

LISTA DE FIGURAS DE ANEXOS

- Figura Anexo 1.** Espectro de RMN ^1H de **1** (dtpa1nap) H_3 en $\text{D}_2\text{O}/\text{DSS}$ pD = 9.0. 63
- Figura Anexo 2.** Espectro de RMN ^1H de **2** (dtpa2nap) H_3 en $\text{D}_2\text{O}/\text{DSS}$ pD = 10.2 64
- Figura Anexo 3.** Espectros de fluorescencia de (dtpa1nap) H_3 (**1**) (izquierda) y (dtpa2nap) H_3 (**2**) (derecha) en presencia de Cd^{2+} a diferentes concentraciones $[\text{Cd}]_t/[\text{L}]_t$ a pH 7.2 en 0.01 M MOPS buffer. $[\text{L}]_t = 5 \times 10^{-5}$ M, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Recuadros: intensidad del máximo de emisión en función de $[\text{Cd}]_t/[\text{L}]_t$; la línea solida representa la regresión lineal. 65
- Figura Anexo 4.** Espectros de fluorescencia de (edta1mnap) H_2 (izquierda) y (edta2mnap) H_2 (derecha) en presencia de Zn^{2+} a diferentes concentraciones $[\text{Zn}^{2+}]_t/[\text{L}]_t$ a pH 8.5 y 8.0 respectivamente en 0.01 M TRIS buffer. $[\text{L}]_t = 5 \times 10^{-5}$ M y $[\text{L}]_t = 1 \times 10^{-6}$ M, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Recuadro izquierda: intensidad del máximo de emisión en función de $[\text{Zn}]_t/[\text{L}]_t$ y Recuadro derecha: relación excímero/monómero en función de $[\text{Zn}]_t/[\text{L}]_t$; la línea solida representa la regresión lineal.⁵⁸ 65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de las soluciones de los ligantes [L] y de los iones metálicos [M] utilizadas en las titulaciones espectrométricas. ^a	27
Tabla 2. Constantes de protonación logarítmicas (K_{Dn}) de los ligantes 1-4 obtenidas por los cambios en el desplazamiento químico (δ) de los protones mostrados entre paréntesis. ^a	34
Tabla 3. Logaritmos de las constantes de equilibrio obtenidas de los cambios en la emisión de fluorescencia de los ligantes 1- 4	36
Tabla 4. Rendimientos cuánticos de los derivados 1-4 .*	38
Tabla 5. Estequiometría y constantes logarítmicas condicionales (con desviación estándar en el dígito menos significativo) de los complejos de Zn^{2+} , y Cd^{2+} a pH 7.2 (solución reguladora MOPS 0.01 M): constantes condicionales, $K_{f1}' = [ML]/[M][L']$ para ML y $\beta_{f2}' = [ML]/[M][L']^2$ para ML_2 . (Abajo) Cambios en la intensidad de emisión tras la complejación, $\Delta = (I_{\text{complejo}} - I_{\text{ligando}})/I_{\text{ligando}}$ para monómero y excímero.	40

LISTA DE TABLAS ANEXOS

Tabla Anexo 1. Estequiometría y constantes logarítmicas condicionales (con desviación estándar en el dígito menos significativo) de los complejos de Cd^{2+} a pH 8.5 (solución reguladora tris 0.01 M) para $(\text{edta1nap})\text{H}_2$ y $(\text{edta2nap})\text{H}_2$ y pH 7.2 (solución reguladora MOPS 0.01 M) para $(\text{dtpa1nap})\text{H}_3$ y $(\text{dtpa2nap})\text{H}_3$: constantes condicionales, $K_{f1}' = [\text{ML}]/[\text{M}][\text{L}']$ para ML. 66

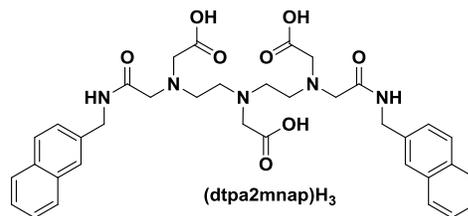
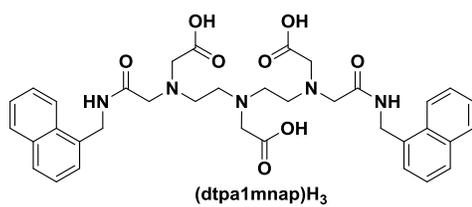
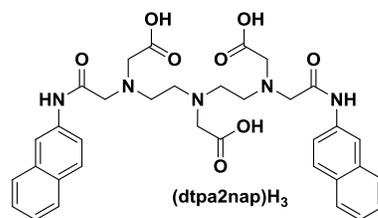
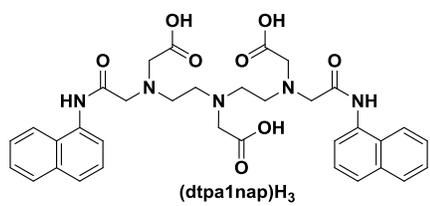
LISTA DE ESQUEMAS

Esquema I.....	3
Esquema II.....	4
Esquema III	23
Esquema IV	24

ABSTRACT

In this work, a coordination study was carried out by fluorescence spectroscopy with four new bischromophoric acyclic chemosensors derived from dtpa, with the purpose of assessing their ability to discriminate between Zn^{2+} and Cd^{2+} ions in water at physiological pH. Each of the compounds studied, called (dtpa1nap) H_3 (**1**), (dtpa2nap) H_3 (**2**), (dtpa1mnap) H_3 (**3**) and (dtpa2mnap) H_3 (**4**), contains two identical aromatic units (1- or 2- naphthyl or methylnaphthyl) isomers interconnected through a dtpa type chelating chain. The compounds in aqueous solution have emission bands of both monomer and naphthalene excimer, whose intensities are sensitive to changes in the pH of the medium due to the formation of species in different protonation states. The fluorescent quantum yields (Φ) of the compounds were determined. The methylnaphthyl derivatives (**3** and **4**) were found to have Φ an order of magnitude greater than the naphthyl derivatives (**1** and **2**). Protonation constants (K_p) of molecules **1-4** were determined both by fluorescence and by 1H NMR. Stoichiometry and conditional formation constants (K_f') of the Zn^{2+} and Cd^{2+} complexes were determined by spectrofluorometric titrations. The results of the coordination study show that of the group of compounds **1-4** only the derivative (dtpa2mnap) H_3 (**4**) has the ability to discriminate between Zn^{2+} and Cd^{2+} by opposite radiometric responses clearly distinguishable from each other: Increase in the excimer-to-monomer intensity ratio (I_E/I_M) in the case of Cd^{2+} and decrease in I_E/I_M in the case of Zn^{2+} . The stoichiometries determined for the Zn^{2+} and Cd^{2+} complexes of ligand **4** are 1:2 (ML_2) and 1:1 (ML), respectively. It was determined that the response of derivative **4** towards the metals of interest is highly selective, since it does not present it against other metal cations evaluated in this work (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} y Pb^{2+}).

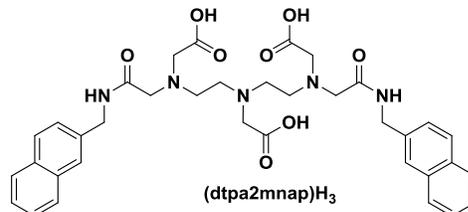
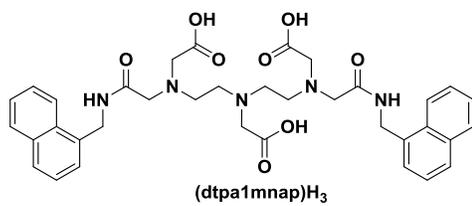
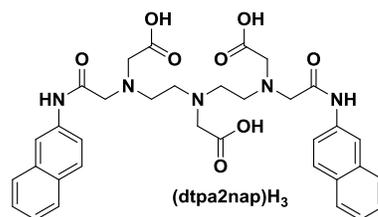
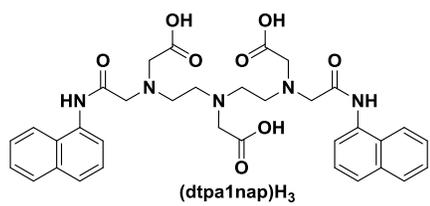
The structures of the compounds presented in this work are shown below.



RESUMEN

En este trabajo se llevó a cabo un estudio de coordinación mediante espectroscopia de fluorescencia con cuatro nuevos quimiosensores acíclicos biscromofóricos derivados de dtpa, con el propósito de evaluar su capacidad de discriminar entre los iones Zn^{2+} y Cd^{2+} en agua a pH fisiológico. Cada uno de los compuestos estudiados, denominados $(dtpa1nap)H_3$ (**1**), $(dtpa2nap)H_3$ (**2**), $(dtpa1mnap)H_3$ (**3**) y $(dtpa2mnap)H_3$ (**4**), contiene dos unidades aromáticas idénticas (naftilo o metilnaftilo, isómeros 1- o 2-) interconectadas a través de una cadena quelante tipo dtpa. Los compuestos en solución acuosa presentan bandas de emisión tanto de monómero como de excímero de naftaleno, cuyas intensidades son sensibles a los cambios en el pH del medio debido a la formación de especies en distintos estados de protonación. Se determinaron los rendimientos cuánticos fluorescentes (Φ) de los compuestos y se encontró que los derivados de metilnaftilo (**3** y **4**) tienen Φ un orden de magnitud mayores que los derivados de naftilo (**1** y **2**). Las constantes de protonación (K_p) de las moléculas **1-4** se determinaron tanto por fluorescencia como por RMN 1H . Las estequiometrías y las constantes de formación condicional (K_f') de los complejos de Zn^{2+} y Cd^{2+} se determinaron mediante titulaciones espectrofluorimétricas. Los resultados del estudio de coordinación muestran que del grupo de compuestos **1-4** únicamente el derivado $(dtpa2mnap)H_3$ (**4**) presenta capacidad de discriminar entre Zn^{2+} y Cd^{2+} mediante respuestas radiométricas opuestas claramente distinguibles entre sí: incremento en la razón de intensidades excímero-monómero (I_E/I_M) en el caso de Cd^{2+} y disminución de I_E/I_M en el caso de Zn^{2+} . Las estequiometrías determinadas para los complejos de Zn^{2+} y Cd^{2+} del ligante **4** son 1:2 (ML_2) y 1:1 (ML), respectivamente. Se determinó que la respuesta del derivado **4** hacia los metales de interés es altamente selectiva, ya que no la presenta frente a otros cationes metálicos evaluados en este trabajo (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} y Pb^{2+}).

A continuación, se muestran las estructuras de los compuestos presentados en este trabajo



INTRODUCCIÓN

Los cationes metálicos juegan papeles críticos en los procesos fundamentales de los seres vivos, incluyendo la regulación osmótica, la catálisis, la biomineralización y la señalización. Entre los más importantes por su función biológica se incluyen sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}), hierro (Fe^{2+} y Fe^{+3}), cobre (Cu^+ y Cu^{2+}) y zinc (Zn^{2+}), siendo este último uno de los más relevantes ya que se ha demostrado que tiene un papel de señalización adicional en el sistema nervioso central,^{1, 2} además de que juega un papel crucial en nuestro organismo por su múltiple funcionalidad como cofactor catalítico, regulador de la expresión genética, procesos inmunológicos, entre otras. Por todo lo anterior, no es extraño que el zinc sea el segundo metal de transición más abundante en nuestro cuerpo.³⁻⁷

Las células de los mamíferos secuestran u obtienen altos niveles de zinc desde su ambiente extracelular, la concentración celular promedio se encuentra en el rango micromolar, la concentración de zinc en suero es de 1-10 μM .⁸ La mayor parte del zinc en las células (lagunas de zinc) está unido a proteínas, enzimas, metabolitos y otras moléculas de bajo peso molecular, de modo que el zinc libre dentro de la célula está en el rango picomolar (pM). Estas lagunas de zinc representan el zinc disponible para sintetizar nuevas proteínas o para su potencial uso en la señalización.⁹ El intervalo normal de concentración de los iones de zinc en sistemas biológicos es tan bajo como en los ejemplos anteriores. Tanto la deficiencia como el exceso causan muchos estados patológicos en nuestro organismo, la acumulación de Zn^{2+} a niveles tóxicos conduce a la muerte celular, mientras que la deficiencia de zinc puede conducir en una cognición deteriorada, disfunción inmune, diarrea, y a veces la muerte.¹⁰ Los avances recientes en la biología tienen énfasis en las funciones biológicas de zinc, en particular, en sus funciones relacionadas con la neurobiología debido a que el zinc realiza un papel de señalización adicional en el sistema nervioso central. Algunos estudios recientes han identificado que el zinc esta críticamente involucrado en fisiopatologías y neuropatologías humanas 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 y autismo.¹¹⁻¹³

Un ion muy relacionado al zinc es el cadmio, con el que comparte muchas propiedades químicas ya que se encuentran en el mismo grupo de la tabla periódica. Las funciones del zinc como cofactor enzimático normalmente son interferidas por el cadmio (son antagónicos) como en el caso de la superóxido dismutasa,¹⁴ catalasa¹⁵ y otras enzimas antioxidantes.¹⁶ Todo esto puede desencadenar efectos citotóxicos y daño en múltiples órganos como huesos, cerebro, riñón e hígado.^{2, 5, 10, 17-19}

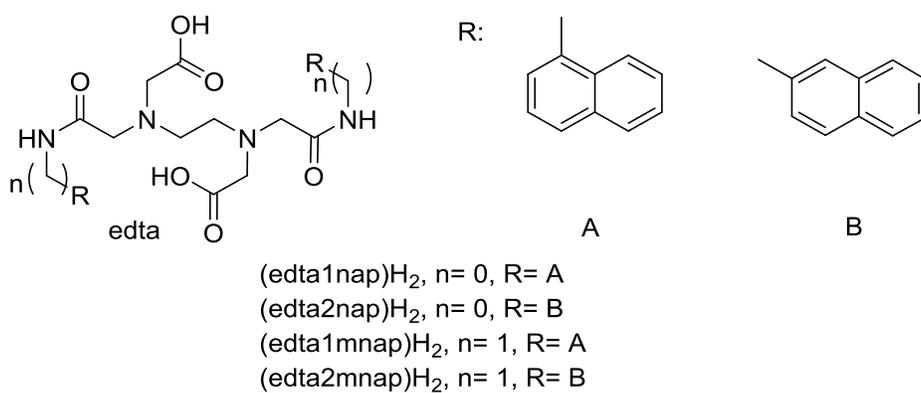
La exposición a cadmio ocurre principalmente a través de comida contaminada, agua o inhalación de humo de cigarrillos.^{19, 20} Las mayores fuentes de cadmio dietario, son el pescado, hígado, granos, papas y diversos vegetales. Una persona puede llegar a consumir 30 µg de cadmio por día, con una absorción gastrointestinal de 1-3 µg. Una de las principales fuentes de absorción de cadmio es a través de la inhalación del humo de los cigarrillos que contiene aproximadamente 1-2 µg de cadmio, con una absorción entre el 40-60% a través de los pulmones que va directamente al sistema circulatorio. La exposición crónica de cadmio puede causar efectos adversos en los riñones, hígado, pulmones, páncreas, testículos, placenta, huesos y corazón. El órgano blanco depende de la forma de exposición y la dosis.^{14, 20, 21}

Dada la importancia del zinc en la biología y en el crecimiento, no es de sorprender que la familia de sensores para zinc es la más grande de indicadores fluorescentes para metales de transición.² Muchos de los sensores de zinc reportados están basados en quinolina o di-2-picolilamina (DPA) como agentes quelantes, los cuales tienen afinidades similares por otros metales de transición y/o metales pesados, además de que no discriminan entre zinc y cadmio, ya que provocan cambios similares en la intensidad y/o en la longitud de onda máxima de emisión del sensor.²²⁻²⁴

Debido a lo anterior, existe en la actualidad un gran interés en el desarrollo de sensores con capacidad de discriminar entre zinc y cadmio mediante señales fluorescentes distintas. En años recientes se han reportado algunos receptores fluorescentes que contienen DPA unida a naftalimida,^{25, 26} así como fluoróforos a base de quinolina, los cuales muestran señales distintas al unirse a zinc o cadmio. La coordinación provoca cambios en los máximos de emisión en direcciones opuestas, así como diferentes variaciones en las intensidades.^{27, 28}

Estas respuestas están basadas en procesos de transferencia de carga o de transferencia de electrones fotoinducida (ver Sección Antecedentes), los cuales se afectan en diferentes formas debido a los distintos modos de coordinación que adoptan los metales.

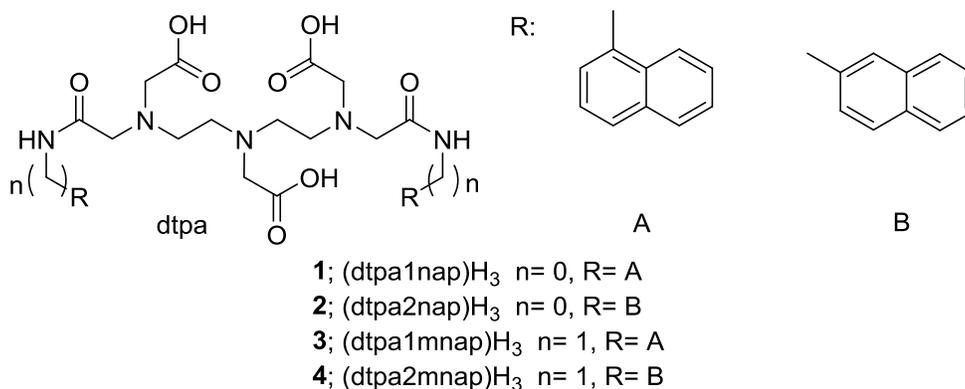
En nuestro grupo de investigación se ha utilizado una estrategia diferente para el diseño de quimiosensores fluorescentes con capacidad de discriminar entre Zn^{2+} y Cd^{2+} . Dicha estrategia consiste en preparar compuestos biscromofóricos que contienen dos grupos naftaleno unidos a través de cadenas de interconexión flexibles derivadas de edta [compuestos $(edta1nap)H_2$, $(edta2nap)H_2$, $(edta1mnap)H_2$ y $(edta2mnap)H_2$, **Esquema I**].²⁹,³⁰ Estos compuestos son solubles en agua y presentan bandas de emisión características tanto de naftaleno monomérico (M) como de excímero de naftaleno (E), cuya razón de intensidades (I_E/I_M) se modifica con la complejación. Este tipo de respuesta, denominada *respuesta radiométrica*, es de gran interés analítico ya que cancela errores provenientes de diferentes fuentes durante las determinaciones.^{31, 32} Del grupo de compuestos derivados de edta, el receptor $(edta2mnap)H_2$ se distingue por su capacidad de discriminar entre Zn^{2+} y Cd^{2+} mediante respuestas fluorescentes radiométricas opuestas. En solución acuosa a pH=8 (buffer TRIS), la coordinación a Zn^{2+} causa un incremento en la intensidad de emisión de monómero a 335 nm y disminución en la intensidad de emisión de excímero a 391 nm. Lo contrario ocurre con la coordinación a Cd^{2+} , la emisión de excímero se incrementa y la de monómero disminuye.³⁰ Los efectos opuestos observados en la razón I_E/I_M al formarse los complejos de Zn^{2+} o Cd^{2+} muestran que el ligante $(edta2mnap)H_2$ es un sensor fluorescente que puede detectar a cada uno de los cationes con señales radiométricas completamente distinguibles entre sí.



Esquema I

Otro resultado relevante de los estudios de coordinación en solución del ligante (edta2mnap) H_2 es que presenta estequiometrías de coordinación distintas con Zn^{2+} y Cd^{2+} . Con el primer metal forma un complejo 1:1 M:L, mientras que con el segundo forma un complejo 1:2 M:L. Esta propiedad no la presentan ninguno de los demás compuestos bis-naftilo derivados de edta, los cuales coordinan a Zn^{2+} o Cd^{2+} con estequiometrías 1:1 M:L.²⁹
³⁰ Estos resultados muestran que las modificaciones a la estructura molecular pueden dar origen a cambios importantes en las propiedades de los sensores.

Con base en los resultados descritos en los párrafos anteriores, en este trabajo de tesis se plantea estudiar las respuestas fluorescentes hacia Zn^{2+} y Cd^{2+} de una serie de nuevos derivados bis-naftil con cadenas de interconexión tipo dtpa (**1-4**, **Esquema II**), las cuales son de mayor longitud y contienen un mayor número de átomos donadores respecto a las de los compuestos derivados de edta. Los derivados **1-4** difieren entre sí en el sitio de unión del grupo cromóforo a la unidad dtpa (1- o 2-naftil) y/o en la presencia o ausencia de los puentes metileno entre los naftalenos y la unidad quelante. Se espera que las modificaciones estructurales generen respuestas fluorescentes novedosas y distintivas de los receptores hacia cada uno de los metales de interés.



Esquema II

Para el desarrollo de esta tesis se cuenta con los compuestos **3** y **4**, los cuales fueron sintetizados y caracterizados parcialmente por Machi *et al.*³³ Los derivados **1** y **2** serán preparados en este trabajo y se llevará a cabo una caracterización completa de los materiales previa a los estudios de coordinación. Dicha caracterización incluye estudios de protonación

mediante fluorescencia y RMN ^1H , así como la especiación y la determinación de las constantes de equilibrio.

Los estudios de coordinación se llevarán a cabo en agua bajo condiciones de pH fisiológico (pH=7.2) y se contempla incluir, además de los cationes de interés Zn^{2+} y Cd^{2+} , a un grupo amplio de iones metálicos con el propósito de conocer los modos de respuesta y la selectividad de los derivados **1-4**.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Sintetizar dos quimiosensores fluorescentes acíclicos tipo dtpa-bis-naftilo, evaluar su capacidad de discriminar entre los iones Zn^{2+} y Cd^{2+} en agua a pH fisiológico y compararla con la de dos compuestos análogos bis-metilnaftilo sintetizados previamente.

Objetivos particulares:

1. Sintetizar dos ligantes acíclicos bis-cromofóricos derivados de dtpa, funcionalizados con grupos 1- o 2-naftaleno como unidades de señalización.
2. Determinar las constantes de protonación (K_p) de los dos nuevos compuestos, así como las de dos ligantes análogos dtpa-bis-metilnaftilo previamente sintetizados, mediante titulaciones espectrométricas por fluorescencia y RMN 1H .
3. Llevar a cabo un estudio de coordinación en solución acuosa a pH=7.2, mediante espectroscopia de fluorescencia, con los cuatro ligantes derivados de dtpa, dirigidos hacia los cationes de interés Cd^{2+} y Zn^{2+} . El estudio incluirá la determinación de las constantes de formación (K_f) y la estequiometría de los complejos.
4. Evaluar el efecto de otros cationes metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} y Pb^{2+}) en la fluorescencia de las moléculas con el fin de conocer el modo de respuesta y establecer la selectividad hacia Cd^{2+} y Zn^{2+} .

1. ANTECEDENTES

1.1. Importancia biológica del Zinc

El zinc juega un papel muy importante en los sistemas biológicos dado que es un oligoelemento esencial que actúa como componente estructural y en el sitio activo de las enzimas.³⁴ Este metal actúa como cofactor y como integrante de al menos 300 enzimas (como aldolasas, deshidrogenasas, esterasas, 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 CO₂, etc. Además de lo anterior, el zinc participa en la replicación tanto de ADN como de ARN, en la apoptosis, en la transducción de señales, en la expresión génica, en la neurotransmisión, en la respiración celular, en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular y en la eliminación de radicales libres.^{1, 3, 11, 12, 35}

El zinc es capaz de adoptar tres números de coordinación: 4, 5 y 6. El costo energético del catión hidratado para cambiar entre ellos es muy bajo (está dentro de 0.4 kcal mol⁻¹ en fase gaseosa), además de que lo hace con facilidad por su configuración electrónica de capa cerrada d^{10} . Estas propiedades contribuyen a la efectividad de Zn(II) como centro catalítico.^{3, 36}

Uno de los papeles más importantes del zinc es como un cofactor estructural en metaloproteínas. Se han encontrado cientos de proteínas que poseen uno o más motivos estructurales de zinc, las cuales han sido identificadas y clasificadas en varias grandes familias. Inicialmente el zinc se encontró en el factor de transcripción IIIA (TF IIIA), el motivo estructural Cis₂His₂ interactúa con Zn²⁺ para proveer un dominio de unión a ácidos nucleicos. Dichos dominios son conocidos como "dedos de zinc".^{36, 37}

El zinc está asociado 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 Zn²⁺ 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^{2+} se presentan en la mayoría de las ADN o ARN polimerasas.³

Además de las funciones señaladas en los párrafos anteriores, el zinc actúa en las neuronas presinápticas como neurotransmisor o neuromodulador convencional y como una señal neuronal transmembranal que las atraviesa y también en los compartimentos de las 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. 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+} .³

Dada la importancia del zinc en una diversidad de procesos biológicos, la deficiencia de este metal provoca efectos negativos en la salud humana. Los estados con deficiencia de zinc pueden estar causados por diferentes factores como una ingesta insuficiente de este mineral, problemas en la absorción intestinal o pérdidas corporales excesivamente elevadas, así como el padecimiento de determinadas enfermedades por infecciones bacterianas. La deficiencia de este elemento en niños y jóvenes, puede ocasionar retraso en el crecimiento y en el desarrollo neuronal, diarrea, alteraciones inmunitarias e incluso en algunos casos la muerte.³⁸ Las principales manifestaciones 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.³⁸

Por otro lado, 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. 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.^{12, 36, 38}

Los iones de Zn^{2+} liberados durante la neurotransmisión pueden inducir la formación de placas seniles de β -amiloide ($A\beta$). Estas placas se producen en la enfermedad de Alzheimer.¹² 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.^{39, 40}

1.2. Efectos adversos del Cadmio en sistemas biológicos

Se ha reportado que el cadmio interfiere en el metabolismo energético y en el transporte a través de la membrana celular,¹⁴ además de que puede competir en la absorción de metales bioesenciales como el calcio, hierro y zinc. Esto último le permite acceder a las células de diferentes órganos y causarles efectos adversos. Algunos iones metálicos, como calcio y zinc, funcionan en la transferencia de información, aunque con características de señalización bastante diferentes.⁷ Esto sucede mediante un mecanismo iónico mimético, donde el cadmio mimetiza especies de cationes divalentes. El cadmio forma complejos metal-proteína los cuales son más estables que por ejemplo un complejo formado por iones de zinc. Un ejemplo claro sería la inhibición o la reducción de actividad de la superóxido dismutasa donde el cadmio puede reemplazar a Zn^{2+} .¹⁹ Tal como sucede con el mercurio que se conjuga a estas moléculas, el cadmio forma complejos que pueden mimetizar dentro de las células y comportarse tal y como lo hace un aminoácido endógeno, un oligopéptido, un anión orgánico, o como un catión en los sitios de transporte de membrana de estos sustratos.

El cadmio mimetiza al Ca^{2+} en los canales de calcio y pueda entrar a los hepatocitos y ser absorbido por el hígado donde forma complejos con péptidos y proteínas vía grupos sulfhídrico, incluyendo al glutatión. El cadmio es secretado ya sea por la bilis o entra a circulación como Cd-GSH (cadmio-glutatión) o Cd-MT (cadmio-metaloproteína). Estos complejos de cadmio o cadmio en su forma libre pueden causar toxicidad en tejidos, causar daño mitocondrial y finalmente muerte celular por apoptosis o necrosis.⁴¹ Durante el desarrollo embrionario estos cambios bioquímicos en el proceso de apoptosis tienen un efecto negativo debido a que la apoptosis es particularmente importante en el desarrollo del sistema nervioso central, donde las neuronas compiten por una cantidad limitada de factores de supervivencia y nueve factores neurotróficos. Se ha reportado que el tubo neural sufre apoptosis y degeneración en embriones (tanto de humanos como de ratones) tratados con cadmio. Cuando los embriones se exponen a cadmio antes de la neurulación, se observan la mayoría de las malformaciones, como es la formación de una abertura en el poro neural anterior (exencefalia). Si la exposición se produce después del cierre del tubo neural, hay un cambio hacia los defectos de las costillas y las extremidades superiores.¹⁹ Todos estos efectos tienen mucho sentido ya que es antagónico al zinc el cual es factor de crecimiento y desarrollo celular en los seres vivos.²

Las alteraciones causadas por cadmio en las respuestas inducidas por estrés y en la señalización de desarrollo, muerte y supervivencia celular están asociadas con algunos tipos de cáncer (como el de pulmón, próstata, páncreas, riñón u otros tejidos). En la mayoría de los casos el cadmio puede pasar libremente por los receptores de membrana celular e inducir cambios más o menos permanentes en los niveles de segundos mensajeros y afectar algunas funciones celulares como la transcripción de genes, que puede provocar la muerte celular, cambios en la respuesta adaptativa (PKB/Akt, factor nuclear-kappaB, (NF- κ B)), estas disfunciones en la señalización también pueden amplificar la respuesta de la célula a otros efectos tóxicos de cadmio, como daño directo de enzimas y transportadores, la tiol oxidación, es decir alteraciones de las siguientes enzimas ROS, cAMP, NO, ROS, MAP-quinasa, etc.^{14, 20, 42}

1.3. Quimiosensores fluorescentes

En los últimos años, dentro del área de la química supramolecular, muchos de los esfuerzos se han enfocado en el diseño de sensores moleculares fluorescentes (*quimiosensores fluorescentes*) que coordinen específicamente a algún analito de interés (cationes, aniones y moléculas neutras) y que lo expresen mediante algún tipo de señal fluorimétrica (apagamiento o incremento de la intensidad de emisión, o bien, desplazamiento de las bandas en el espectro).⁴³ Esto permite no solo detectar la presencia del analito sino también abre la posibilidad de llevar a cabo determinaciones cuantitativas con aplicaciones en química analítica, bioquímica clínica, medicina e investigación.⁴⁴

De acuerdo con Valeur, B,⁴⁵ los quimiosensores fluorescentes pueden ser clasificados en tres clases, en este trabajo nos centraremos en la clase tres.

Clase 1: Fluoróforos que se someten a apagamiento de la fluorescencia por colisión con el analito (ejemplos de analitos: O₂, Cl⁻).⁴⁵

Clase 2: Fluoróforos que pueden unirse reversiblemente al analito. Si el analito es un protón, el término a veces usado es indicador fluorescente de pH. Si el analito es un ion metálico el término apropiado es agente quelante fluorescente. La fluorescencia puede ser disminuida o totalmente extinguida por el enlace (sensor tipo CEQ, del inglés Chelation Enhancement of Quenching) o aumentada (sensor tipo CEF, del inglés Chelation Enhancement of Fluorescence). En el último caso el compuesto es llamado *fluorogénico* (ejemplo: 8-hidroxiquinolina (oxina)).⁴⁵

Clase 3: Fluoróforos ligados a un receptor de manera directa o a través de un espaciador. El diseño de estos sensores está basado en el reconocimiento molecular de iones por un receptor y requiere de criterios especiales en cuanto a afinidad y selectividad. Estos aspectos son muy relevantes en el terreno de la química supramolecular. El cambio en las propiedades fotofísicas de un fluoróforo por la interacción con el analito son perturbaciones producidas por procesos fotoinducidos, dentro de los cuales se encuentran la transferencia de

electrón, transferencia de carga, transferencia de energía y formación o desaparición de *excímero*, etc.⁴⁵ Con base en el mecanismo de respuesta, los quimiosensores se clasifican en los siguientes tipos: a) PET (del inglés Photoinduced Electron Transfer); b) PCT (Photoinduced Charge Transfer); c) FRET (Förster Resonance Energy Transfer) y d) Formación de Excímeros. A continuación, se abordan con más detalle las características de los quimiosensores tipo PET, PCT y los basados en formación de excímeros.

1.3.1. Quimiosensores fluorescentes tipo PET

La detección de un analito por un quimiosensor fluorescente generalmente se logra a través de uno o más mecanismos fotofísicos, siendo los más comunes el PET (Transferencia Electrónica Fotoinducida) y la PCT (Transferencia de Carga fotoinducida).² La mayoría de los quimiosensores fluorescentes son de tipo PET, el cual es un proceso de desactivación que involucra una reacción interna de tipo redox entre el estado excitado del fluoróforo y otra especie capaz de donar o aceptar un electrón. Este tipo de quimiosensores generalmente consisten en un fluoróforo aromático ligado a una amina por medio de un espaciador metileno. La transferencia de electrón fotoinducida toma lugar de los grupos aminos al hidrocarburo aromático, causando apagamiento de fluorescencia de este último. Cuando el grupo amino es protonado (o cuando interacciona con un catión metálico), la transferencia del electrón es inhibida y se observa un incremento de la fluorescencia. La **Figura 1** ilustra el mecanismo en términos de orbitales moleculares. Durante la excitación del fluoróforo, un electrón del orbital molecular de más alta energía ocupado (HOMO) es promovido al orbital molecular de más baja energía desocupado (LUMO). Esto habilita el PET desde el HOMO del donador (amina desprotonada o receptor libre de cationes) hacia el fluoróforo, causando apagamiento o disminución en la intensidad de la fluorescencia de este último. Al ocurrir la protonación (enlace catiónico), el potencial redox del donador aumenta debido a que el HOMO relevante queda en un nivel de más baja energía que el del fluoróforo; consecuentemente, el PET ya no es posible y el apagamiento de la fluorescencia se suprime. Este proceso depende en gran medida de la polaridad del solvente, el cual afecta el potencial de oxidación de electrones libres de los átomos coordinantes. Una mayor polaridad del solvente facilita la transferencia de electrones; Como consecuencia, el efecto de apagamiento

de la fluorescencia mediado por PET ocurre más rápidamente en ambientes de alta polaridad. La respuesta fluorescente de tipo PET no causa desplazamientos en la banda de emisión al formar complejos de iones metálicos.^{2, 32, 36, 45}

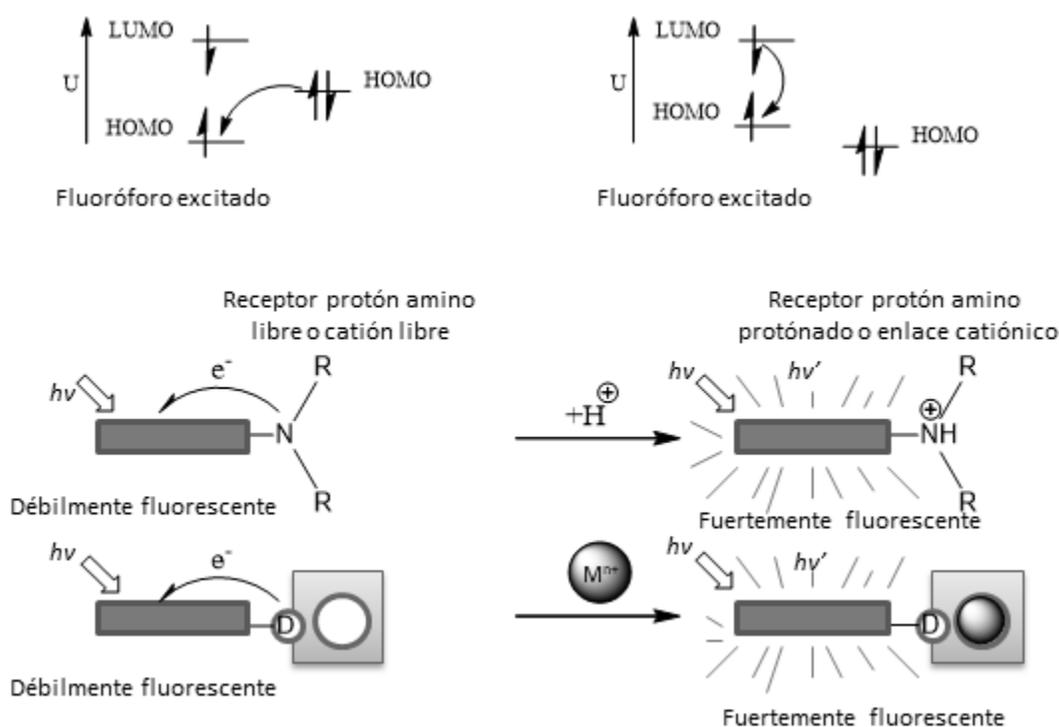


Figura 1. Principios de detección de H⁺ o cationes metálicos (Mⁿ⁺) por sensores fluorescentes de tipo PET.⁴⁵

1.3.2. Quimiosensores fluorescentes tipo PCT

La transferencia de carga fotoinducida (PCT) implica la transferencia de un electrón entre un donador y un aceptor de electrones inducida por irradiación con luz de determinada longitud de onda (proceso de excitación). El estado excitado que alcanza la molécula es de baja energía y puede dar origen a emisión de fluorescencia. Los sensores con respuesta de tipo PCT presentan un grupo donador de electrones (Grupo-D, generalmente un grupo amina) y un grupo aceptor (Grupo-A, generalmente un fluoróforo aromático) integrados directamente y conjugados. Cuando el Grupo-D interactúa con un catión se reduce su carácter donador debido a la reducción en la conjugación. Como consecuencia de lo anterior, la eficiencia de la PCT disminuye, la energía del estado excitado incrementa y se presenta un desplazamiento

hacia el azul tanto del espectro de absorción como del de emisión, junto con una disminución en el coeficiente de absorción molar. Por el contrario, cuando un catión interactúa con el Grupo-A se hace más eficiente el proceso PCT, la energía del estado excitado disminuye, los espectros de absorción y emisión se desplazan hacia el rojo y se incrementa el coeficiente de absorción molar.⁴⁵ Los cambios en los niveles de energía durante los dos procesos anteriores se ilustran de manera esquemática en la **Figura 2**. Estas respuestas dependen tanto del tipo de fluoróforo, del ion metálico y del modo de complejación.³² Además de estos cambios, a menudo se observan cambios en los rendimientos cuánticos y tiempos de vida. Estos efectos fotofísicos dependerán de la carga y el tamaño del catión, lo que hace que esta respuesta pueda ser selectiva.⁴⁵

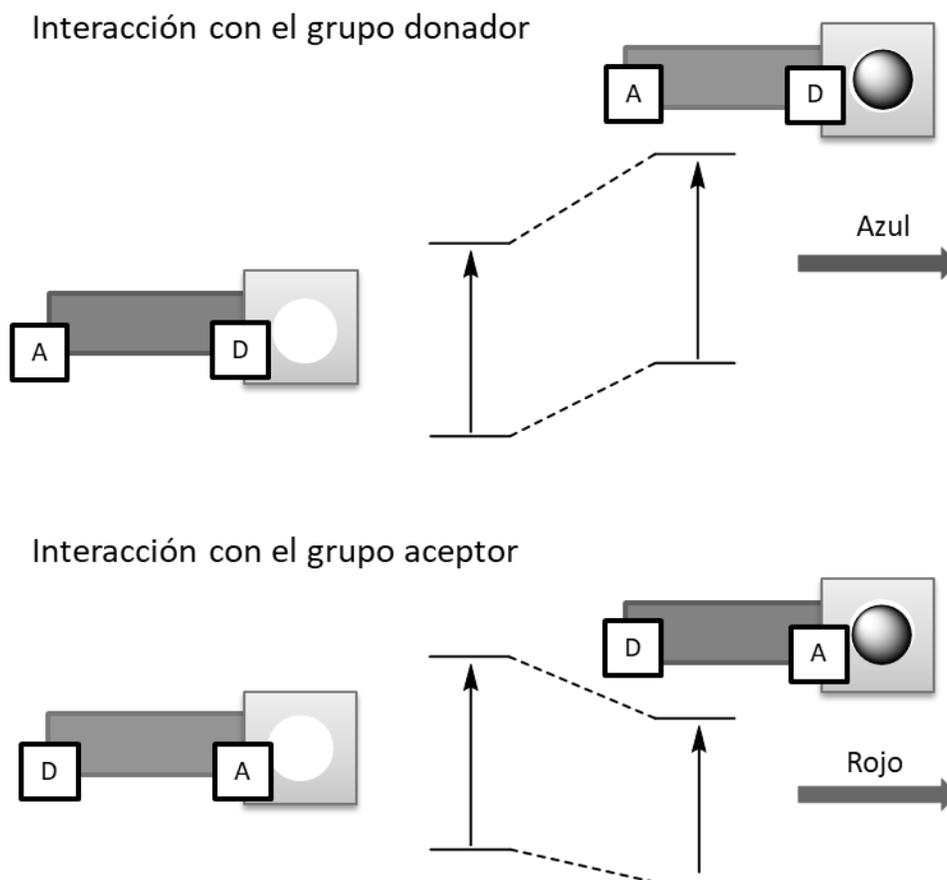


Figura 2. Cambios en las energías de los estados basal y excitado de los sensores PCT como resultado de la interacción de un catión con un grupo donador (D) o aceptor (A) de electrones.⁴⁵

1.3.3. Quimiosensores fluorescentes basados en formación de excímeros

Una estrategia diferente en el diseño de quimiosensores fluorescentes es la unión de dos fluoróforos idénticos a través de una cadena de interconexión con propiedades quelantes (quimiosensores *bis*-cromofóricos, **Figura 3**). En este tipo de compuestos la interacción con el analito puede inducir cambios conformacionales que favorezcan el acercamiento de las unidades fluoróforas y la consecuente formación de excímeros, que son dímeros en estado excitado. 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. Esta propiedad amplía la posibilidad de aplicación de estos compuestos ya que 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, esto resulta en una ventaja sobre los sensores fluorescentes clásicos.^{46, 47}

Los fluoróforos más utilizados en el diseño de quimiosensores *bis*-cromofóricos son los policíclicos aromáticos como el naftaleno, antraceno y pireno. 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.⁴⁸

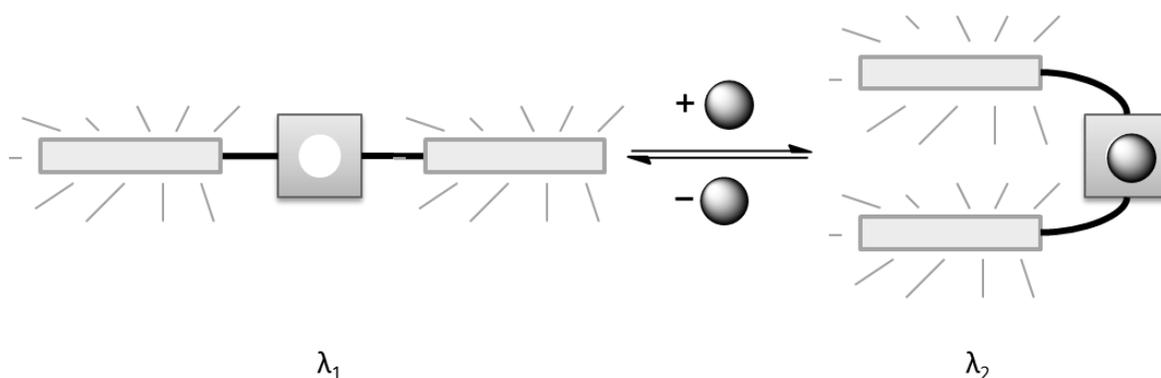


Figura 3. Diseño de quimiosensores fluorescentes de tipo *bis*-cromofóricos con respuesta monómero (λ_1) y excímero (λ_2).

1.4. Quimiosensores fluorescentes capaces de discriminar entre los iones de cadmio y zinc

La detección de iones metálicos, tanto en el medio ambiente como en los organismos biológicos, sigue siendo un área de investigación importante. Las moléculas que poseen propiedades versátiles y que se pueden usar para detectar más de un solo ion metálico reducen la necesidad de sintetizar múltiples compuestos y facilitan la detección una amplia variedad de iones con un solo dispositivo, debido a que pueden ser capaces de producir diferentes respuestas de fluorescencia o color a diferentes iones.⁴⁹ El mayor desafío para detectar cadmio proviene de la interferencia de metales de transición, en particular con el zinc, ya que ambos tienen propiedades similares, comparten el mismo grupo de la tabla periódica y generalmente causan cambios espectrales similares después de las interacciones con sensores fluorescentes (los mismos cambios en los desplazamientos de longitud de onda y o de intensidad fluorescencia). En otras palabras, la presencia de uno de estos dos cationes (cadmio o zinc) proporcionará señales falsas positivas que imitan la presencia del otro catión. Esta es una de las principales razones por las que existe una gran necesidad de desarrollar sensores selectivos que puedan distinguir entre iones cadmio y zinc con alta sensibilidad y selectividad.^{25, 28}

En años recientes se han reportado algunos receptores fluorescentes que contienen DPA unida a naftalimida,^{25, 26} así como fluoróforos a base de quinolina, los cuales muestran señales distintas al unirse a zinc o cadmio. La coordinación provoca cambios en los máximos de emisión en direcciones opuestas, así como diferentes variaciones en las intensidades de emisión.^{27, 28} A continuación se describe de manera breve los resultados de algunos de estos trabajos.

En 2007 C. Lu *et al.*²⁵ reportaron una serie de derivados de la 4,5-diamino-1,8-naftalimida como unidad fluorescente, que contienen un grupo quelante DPA y una unidad 1- o 2-picolilo (L_{1a-1c} , **Figura 4**). Los autores encontraron que el sensor L_{1a} en un medio acuoso neutro (etanol-agua 1:9, v/v, buffer HEPES 50 mM, pH=7.2) funciona como un sensor fluorescente radiométrico tanto para Cd^{2+} como para Zn^{2+} , que es capaz de discriminar

con éxito a dichos metales mediante diferentes tipos de respuestas. El ligante L_{1a} en su forma libre presenta una banda de emisión a 531 nm ($\lambda_{exc} = 420$ nm). La coordinación con Cd^{2+} provoca un desplazamiento de 44 nm hacia el azul de la banda de emisión, así como un incremento de intensidad ($\Phi_L = 0.27$, $\Phi_{L-Cd} = 0.6$). Lo contrario ocurre por coordinación a Zn^{2+} , el máximo de emisión se desplaza 27 nm hacia el rojo y la intensidad de fluorescencia disminuye ($\Phi_L = 0.27$, $\Phi_{L-Zn} = 0.23$). Los autores demostraron que las respuestas opuestas se deben a los diferentes modos de coordinación de los metales a las aminas secundarias de la naftalimida, lo que provoca efectos distintos en los procesos de PCT. El ligante L_{1a} también mostró una buena selectividad a Cd^{2+} sobre muchos otros cationes, incluyendo Zn^{2+} . Esto se atribuyó a que el grupo 2-picolilo, junto con la unidad DPA, forma una cavidad con el tamaño y la conformación adecuadas para captar al Cd^{2+} . Los autores confirmaron que cualquier cambio en este grupo, incluido el giro (sensor 1b), el incremento de la flexibilidad (sensor 1c), o la ausencia del mismo (sensor L_0)⁵⁰ conduce a interacciones ineficaces del sensor con los analitos en el estado excitado y la pérdida de su capacidad para discriminar entre ellos.²⁵

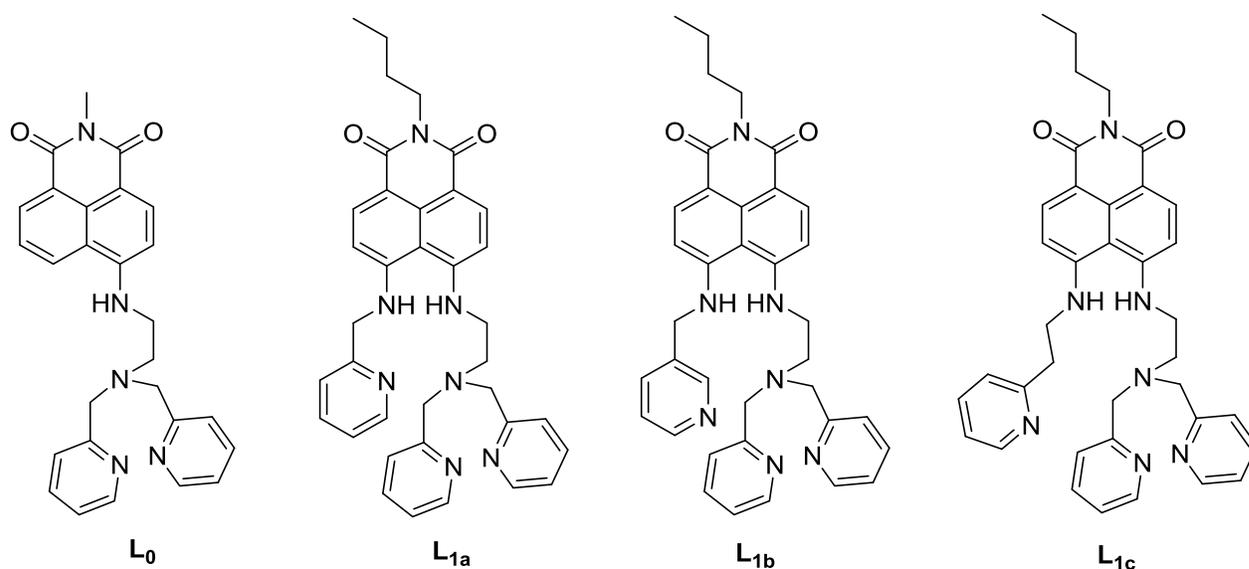


Figura 4. Estructura de los derivados L_0 y L_{1a-1c} reportados por J. Fan *et al.*⁵⁰ y C. Lu *et al.*²⁵, respectivamente.

En 2010 Z. Xu *et al.*²⁶ presentaron un sensor ZTRS (**Figura 5**) basado en un derivado de 4-amino-1,8-naftalimida como unidad fluorescente, que contienen un grupo quelante DPA, una estructura muy similar al anterior ejemplo pero con un grupo amida uniendo el

resto DPA y el grupo cromóforo. Los autores hacen alusión al carácter del grupo amida en los enlaces peptídicos de las proteínas, ya que la rotación impedida del enlace C-N proporciona a dichas macromoléculas la capacidad de formar estructuras secundarias y terciarias fundamentales para la actividad biológica, además de que los átomos de oxígeno y nitrógeno de la amida son sitios quelantes bien conocidos. El espectro de fluorescencia de ZTRS en soluciones acuosas ($\text{CH}_3\text{CN}/0.5 \text{ M HEPES}$, pH 7.4, 50:50) mostró una banda de emisión de baja intensidad con un máximo a $\lambda = 483 \text{ nm}$, $\epsilon = 83300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\Phi = 0.016$. Tras la adición de Cd^{2+} o Zn^{2+} a la solución acuosa de ZTRS se observaron aumentos similares en la intensidad de fluorescencia (alrededor de 20 veces), así como incrementos en el rendimiento cuántico y desplazamientos de la banda de emisión. La coordinación a Cd^{2+} provocó desplazamiento de la emisión de ZTRS hacia el azul ($\lambda_{\text{máx}} = 446 \text{ nm}$, $\epsilon = 84700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\Phi = 0.34$), mientras que el Zn^{2+} causó un desplazamiento al rojo ($\lambda_{\text{máx}} = 514 \text{ nm}$, $\epsilon = 87,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\Phi = 0,36$). Ambos iones forman complejos M:L con estequiometría de coordinación 1:1 y con constantes de disociación (K_d) de ZTRS con Zn^{2+} y Cd^{2+} de 5.7 nM y 48.5 nM, respectivamente. Con base en estudios de coordinación adicionales en diferentes disolventes, así como en mediciones en IR y RMN ^1H , los autores demuestran que ZTRS se une a Zn^{2+} y Cd^{2+} en diferentes formas tautoméricas del grupo amida. En el complejo ZTRS- Cd^{2+} , la unión al metal es con el oxígeno carbonílico de la amida (tautómero amida), mientras que en el complejo ZTRS- Zn^{2+} la unión se lleva a cabo con el nitrógeno en forma imida (tautómero ácido imídico). Este último tipo de enlace extiende la conjugación del sistema y provoca el desplazamiento hacia al rojo en la emisión de ZTRS.

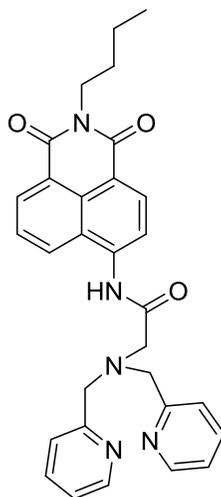


Figura 5. Estructura de los derivados ZTRS reportados por Z. Xu *et al.*²⁶

En el 2009 L. Xue *et al.*⁵¹ reportaron el derivado QB (**Figura 6**), el cual exhibe una respuesta radiométrica al coordinarse con Zn^{2+} , mientras que la coordinación a Cd^{2+} solo causa un incremento en la intensidad de emisión y un ligero desplazamiento al rojo. Bajo condiciones de solución acuosa (Tris-HCl 10 mM, KNO_3 0.1 M, CH_3CN al 50%, pH = 7.4), el sensor QB mostró una débil emisión de fluorescencia debido a la eficiente desactivación de PET desde el resto DPA al fluoróforo de quinolina ($\lambda_{em} = 405$ nm, $\lambda_{exc} = 295$ nm $\epsilon = 8,700$ $M^{-1} cm^{-1}$, $\Phi = 0.057$). Tras la unión de QB a Zn^{2+} , el espectro de emisión mostró un significativo incremento de intensidad y un desplazamiento hacia el rojo de 53 nm (de 405 a 458 nm), con un punto isoemisivo a 400 nm. En cambio, al formarse el complejo QB- Cd^{2+} , la banda de emisión se desplazó al rojo solo 20 nm, sin la aparición de un punto isoemisivo.

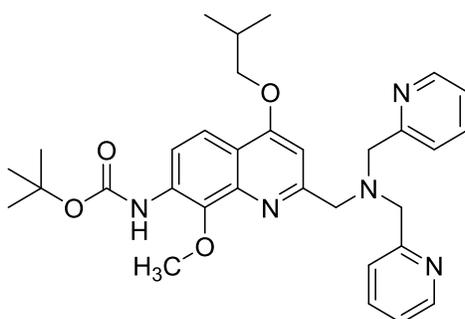


Figura 6. Estructura de los derivados QB reportados por L. Xue *et al.*⁵¹

En 2012 X. Zhou *et al.*²⁸ presentaron un sensor (**Figura 7**), basado en 8-aminoquinolina (8-AQ) que lleva el resto 8-hidroxiquinolina (8-HQ), capaz de distinguir entre iones de cadmio y de zinc en etanol mediante distintas respuestas fluorescentes. El sensor en su forma libre (HL) presenta una banda de emisión de baja intensidad a 410 nm ($\lambda_{exc} = 329$ nm). La coordinación de HL a Cd^{2+} provoca un significativo incremento de la intensidad de fluorescencia ($\Phi_L = 0.008$, $\Phi_{L-Cd} = 0.16$), sin cambio en la longitud de onda máxima de emisión. En contraste, la formación del complejo HL- Zn^{2+} provoca disminución de la intensidad y desplazamiento del máximo de emisión hacia el rojo, así como la aparición de una nueva banda a 486 nm ($\Phi_{L-Zn} = 0.019$). Con base en estudios de UV-Vis y difracción de rayos-X de cristal, los autores atribuyen las respuestas opuestas a cadmio y zinc a los diferentes modos de coordinación de los metales al grupo amida del ligante. La unión al cadmio involucra al oxígeno del carbonilo de amida, lo cual cancela el proceso PET y

enciende la fluorescencia. En cambio, la coordinación a zinc involucra al nitrógeno amida desprotonado, lo cual favorece el proceso de PTC hacia el fluoróforo en estado excitado, con el consecuente corrimiento de la banda de emisión hacia el rojo. Los autores reportan que la afinidad del ligante por cadmio es un orden de magnitud superior a la que presenta por zinc, además de ser selectivo a cadmio frente a un grupo amplio de iones metálicos.²⁸

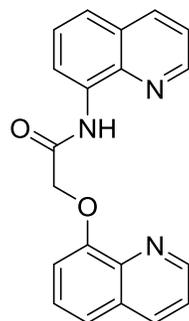


Figura 7. Sensor basado en 8-aminoquinolina unida a 8-hidroxiquinolina.²⁸

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados en las síntesis y en los estudios espectroscópicos y de coordinación se enlistan a continuación:

2.1. Materiales

Síntesis de (dtpa1nap) H_3 (**1**) y (dtpa2nap) H_3 (**2**):

- Dianhídrido dietilentriaminopentaacético 98 % (Aldrich) grado reactivo
- 2-aminonaftaleno 95 % (Aldrich)
- 1-aminonaftaleno 98 % (Fluka)
- *N,N*-Dimetilformamida anhídrido (DMF) 99.8 % (Sigma-Aldrich)
- Malla molecular 4 Å (Sigma Aldrich)
- Etanol grado reactivo ACS (Faga Lab)
- Metanol grado reactivo ACS (Faga Lab)
- Acetona grado reactivo ACS (Faga Lab)
- Oxido de deuterio (D_2O) 99.9 % (Sigma-Aldrich)
- Trimetilsililpropanosulfonato de sodio (DSS 1 % en D_2O)
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) 99.8 % (Aldrich)
- Bromuro de potasio (Sigma-Aldrich grado espectroscopia)
- Deuteróxido de potasio (KOD), 40%, en solución de óxido de deuterio al 99 % (Aldrich)
- Cloruro de deuterio 35%, en solución de óxido de deuterio al 99 % (Aldrich)

Estudios de coordinación:

- Cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 99.99% (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de cobalto ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) 99.99% (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de cobre ($CuCl_2$) 99.99% (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de cadmio ($CdCl_2 \cdot 2H_2O$) 99.99% (Aldrich)
- Cloruro férrico ($FeCl_3 \cdot 2H_2O$) 99.99% (Sigma-Aldrich)

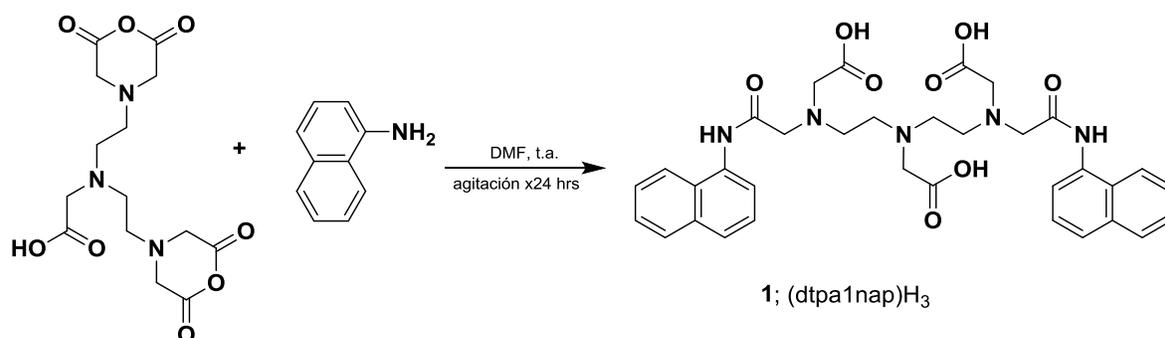
- Cloruro de magnesio (MgCl_2) 98% (Sigma)
- Cloruro de mercurio (HgCl_2) 99.99% (Aldrich)
- Cloruro de níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 99.99% (Fermont)
- Cloruro de plomo (PbCl_2) 99.99% (Aldrich)
- Cloruro de zinc (ZnCl_2) 99% (Aldrich)
- MOPS (ácido 3-(*N*-morfolino)-propanosulfónico) 99.53% (Sigma)
- Hidróxido de sodio (NaOH) 99% (Merk)
- Ácido clorhídrico (HCl) 37% (Fermont)
- Murexida (Aldrich)
- Negro de ericromo T (Sigma)
- Violeta de pirocatecol (Sigma)
- Fosfato de sodio monobásico 99% (Sigma-Aldrich)
- Fosfato de sodio dibásico 99% (Sigma-Aldrich)
- Acetato de sodio 99 % (Sigma-Aldrich)
- Ácido acético glacial 99.85 % (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de sodio 99.9 % (Fermont)
- MES ácido 2- (*N*- morfolino) etanosulfónico (Sigma)

2.2. Síntesis de los ligantes

2.2.1. Síntesis de $(\text{dtpa1nap})\text{H}_3$ (1)

La síntesis de $(\text{dtpa1nap})\text{H}_3$ (1) se llevó a cabo utilizando la metodología reportada por L. Machi *et al.*²⁹ 2006 donde se hizo reaccionar el dianhídrido del dtpa (250 mg, 0.70 mmol) y un exceso de la amina aromática 1-aminonaftaleno (250 mg, 1.75 mmol) en una proporción molar 1:2.5, en 15 mL de DMF como medio de reacción, ver **Esquema III**. El DMF, la amina y el dtpa dianhídrido fueron añadidos a un matraz bola de 50 mL y puestos en agitación durante 24 h. Trascurrido este tiempo, la solución de reacción se filtró para separar cualquier sólido presente. El filtrado obtenido se concentró con temperatura y presión reducida, al concentrado se le añadieron 50 mL de acetona fría (4 °C) y se dejó reposar por 24 h a esta

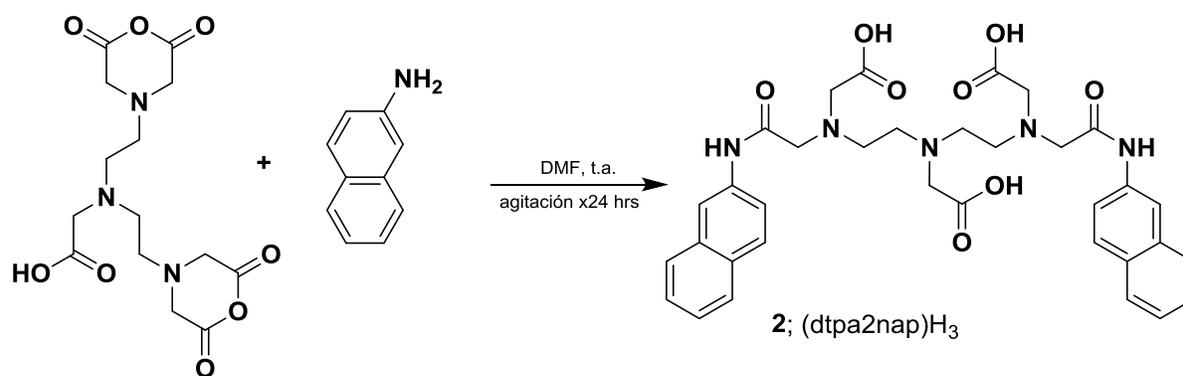
temperatura. El sólido obtenido se lavó primero con acetona, enseguida con metanol y se secó a vacío. Se obtuvieron 348 mg de un sólido rosa cuyo espectro de RMN ^1H reveló la presencia del compuesto esperado y de impurezas. Para la purificación del compuesto **1** se implementó la metodología de precipitación fraccionada por cambio de pH. El sólido rosa se disolvió en 100 mL de agua (se añadieron 44 mg de NaCO_3 para mejorar la solubilidad) y se dejó en agitación por 48 h. La solución obtenida se filtró (filtro #1 Whatman) para eliminar las impurezas no disueltas y se inició la adición gota a gota de HCl 0.1 M para bajar lentamente el pH (pH inicial=9.94). El filtrado se acidificó hasta un pH de 2.6. En este punto se obtuvo un nuevo precipitado el cual se separó, lavó y secó. Para asegurar que el compuesto estuviera totalmente protonado antes de ser enviado a análisis elemental y de masas, se precipitó en ácido nuevamente. El sólido se disolvió en 25 mL de agua y se adicionaron 15 mg de Na_2CO_3 , se filtró nuevamente con un filtro de papel fino #1 W y se acidificó con HCl 0.2 M hasta pH 1.8. El precipitado se dejó reposar y se filtró con un filtro fino de vidrio, se lavó exhaustivamente con agua y se secó a vacío por 5 h. Se obtuvieron 86 mg de un sólido café marrón oscuro con un rendimiento del 19 %. Punto de fusión: 145–147 °C. RMN ^1H (400 MHz, D_2O – Na_2CO_3 , pD = 9.0, DSS): δ 3.23 (br, 4H, H_a), 3.44 (s, 4H, H_b), 3.53 (br, 4H, H_c), 3.66 (s, 4H, H_c), 3.92 (s, 2H, H_d), 7.30–7.40 (dt, $J_{5-6,6-7} = 7.46$ Hz, 4H, $\text{H}_{6,7}$), 7.46–7.54 (m, 4H, $\text{H}_{8,5}$), 7.69–7.74 (m, 2H, H_3), 7.74–7.79 (d $J_{4-3} = 8.21$ Hz, 2H, H_4), 7.84–7.91 (dd, $J_{2-3,2-4} = 7.9, 4.79$ Hz, 2H, H_2) (ver **Figura Anexo 1**). MS (ESI): m/z (%): 644.2 (100) [$(M + \text{H})^+$]. Análisis Elemental, Calculado (%): $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_8 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$: C, 60.89; H, 6.01; N, 10.44; Análisis Elemental, Observado: C, 60.96; H, 5.81; N, 10.41.



Esquema III

2.2.2. Síntesis de (dtpa2nap)H₃ (2)

Para la síntesis de (dtpa2nap)H₃ (2) se hizo reaccionar el dianhídrido del dtpa (250 mg, 0.70 mmol) y un exceso de la amina aromática 2-aminonaftaleno (250 mg, 1.75 mmol) en una proporción molar 1:2.5, en 15 mL de DMF como medio de reacción, ver **Esquema IV**. El DMF, la amina 2-aminonaftaleno y el dtpa dianhídrido fueron añadidos a un matraz bola de 50 mL y puestos en agitación durante 24 h. Trascurrido el tiempo de reacción, se filtró la solución de reacción para separar cualquier sólido presente. El filtrado obtenido se concentró en un evaporador rotatorio y después se añadieron 50 mL de acetona fría (4 °C) y se dejó reposar por 24 h a esta temperatura. El sólido formado se filtró y lavó con acetona fría para eliminar el exceso de amina y se obtuvo un sólido rosa blanquecino el cual se lavó nuevamente con metanol en un filtro de vidrio fino. Se obtuvieron 218 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 49 %. Punto de fusión: 190–192 °C. RMN ¹H (400 MHz, D₂O–Na₂CO₃, pD = 10.2, DSS): δ 2.97 (br, 4H, H_a), 3.11 (br, 4H, H_e), 3.29 (s, 4H, H_b), 3.40 (s, 4H, H_c), 3.53 (s, 2H, H_d), 7.38 (dt, $J_{5-7,6-8} = 16.5, 7.8$ Hz, 6H, H_{5,6,7}), 7.67 (dd, $J_{3-4,3-8} = 16.8, 8.5$ Hz, 6H, H_{8,3,4}), 7.83 (s, 2H, H₁) (ver **Figura Anexo 2**). MS (ESI): m/z (%): 644.1 (100) [(M + H)⁺]. Análisis Elemental, Calculado (%): C₃₄H₃₇N₅O₈·0.5H₂O: C, 62.57; H, 5.87; N, 10.73; Análisis Elemental, Observado: C, 62.81; H, 5.88; N, 10.87.



Esquema IV

2.2.3. Caracterización de los ligantes (dtpa1nap)H₃ (1) y (dtpa2nap)H₃ (2)

RMN ¹H: Los espectros se obtuvieron en nuestro departamento en un espectrómetro marca Bruker Avance 400 que opera a 400 MHz. Este mismo equipo se utilizó en los estudios de protonación que se describen en la siguiente sección.

Análisis Elemental: La determinación de porcentajes de carbono, hidrógeno y nitrógeno se realizó en el laboratorio ALS Environmental, en Tucson Az.

Análisis de Masas: Los espectros se obtuvieron a partir de soluciones de los ligantes en una mezcla NH₃-metanol en el laboratorio de espectrometría de masas de la Universidad de Arizona, en Tucson, Az.

2.3. Mediciones espectroscópicas

2.3.1. RMN vs pD

Este estudio se realizó para conocer la dependencia del desplazamiento químico de protón respecto al pD (δ vs pD), determinar las constantes de formación y establecer los sitios de protonación de los compuestos **1** y **2**. Los ligantes **3** y **4** ya habían sido caracterizados mediante esta técnica por L. Machi *et al.*³³ y los resultados se incluyen en este trabajo con fines de comparación. La metodología consiste en preparar cinco soluciones de ligante, directamente en tubos de RMN, con una concentración de 5×10^{-3} en H₂O-d₂, a los cuales se les varió el pD utilizando KOD y DCl preparados al 0.01%. Se utilizó DSS como referencia interna.

2.3.2. Fluorescencia vs pH

Este estudio se le realizó a los cuatro ligantes **1-4**. Se preparó una solución stock de cada ligante en NaCl 0.01M (para disolver se agregó una cantidad equimolar de Na₂CO₃), a partir de la cual se prepararon soluciones ácida y alcalina (con HCl y NaOH 0.01M respectivamente) con una concentración de 5×10^{-5} M para **1** y **2** y 1×10^{-6} M para **3** y **4**. A partir de estas soluciones se realizaron mezclas directamente en la celda del

espectrofotómetro. Los espectros se adquirieron a temperatura controlada de 25 °C en un espectrómetro de luminiscencia marca Perkin-Elmer Modelo LS50B. Todas las mediciones se hicieron al menos por duplicado para garantizar reproducibilidad.

2.3.3. Estudios de coordinación metálica en solución

Con el propósito de determinar las constantes de formación y las estequiometrias de los complejos de Zn^{2+} y Cd^{2+} de los ligantes **1-4**, se llevaron a cabo titulaciones espectrométricas a pH y temperatura constantes (pH= 7.2, solución reguladora MOPS 0.01 M, 25 °C). Para las mediciones se utilizó un espectrómetro de luminiscencia marca Perkin-Elmer Modelo LS50B.

En cada titulación se colocaron directamente en la celda de cuarzo del espectrómetro 3 mL de solución del ligante a la concentración apropiada (ver **Tabla 1**) y se agregaron alícuotas de 15 μ L de solución del cloruro metálico correspondiente para variar la relación molar metal/ligando (M/L) en un intervalo deseado, en incrementos de 0.1 o 0.2 eq. M/L (las concentraciones de las soluciones metálicas en cada caso se muestran en la **Tabla 1**). Después de cada adición, la solución se agitó durante 3 min antes de adquirir el espectro de emisión.

Para realizar los estudios comparativos del efecto de la coordinación metálica en la fluorescencia de los ligantes, se utilizó una metodología similar a la descrita en el párrafo anterior, con la diferencia de que en estos experimentos la relación molar M/L se varió de 0-5, en incrementos de 0.5 eq. M/L (las concentraciones de las soluciones metálicas se muestran en la **Tabla 1**).

Todas las titulaciones se realizaron al menos por duplicado para garantizar la reproducibilidad. Las soluciones de los cloruros metálicos se estandarizaron con edta disódico según las metodologías reportadas.⁵²⁻⁵³

Tabla 1. Concentraciones de las soluciones de los ligantes [L] y de los iones metálicos [M] utilizadas en las titulaciones espectrométricas.^a

	[L]	[M ⁺] 0.1 eq	[M ⁺] 0.2 eq	[M ⁺] 0.5 eq
1, (dtpa1nap)H ₃	5×10 ⁻⁵ M	1×10 ⁻³ M	2×10 ⁻³ M	5×10 ⁻³ M
2, (dtpa2nap)H ₃	5×10 ⁻⁵ M	1×10 ⁻³ M	2×10 ⁻⁵ M	5×10 ⁻³ M
3, (dtpa1mnap)H ₃	1×10 ⁻⁶ M	2×10 ⁻⁵ M	4×10 ⁻⁵ M	1×10 ⁻⁴ M
4, (dtpa2mnap)H ₃	1×10 ⁻⁶ M	2×10 ⁻⁵ M	4×10 ⁻⁵ M	1×10 ⁻⁴ M

^a Los equivalentes indicados en las columnas 3-5 se refieren a los incrementos de la relación molar M/L durante las titulaciones.

2.3.4. Determinación de los rendimientos cuánticos de los compuestos (dtpa1nap)H₃ (1), (dtpa2nap)H₃ (2), (dtpa1mnap)H₃ (3) y (dtpa2mnap)H₃ (4)

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia para los ligantes **1-4** se obtuvieron comparando las áreas integradas debajo de los espectros de emisión de los ligantes corregidos con respecto a la de un estándar (triptófano).^{54,55} Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro de UV-Vis Perkin-Elmer lambda 45 y un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS50-B. A partir de soluciones madre de los ligantes (0.001 M en NaCl 0.01 M) se prepararon soluciones (en buffer MOPS pH 7.2 0.01 M) con la concentración apropiada para obtener una absorbancia de 0.5 o menor. En el caso del triptófano, se preparó una solución madre 0.009 M en agua deionizada y a partir de ella una solución 8.9×10⁻⁵ M con absorbancia menor a 0.5. A partir de estas soluciones con A<0.5 se prepararon diluciones uno a diez para realizar las mediciones de fluorescencia. Los espectros de emisión se obtuvieron con λ_{exc} = 280 nm.

El rendimiento cuántico se calculó de la relación dada por:

$$Q_x = Q_{st} \cdot \frac{A_x}{A_{st}} \cdot \frac{OD_{st}}{OD_x} \cdot \frac{\phi_{st}}{\phi_x} \quad Ec. 1$$

Donde A es el área bajo la curva del espectro de emisión corregido, OD es la densidad óptica en la longitud de onda a la cual se excitó y φ es la salida relativa de fotones de la fuente

de luz en esa longitud de onda; los subíndices se refieren a estándar (st) y desconocido (x). El cálculo del área bajo la curva de los espectros de fluorescencia se realizó con ayuda del software *Origin PRO*.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Estudios de protonación por RMN ^1H de los compuestos $(\text{dtpa1nap})\text{H}_3$ (1), $(\text{dtpa2nap})\text{H}_3$ (2), $(\text{dtpa1mnap})\text{H}_3$ (3) y $(\text{dtpa2mnap})\text{H}_3$ (4)

Para identificar a las especies formadas en solución y determinar las constantes y sitios de protonación de los ligantes **1-4**, se realizaron estudios de RMN ^1H a diferente pD de acuerdo con la metodología descrita en la Sección Experimental. La obtención de los esquemas de protonación por esta técnica se basa en los cambios en los desplazamientos químicos (δ) de los protones de la molécula por efecto del pD. Los protones vecinos a grupos funcionales susceptibles a la protonación (aminas, ácidos carboxílicos, etc.) son sensibles al cambio en el ambiente electrónico originado por dicho proceso. En las **Figura 8** y **Figura 9** (parte inferior) se muestran los δ de los protones en función del pD de los ligantes $(\text{dtpa1nap})\text{H}_3$ (**1**) y $(\text{dtpa2nap})\text{H}_3$ (**2**), respectivamente (ver asignación de etiquetas en cada figura). En ambos casos, la disminución del pD en el intervalo de 8-13 provoca el desplazamiento simultáneo a campo bajo de todos los protones alifáticos. Sin embargo, como puede notarse, los protones e y d vecinos a los átomos de nitrógeno de la amina central de la unidad dtpa experimentan el mayor cambio en δ . Esto indica que la primera protonación ocurre predominantemente en dicho sitio para formar la especie monoprotonada LH^{2-} (donde L representa al ligante en su forma totalmente desprotonada con tres cargas negativas L^{3-}). La disminución del pD por debajo de 8 provoca que los protones a, b y c experimenten un nuevo desplazamiento de δ hacia campo bajo. Estas tendencias indican que la segunda protonación ocurre predominantemente en los átomos de nitrógeno de los grupos amino laterales para formar la especie diprotonada LH_2^- . Los datos de δ vs pD se ajustaron a la **Ecuación 3** (ver Anexo 1) por el método de mínimos cuadrados no-lineales mediante el uso del programa de *Excel* $\text{Kp}(\text{AHn})\text{pH}$.⁵⁶ Las constantes de protonación determinadas como $\log K_{D1}$ y $\log K_{D2}$ se incluyen en la **Tabla 2** y las fracciones molares de las especies se muestran con líneas discontinuas en la **Figura 8** y **Figura 9** (arriba).

En el caso de los ligantes $(\text{dtpa1mnap})\text{H}_3$ (**3**) y $(\text{dtpa2mnap})\text{H}_3$ (**4**), las mediciones de RMN ^1H a diferente pD revelaron esquemas de protonación análogos a los de los derivados

(dtpa1nap) H_3 (**1**) y (dtpa2nap) H_3 (**2**) (ver parte inferior de la **Figura 10** y **Figura 11**). Los valores determinados de $\log K_{D1}$ y $\log K_{D2}$ se incluyen en la **Tabla 2** y las fracciones molares de las especies se muestran con líneas discontinuas en las **Figura 10** y **Figura 11** (arriba).

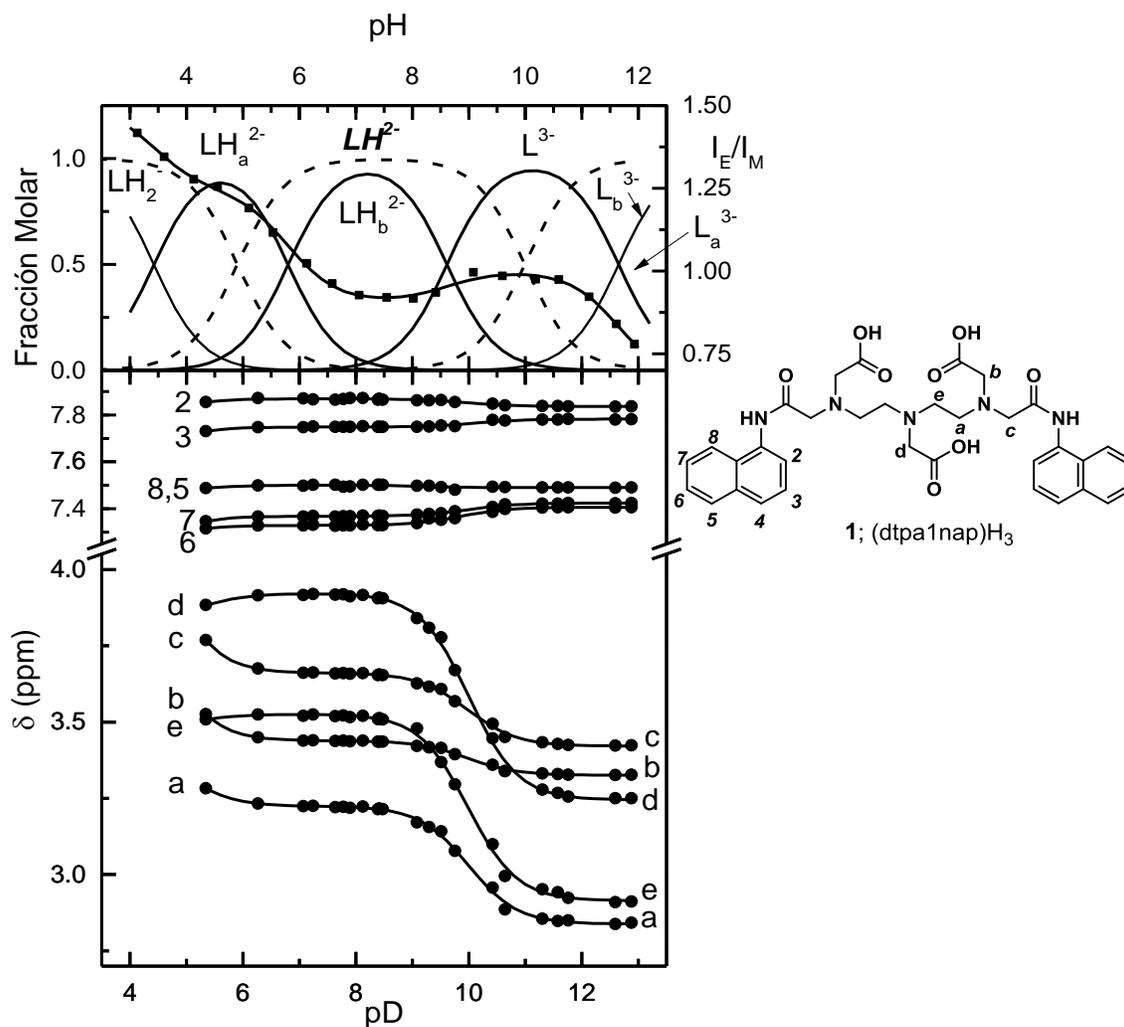


Figura 8. (Arriba) Relación de intensidades excímero/monómero (I_E/I_M) de (dtpa1nap) H_3 (**1**) en función de pH (cuadrados, $\lambda_{exc} = 280$ nm; concentración = 5×10^{-5} M), ajuste por mínimos cuadrados no-lineales basado en la **Ecuación 4** (línea punteada) con las constantes de equilibrio que se muestran en la **Tabla 3**, fracciones molares de las especies (dtpa1nap) $H_n^{(3-n)-}$ responsables de los cambios en la emisión (líneas sólidas) y de las determinadas por RMN 1H (líneas discontinuas, por claridad solo se etiquetó la especie monoprotonada con cursiva y negrita LH^{2-}). (Abajo) Desplazamientos químicos (δ) de protón en función del pD (círculos) y los mejores ajustes basados en la **Ecuación 3** (líneas sólidas).

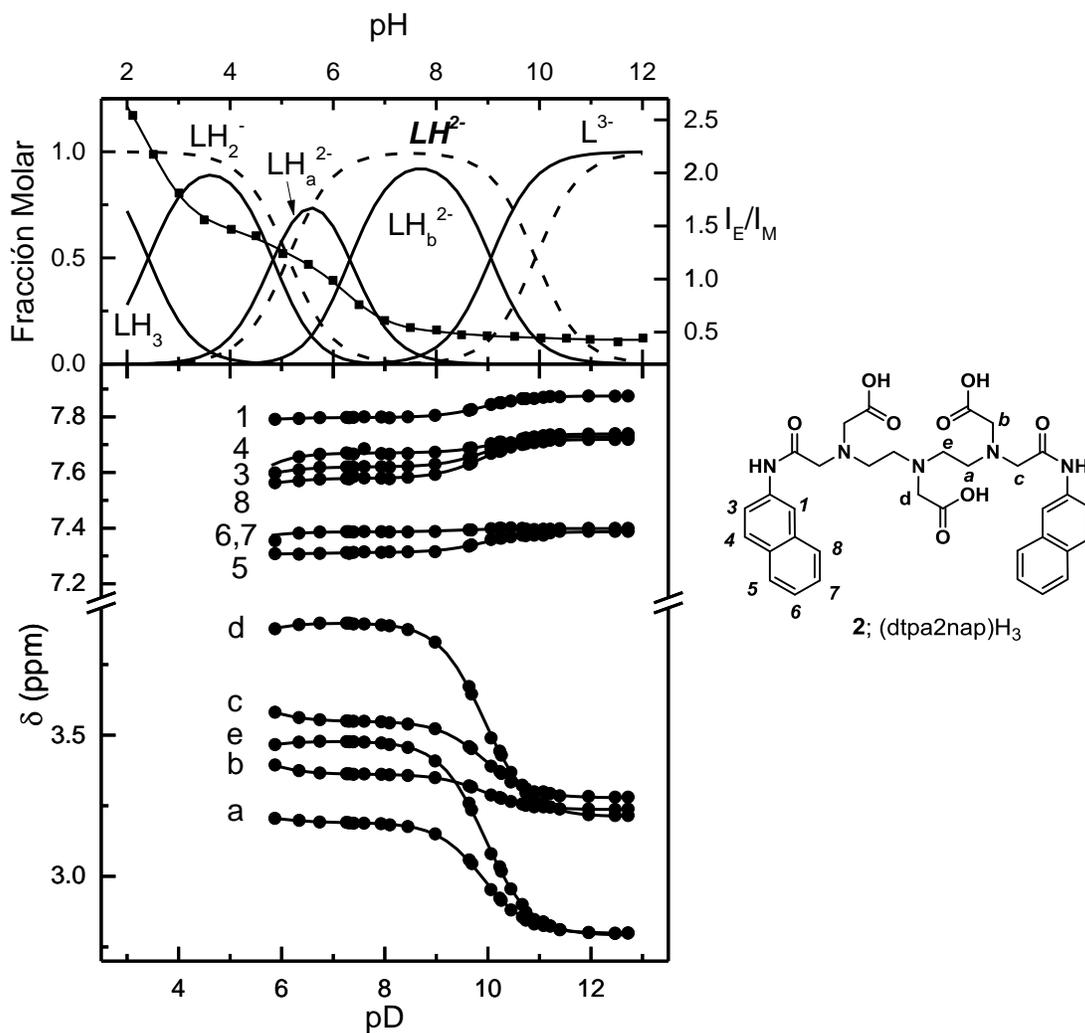


Figura 9. (Arriba) Relación de intensidades excímero/monómero (I_E/I_M) de $(dtpa2nap)H_3$ (**2**) en función de pH (cuadrados, $\lambda_{exc} = 280$ nm; concentración = 5×10^{-5} M), ajuste por mínimos cuadrados no-lineales basado en la **Ecuación 4** (línea punteada) con las constantes de equilibrio que se muestran en la **Tabla 3**, fracciones molares de las especies $(dtpa2nap)H_n^{(3-n)-}$ responsables de los cambios en la emisión (líneas sólidas) y de las determinadas por RMN 1H (líneas discontinuas, por claridad solo se etiquetó la especie monoprotonada con cursiva y negrita LH^{2-}). (Abajo) Desplazamientos químicos (δ) de protón en función del pD (círculos) y los mejores ajustes basados en la **Ecuación 3** (líneas sólidas).

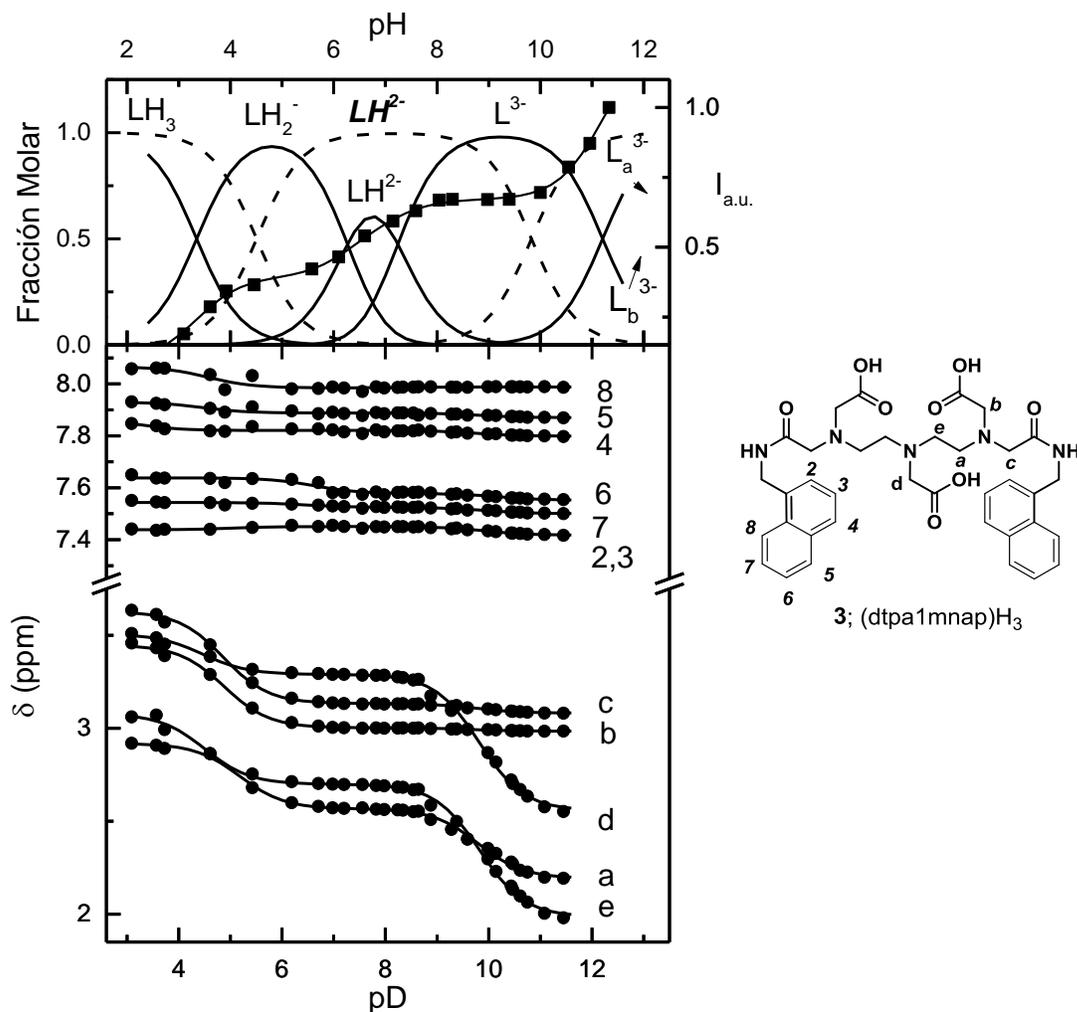


Figura 10. (Arriba) Intensidad de emisión (u.a.) de (dtpa1mnap)H₃ (**3**) a $\lambda = 338$ nm en función del pH ($\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm; concentración = 1×10^{-6} M), ajuste por mínimos cuadrados no-lineales basado en la **Ecuación 4** (línea punteada) con las constantes de equilibrio que se muestran en la **Tabla 3**, fracciones molares de las especies (dtpa1mnap)H_n⁽³⁻ⁿ⁾⁻ responsables de los cambios en la emisión (líneas sólidas) y de las determinadas por RMN ¹H (líneas discontinuas, por claridad solo se etiquetó la especie monoprotonada con cursiva y negrita **LH²⁻**). (Abajo) Desplazamientos químicos (δ) de protón en función del pD (círculos) y los mejores ajustes basados en la **Ecuación 3** (líneas sólidas).

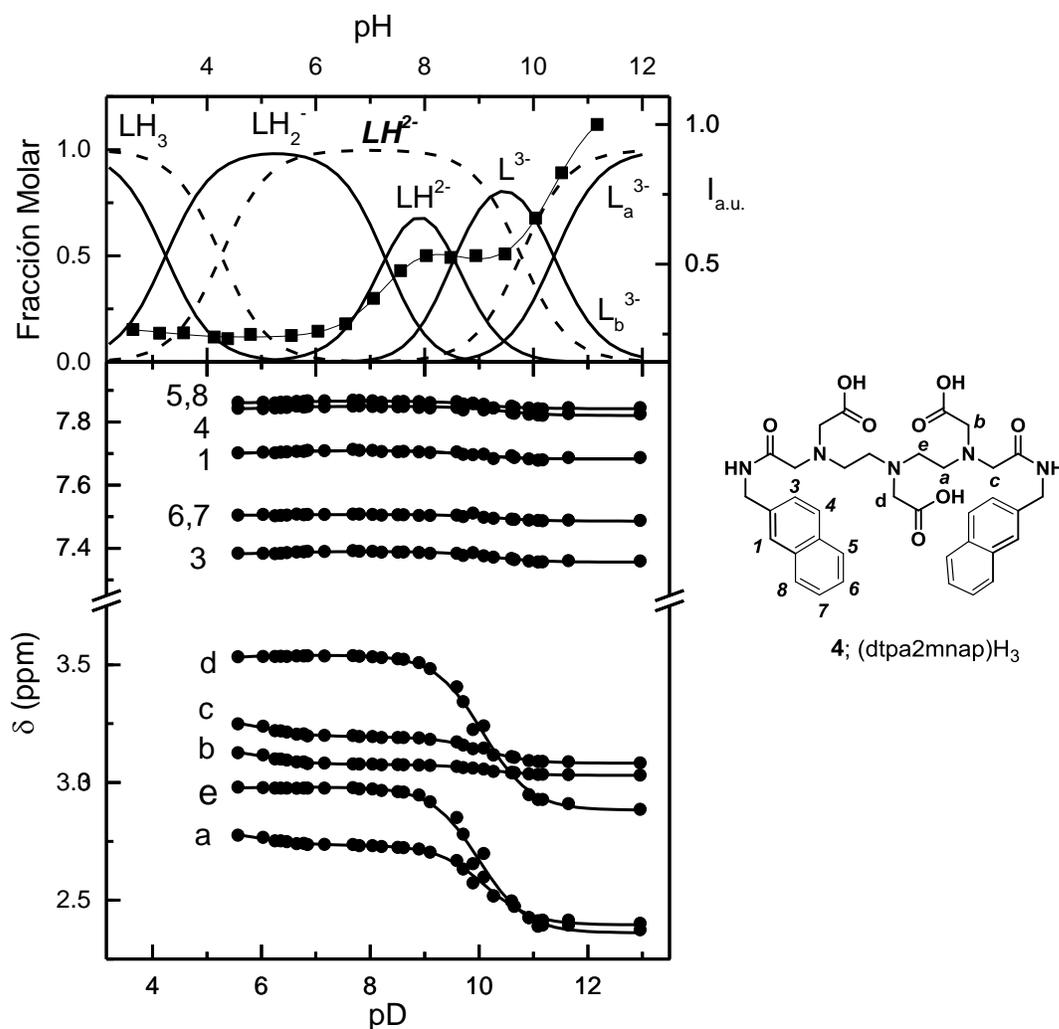


Figura 11. (Arriba) Intensidad de emisión (a.u.) de (dtpa2mnap) H_3 (**4**) a $\lambda = 335$ nm en función del pH ($\lambda_{exc} = 280$ nm; concentración = 1×10^{-6} M), ajuste por mínimos cuadrados no-lineales basado en la **Ecuación 4** (línea punteada) con las constantes de equilibrio que se muestran en la **Tabla 3**, fracciones molares de las especies (dtpa1mnap) $H_n^{(3-n)-}$ responsables de los cambios en la emisión (líneas sólidas) y de las determinadas por RMN 1H (líneas discontinuas, por claridad solo se etiquetó la especie monoprotonada con cursiva y negrita LH^{2-}). (Abajo) Desplazamientos químicos (δ) de protón en función del pD (círculos) y los mejores ajustes basados en la **Ecuación 3** (líneas sólidas).

Tabla 2. Constantes de protonación logarítmicas (K_{Dn}) de los ligantes **1-4** obtenidas por los cambios en el desplazamiento químico (δ) de los protones mostrados entre paréntesis.^a

L^{3-}		$\log K_{D1}$	$\log K_{D2}$
1 , (dtpa1nap) ³⁻	RMN(a)	9.99(3)	4.90(1)
2 , (dtpa2nap) ³⁻	RMN(b)	9.92(1)	5.13(3)
3 , (dtpa1mnap) ³⁻	RMN(c)	9.83(1)	4.51(2)
4 , (dtpa2mnap) ³⁻	RMN(c)	9.57(1)	4.10(5)

^aVer etiquetas en las **Figuras 8-11**.

3.2. Estudios de fluorescencia de los compuestos (dtpa1nap)H₃ (**1**), (dtpa2nap)H₃ (**2**), (dtpa1mnap)H₃ (**3**) y (dtpa2mnap)H₃ (**4**)

En el caso de fluoróforos unidos a grupos donadores de electrones, como ocurre en los ligantes **1-4**, la protonación en dichos sitios es una de las principales causas de los cambios en la intensidad de emisión. Por tal motivo, en este trabajo se estudió la fluorescencia de los derivados a diferente pH y se correlacionó con los δ de protón a diferente pD.

La **Figura 12** muestra los espectros de emisión de (dtpa1nap)H₃ (**1**) y (dtpa2nap)H₃ (**2**) en soluciones acuosas a diferente pH. En ambos casos, la razón de intensidades excímero/monómero (I_E/I_M) varía con el pH, lo que indica que está influenciada por el estado de protonación de la cadena de interconexión entre los grupos naftaleno. El espectro de emisión del ligante (dtpa1nap)H₃ en medio alcalino (pH = 11.9) muestra una banda característica del naftaleno monomérico a $\lambda = 370$ nm y un hombro atribuible a la banda de excímero de naftaleno a 405 nm. A medida que disminuye el pH la banda de emisión de monómero se debilita y la emisión de excímero se intensifica. Los cambios de la relación de intensidades I_E/I_M en todo el intervalo de pH estudiado se muestra en la parte superior de la **Figura 8**. A pH = 11.9, la razón de intensidades I_E/I_M es 0.78. Al disminuir el pH de 12 a 10 la razón I_E/I_M aumenta, luego disminuye ligeramente en el cambio de pH de 10 a 7, y aumenta nuevamente en dos pasos para alcanzar un valor de 1.42 a pH = 3.13.

Al analizar el perfil completo de intensidad de fluorescencia vs pH de (dtpa1nap)H₃ se observan cuatro puntos de inflexión en el intervalo de pH de 3 a 12, los que podrían

atribuirse al mismo número de etapas de protonación de la molécula. Sin embargo, como se describe en la sección anterior, las curvas de desplazamiento químico de protón revelan solo dos protonaciones en dicho intervalo de pH. Estas dos protonaciones explican los cambios en la emisión entre pH 8 y 10 y a pH menor de 5, respectivamente. Las variaciones adicionales en la intensidad de fluorescencia, uno por encima de pH 10 y el otro entre pH 5 y 7, son causadas por procesos fluorescentes distintos a la protonación de la molécula. La disminución de I_E/I_M por encima de pH 10 puede atribuirse a cambios en el grupo amida causados por el ambiente fuertemente alcalino. Este efecto se observó y reportó previamente por nuestro grupo de investigación para receptores acíclicos *bis*-amida, derivados de dtpa y ttha, funcionalizados con pireno.⁵⁷

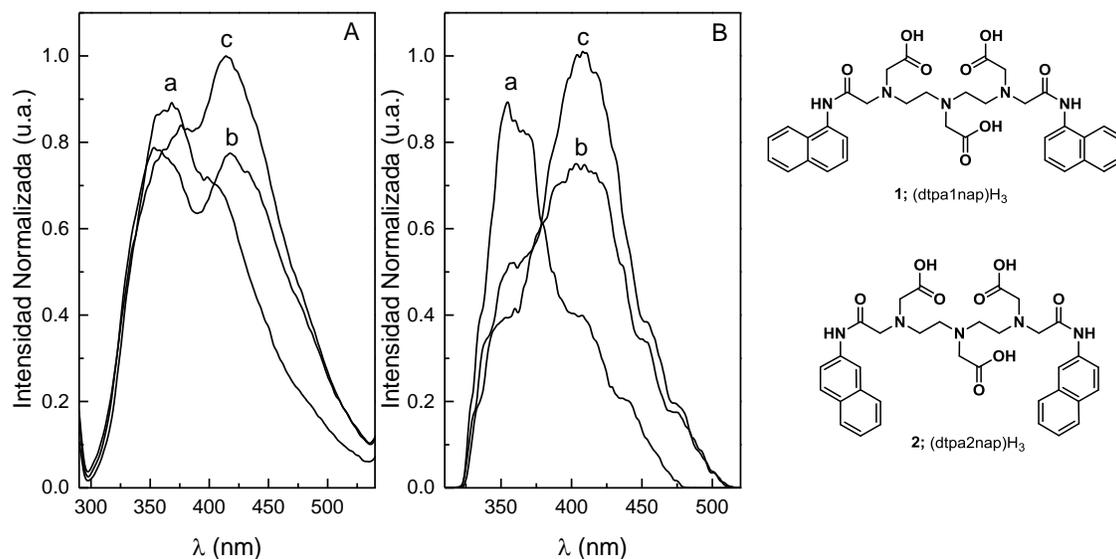


Figura 12. Espectros de emisión de A) (dtpa1nap) H_3 y B) (dtpa2nap) H_3 en solución acuosa a diferentes valores de pH: para (dtpa1nap) H_3 , (a) pH 11.9, (b) 10.6 y (c) 4.1; para (dtpa2nap) H_3 , (a) pH 12.0, (b) 4.0 y (c) 2.1. Las intensidades de los espectros de emisión están normalizadas al pico máximo del espectro más intenso de cada compuesto. $\lambda_{exc} = 280$ nm; concentración = 5×10^{-5} M.

Por otro lado, el cambio en intensidad entre pH 5 y 7 revela que la especie monoprotonada LH^{2-} (única especie presente en este intervalo de pH, de acuerdo con RMN 1H) sufre una conversión reversible, inducida por el cambio de pH, entre una forma ácida y una básica que se pueden denotar como LH_a^{2-} y LH_b^{2-} , respectivamente. Tomando en cuenta

los dos efectos mencionados, los datos de I_E/I_M vs pH se ajustaron a la **Ecuación 4 (Anexo 1)** por el método de mínimos cuadrados no-lineales del programa de Excel $K_p(AH_n)pH$.⁵⁶ Las constantes de equilibrio determinadas como se incluyen en la **Tabla 2** y las fracciones molares de las especies se muestran con líneas continuas en la **Figura 8** (arriba).

En el caso del ligante $(dtpa2nap)H_3$ (**2**), su espectro de emisión a pH=12 presenta una banda intensa a 355 nm correspondiente al naftaleno monomérico y un hombro a 410 nm atribuible a excímero ($I_E/I_M = 0.44$, **Figura 12**). Al disminuir el pH, el espectro de $(dtpa2nap)H_3$ (**2**) cambia de manera comparable al del isómero $(dtpa1nap)H_3$ (**1**), hasta alcanzar un valor de I_E/I_M de 2.54 a pH 2.1. Como ocurrió con el ligante $(dtpa1nap)H_3$ (**1**), el perfil completo de I_E/I_M vs pH de $(dtpa2nap)H_3$ (**2**) (**Figura 9**, arriba) muestra un cambio entre pH 5 y 7 que no puede asignarse a una protonación. Por lo tanto, esta variación en intensidad se atribuyó a la conversión reversible de la especie LH^{2-} en las formas LH_a^{2-} y LH_b^{2-} , respectivamente. Por otro lado, a diferencia de lo observado con $(dtpa1nap)H_3$ (**1**), la razón I_E/I_M del ligante $(dtpa2nap)H_3$ (**2**) no cambia por encima de pH 10, lo cual indica que la fluorescencia de la especie totalmente desprotonada L^{3-} no se afecta en ambiente fuertemente alcalino. Del ajuste de los datos de I_E/I_M vs pH a la **Ecuación 4** se obtuvieron las constantes K_{0ab} , K_{p1} y K_{p2} que se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Logaritmos de las constantes de equilibrio obtenidas de los cambios en la emisión de fluorescencia de los ligantes **1- 4**.

L^{3-}	$\log K_{0ab}$	$\log K_{p1}$	$\log K_{1ba}$	$\log K_{p2}$
1 , $(dtpa1nap)^{3-}$	-11.65(5)	8.61(8)	5.80(7)	3.42(6)
2 , $(dtpa2nap)^{3-}$		9.06(7)	6.32(8)	4.83(6) [‡]
3 , $(dtpa1mnap)^{3-}$	-11.21(9)	7.2(1)	6.3(2)	3.4(7)
4 , $(dtpa2mnap)^{3-}$	-10.38(7)	8.54(9)	7.3(1)	3.2(2)

[‡]Seguido por el tercer paso de protonación $\log \log K_{p3} = 2.41$ (5)

La inserción del espaciador CH_2 entre los grupos amida y naftilo dió lugar a los derivados $(dtpa1mnap)H_3$ (**3**) y $(dtpa2mnap)H_3$ (**4**). Esta pequeña variación en la estructura de los ligantes les confiere propiedades fluorescentes distintas (**Figura 13**) a las de sus

análogos (dtpa1nap) H_3 (**1**) y (dtpa2nap) H_3 (**2**). A $pH \approx 11$, los derivados (dtpa1mnap) H_3 (**3**) y (dtpa2mnap) H_3 (**4**) exhiben bandas de emisión bien definidas, tanto de monómero como de excímero de naftaleno a $\lambda = 335$ y 400 nm, respectivamente. Las intensidades de ambas bandas se debilitan al disminuir el pH, en contraste con lo observado en los espectros de emisión de (dtpa1nap) H_3 (**1**) y (dtpa2nap) H_3 (**2**), en los cuales la emisión de monómero disminuye y la de excímero aumenta. En la **Figura 10** y **Figura 11** (parte superior) se muestran las intensidades de emisión de monómero en función del pH y las fracciones molares de las diferentes especies fluorescentes, correspondientes a (dtpa1mnap) H_3 (**3**) y (dtpa2mnap) H_3 (**4**), respectivamente. Como ocurrió con el derivado (dtpa1nap) H_3 (**1**), al contrastar los perfiles de intensidad en función del pH con las curvas de δ vs pD (**Figura 10** y **Figura 11**) se observan cambios en intensidad que no están asociados a ninguna de las dos protonaciones de las moléculas. Las variaciones en intensidad a $pH > 10$ y entre pH 4 y 8 se atribuyeron a la presencia de las formas ácidas y básicas de las especies L^{3-} y LH^{2-} , respectivamente. Las curvas de intensidad en función del pH se ajustaron a la **Ecuación 4** (**Anexo 1**) y las constantes obtenidas se muestran en la **Tabla 3**.

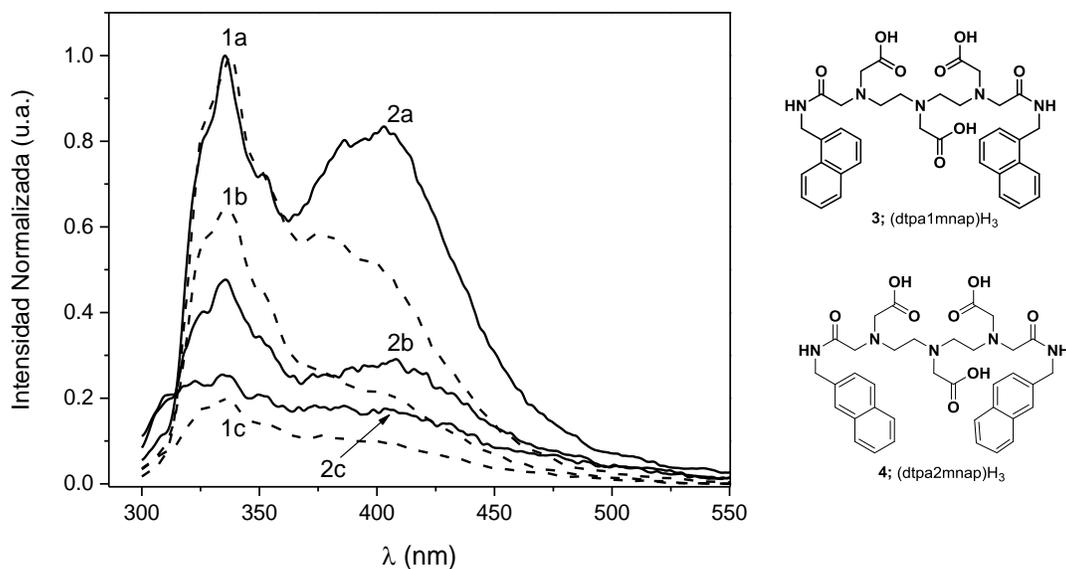


Figura 13. Espectros de emisión de (dtpa1mnap) H_3 (línea discontinua) y (dtpa2mnap) H_3 (línea continua) en solución acuosa a valores de pH seleccionados: para (dtpa1mnap) H_3 , (1a) pH 11.3, (1b) 7.6 y (1c) 3.1; para (dtpa2mnap) H_3 , (2a) pH 11.2, (2b) 7.6 y (2c) 3.1. Las intensidades de los espectros de emisión están normalizados por el pico máximo de intensidad para cada compuesto. $\lambda_{exc} = 280$ nm; concentración = 1×10^{-6} M.

Además de generar diferencias tanto en la forma de los espectros como en la dependencia de las intensidades de emisión respecto al pH, la inserción del grupo metileno como espaciador en los derivados (dtpa1mnap)H₃ (**3**) y (dtpa2mnap)H₃ (**4**) provocó una mayor eficiencia cuántica (ϕ) de la fluorescencia de un orden de magnitud mayor respecto a la de sus análogos (dtpa1nap)H₃ (**1**) y (dtpa2nap)H₃ (**2**). Esta propiedad se determinó para los cuatro receptores **1-4** en este trabajo, de acuerdo a la metodología que se describe en la sección Experimental. Los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

Este efecto de incremento en ϕ por inserción de un grupo metileno entre la amida y el fluoróforo se reportó por nuestro grupo para los derivados edta-bis-metilnaftil (**Esquema I**).³⁰ La causa más probable de este incremento es la disminución del efecto de extinción de fluorescencia (*quenching*) que ejercen los grupos amida al estar separados de los naftalenos por los espaciadores metilenos. Es conocido que el efecto *quenching* de los grupos amida es dependiente de la distancia del grupo cromóforo, la polaridad y la distribución de carga.³¹

Tabla 4. Rendimientos cuánticos de los derivados **1-4**.*

	ϕ^\dagger
1 , (dtpa1nap)H ₃	0.0188
2 , (dtpa2nap)H ₃	0.0188
3 , (dtpa1mnap)H ₃	0.1189
4 , (dtpa2mnap)H ₃	0.1160

[†]Se utilizó triptófano como referencia para el cálculo del rendimiento cuántico.⁵⁴

*Mediciones realizadas a 25 °C a pH 7.2 soluciones reguladora MOPS 0.01 M.

3.3. Estudios de coordinación a Zn²⁺ y Cd²⁺ de los ligantes (dtpa1nap)H₃ (**1**), (dtpa2nap)H₃ (**2**), (dtpa1mnap)H₃ (**3**) y (dtpa2mnap)H₃ (**4**)

Una vez llevada a cabo la caracterización completa de los ligantes **1-4**, se realizaron los estudios de coordinación dirigidos a los metales de interés Zn²⁺ y Cd²⁺. Las mediciones se hicieron en medio 100% acuoso, bajo condiciones de pH fisiológico (pH= 7.2, solución

amortiguadora MOPS 0.01 M), de acuerdo con la metodología descrita en la Sección Experimental. La razón esencial de llevar a cabo estos estudios específicamente a pH 7.2 es establecer el potencial de aplicación de los compuestos **1-4** como sensores capaces de detectar y cuantificar Zn^{2+} y Cd^{2+} a nivel biológico y/o en agua potable para consumo humano.

3.3.1. Ligantes (dtpa1nap) H_3 (**1**) y (dtpa2nap) H_3 (**2**)

3.3.1.1. Coordinación a Zn^{2+}

En la **Figura 14** se muestran los espectros de emisión obtenidos en la titulación espectrofluorimétrica de (dtpa1nap) H_3 (**1**) y (dtpa2nap) H_3 (**2**) con Zn^{2+} . Como se puede observar, en ambos casos, al incrementarse la concentración del metal ocurre una disminución de la intensidad de fluorescencia en todo el intervalo de longitudes de onda, sin cambios en la forma de los espectros. Este efecto es contrario a lo que usualmente provoca el ion diamagnético Zn^{2+} al coordinarse a ligantes fluorescentes, es decir, aumento en el rendimiento cuántico de la emisión por incremento de la rigidez molecular.⁴²

En el caso del ligante (dtpa1nap) H_3 (**1**), la disminución en intensidad es lineal hasta un valor $[\text{Zn}]/[\text{L}]=1$ (ver recuadro en **Figura 14**, izquierda), lo que indica una estequiometría M:L 1:1 en el complejo. La constante de formación condicional no pudo determinarse por esta técnica y se estimó ser $K_{f1}' \geq 8$ (**Tabla 5**). Para el ligante (dtpa2nap) H_3 (**2**), la curva de titulación es asintótica (ver recuadro en **Figura 14**, derecha) y los datos experimentales pudieron ajustarse satisfactoriamente para la formación de un complejo con estequiometría 1:1 M:L (ver **Ecuación 5** en **Anexo 1**). La constante de formación condicional calculada fue $\log K_{f1}' = 5.9$ (**Tabla 5**).

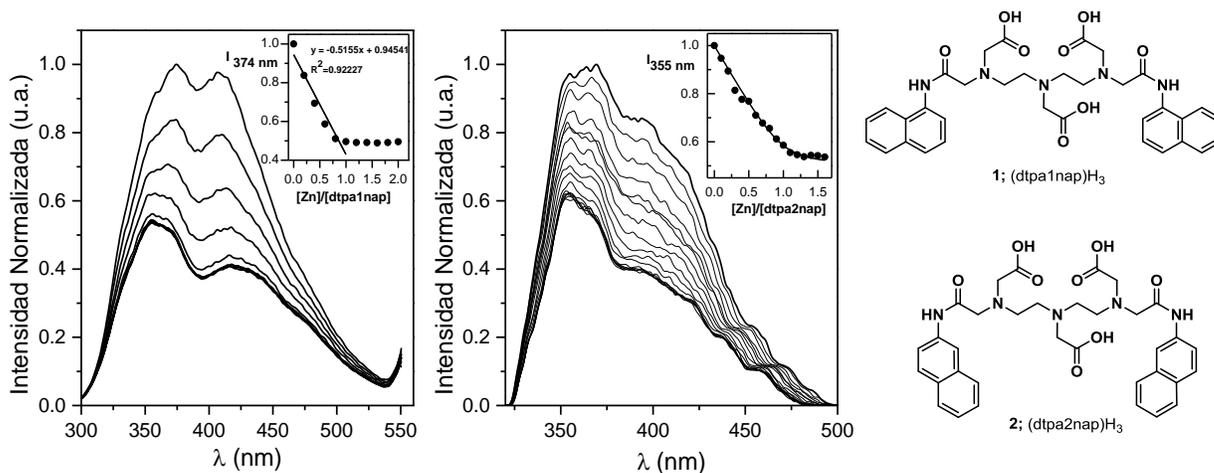


Figura 14. Espectros de fluorescencia de $(dtpa1nap)H_3$ (izquierda) y $(dtpa2nap)H_3$ (derecha) en presencia de Zn^{2+} en diferentes relaciones de las concentraciones totales $[Zn]_t/[L]_t$ a pH 7.2 en solución amortiguadora MOPS 0.01 M. $[L]_t = 5 \times 10^{-5}$ M, $\lambda_{exc} = 280$ nm. Recuadros: Intensidad del pico máximo en función de $[Zn]_t/[L]_t$; las líneas continuas muestran la regresión lineal para $(dtpa1nap)H_3$ y un ajuste de mínimos cuadrados basado en la estequiometría ZnL para $(dtpa2nap)H_3$.

Tabla 5. Estequiometría y constantes logarítmicas condicionales (con desviación estándar en el dígito menos significativo) de los complejos de Zn^{2+} , y Cd^{2+} a pH 7.2 (solución reguladora MOPS 0.01 M): constantes condicionales, $K_{f1}' = [ML]/[M][L']$ para ML y $\beta_{f2}' = [ML]_2/[M][L']^2$ para ML_2 . (Abajo) Cambios en la intensidad de emisión tras la complejación, $\Delta = (I_{complejo} - I_{ligando})/I_{ligando}$ para monómero y excímero.

	Zn^{2+}	Cd^{2+}
1 , $(dtpa1nap)H_3$	$ML; \geq 8^\dagger$	$ML; \geq 8^\dagger$
2 , $(dtpa2nap)H_3$	$ML; 5.9 (4)$	$ML; \geq 8^\dagger$
3 , $(dtpa1mnap)H_3$	$ML_2; 14.2(6)$	$ML; 6.61 (8)$
4 , $(dtpa2mnap)H_3$	$ML_2; 15.0 (7)$	$ML; 6.54 (8)$
Δ Monómero; Δ Excímero		
1 , $(dtpa1nap)H_3$	-0.50; -0.60	-0.34; -0.33
2 , $(dtpa2nap)H_3$	-0.47; -0.56	-0.45; -0.36
3 , $(dtpa1mnap)H_3$	+0.13; -0.56	-0.05; +1.14
4 , $(dtpa2mnap)H_3$	+0.11; -0.68	-0.12; +0.74

† Respuesta lineal hasta $[M]_t/[L]_t = 1$; $\log K_{f1}'$ está fuera del límite superior que se puede determinar en la titulación.

3.3.1.2. Coordinación a Cd^{2+}

Al llevar a cabo los estudios de coordinación a Cd^{2+} con los ligantes $(dtpa1nap)H_3$ (**1**) y $(dtpa2nap)H_3$ (**2**) se encontró que, en ambos casos, la intensidad de emisión disminuye de manera lineal al incrementarse la concentración de Cd^{2+} hasta alcanzar un valor de $[Cd]_f/[L]_f = 1$, lo que indica la formación de complejos ML con estequiometría 1:1 (**Figura Anexo 3**). Las constantes de formación condicional no pudieron determinarse por esta técnica y se estimaron ser $K_{f1} \geq 8$ (**Tabla 5**).

3.3.1.3. Análisis de los resultados de la coordinación de $(dtpa1nap)H_3$ (**1**) y $(dtpa2nap)H_3$ (**2**) a Zn^{2+} y Cd^{2+}

Los resultados muestran que los ligantes $(dtpa1nap)H_3$ (**1**) y $(dtpa2nap)H_3$ (**2**) presentan el mismo tipo de respuesta a la coordinación a Cd^{2+} o Zn^{2+} , algo que, como se discute en las primeras secciones de este trabajo, dificulta el diseño de sensores fluorescentes selectivos (sensores que muestren respuestas distintas hacia cada uno de estos iones). Además otro aspecto que hay que señalar es que la modificación de la cadena de interconexión a una tipo dtpa en los derivados **1** y **2**, no se tradujo en mejores respuestas fluorescentes hacia Zn y Cd, respecto a las de los compuestos análogos $(edta1nap)H_2$ y $(edta2nap)H_2$ derivados de edta (**Esquema I**).

En cuanto a la coordinación a Zn^{2+} , a pesar de que $(edta2nap)H_2$ solo mostró apagamiento, la respuesta reportada para $(edta1nap)H_2$ fue muy buena: incremento de intensidad de emisión en aprox. 300% y desplazamiento de la banda hacia el azul aprox. 15 nm.²⁹ En contraste, tanto $(dtpa1nap)H_3$ (**1**) como $(dtpa2nap)H_3$ (**2**) solo responden a Zn^{2+} con apagamiento de la fluorescencia (**Figura 14**).

Por otro lado, la fluorescencia de ambos ligantes derivados de dtpa (**1** y **2**) se apaga por efecto del Cd^{2+} (**Figura Anexo 3**). Este efecto es igual al reportado para ambos ligantes derivados de edta [$(edta1nap)H_2$ y $(edta2nap)H_2$],²⁹ por lo que se puede concluir que no hubo una mejora en el modo de respuesta a dicho metal al modificar la cadena quelante.

En cuanto a la mayor estabilidad esperada para los complejos de ligantes derivados de dtpa (**1** y **2**) respecto a los derivados de edta [(edta2nap)H₂ y (edta2nap)H₂], como se planteó inicialmente, esto sí se cumplió en el caso de Cd²⁺ (ver valores de K_f en **Tabla Anexo 1**). Al parecer, el mayor tamaño de la cadena de interconexión tipo dtpa se adapta mejor a los iones de cadmio que poseen un radio iónico mayor al de Zn²⁺.

3.3.2. Ligantes (dtpa1mnap)H₃ (**3**) y (dtpa2mnap)H₃ (**4**)

3.3.2.1. Coordinación a Zn²⁺

En contraste con lo observado con los ligantes (dtpa1nap)H₃ (**1**) y (dtpa2nap)H₃ (**2**), la coordinación a Zn²⁺ provocó un cambio radiométrico en los espectros de emisión de los compuestos (dtpa1mnap)H₃ (**3**) y (dtpa2mnap)H₃ (**4**) (**Figura 15**). En cualquiera de las dos titulaciones, la relación de intensidades I_E/I_M disminuye y se aproxima a un valor constante alrededor de $[Zn]_v/[L]_t \approx 0.5$ lo que sugiere estequiometrias 1:2 M:L para ambos complejos (ver recuadros de la **Figura 15**). Los datos experimentales se ajustaron a la **Ecuación 6** (ver Anexo 1) mediante el método de mínimos cuadrados no-lineales y se obtuvieron las constantes de formación condicionales $\beta_2' = [ML']/[M][L']^2$ que se muestran en la **Tabla 3**. En este caso, la presencia del grupo metileno entre el fluoróforo y los sitios donadores en los ligantes (dtpa1mnap)H₃ (**3**) y (dtpa2mnap)H₃ (**4**) modifica tanto la respuesta fluorescente a Zn²⁺ como la composición de los complejos, respecto a las de los compuestos análogos (dtpa1nap)H₃ (**2**) y (dtpa2nap)H₃ (**2**).

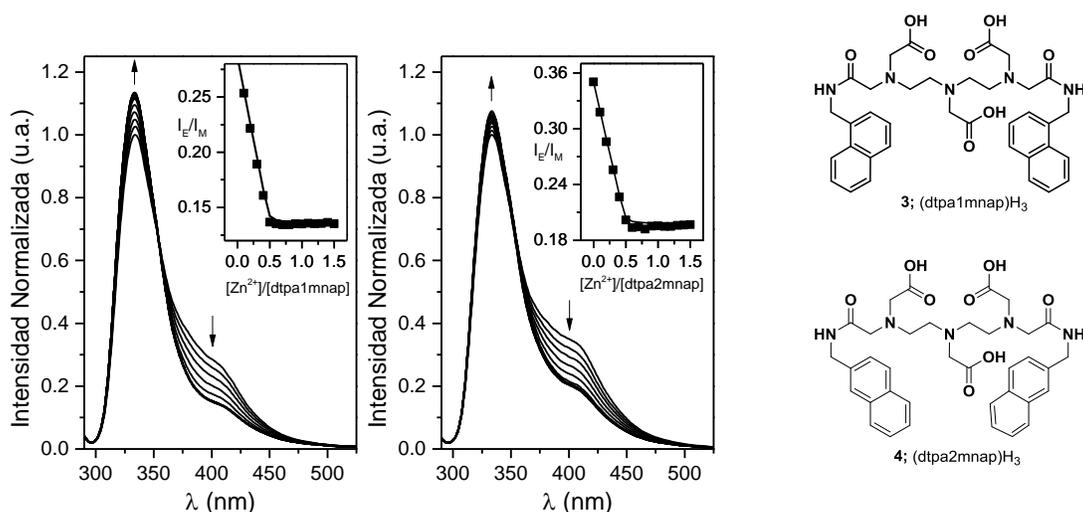


Figura 15. Espectros de fluorescencia de $(\text{dtpa1mnap})\text{H}_3$ (izquierda) y $(\text{dtpa2mnap})\text{H}_3$ (derecha) en presencia de Zn^{2+} en diferentes proporciones de las concentraciones totales $[\text{Zn}]_t/[\text{L}]_t$ a pH 7.2 en 0.01 M de tampón MOPS. $[\text{L}]_t = 1 \times 10^{-6}$ M, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Recuadros: relación de intensidades excímero/monómero como función de $[\text{Zn}]_t/[\text{L}]_t$; las líneas continuas representan el ajuste por mínimos cuadrados basados en la estequiometría de ZnL_2 .

3.3.2.2. Coordinación a Cd^{2+}

Un resultado notable fue obtenido al realizar la titulación espectrofluorimétrica con Cd^{2+} del derivado $(\text{dtpa2mnap})\text{H}_3$ (**4**). Como se muestra en la **Figura 16** (derecha), la adición de Cd^{2+} a la solución del ligante provocó un cambio radiométrico en el espectro de emisión, el cual es inverso al causado por Zn^{2+} . En este caso la relación de intensidades I_E/I_M aumenta (**Figura 16**). Los datos experimentales de la intensidad de fluorescencia a 400 nm en función de la razón $[\text{M}]/[\text{L}]$ se pudieron ajustar a la formación de un complejo ML con estequiometría 1:1. La constante de formación condicional calculada para el complejo Cd-dtpa2mnap fue $\log K_{f1}' = 6.5$.

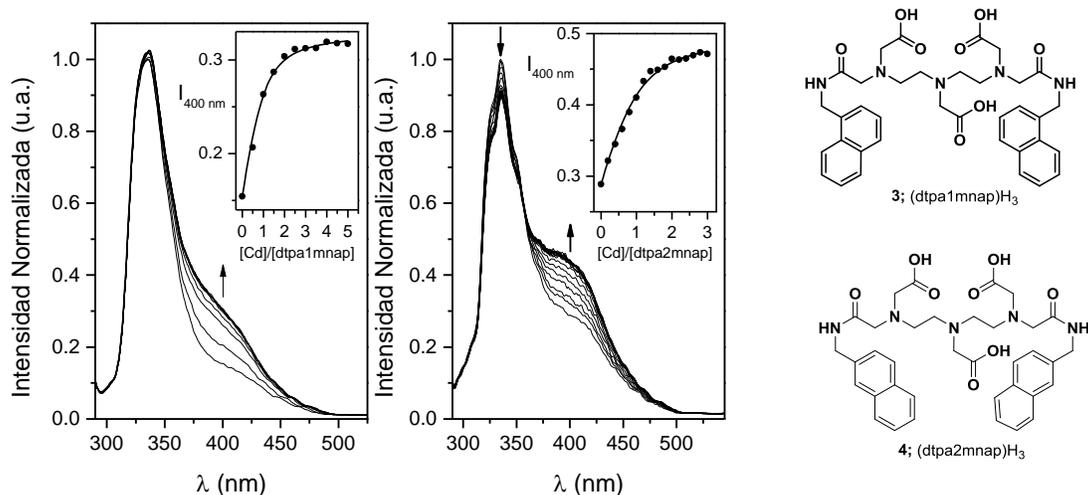


Figura 16. Espectros de fluorescencia de $(\text{dtpa1mnap})\text{H}_3$ (izquierda) y $(\text{dtpa2mnap})\text{H}_3$ (derecha) en presencia de Cd^{2+} en diferentes proporciones de las concentraciones totales $[\text{Cd}]/[\text{L}]_t$ a pH 7.2 en 0.01 M de tampón MOPS. $[\text{L}]_t = 1 \times 10^{-6}$ M, $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm. Recuadros: intensidades de emisión de excímero a 400 nm como función de $[\text{Cd}]/[\text{L}]_t$; las líneas continuas representan el ajuste por mínimos cuadrados basados en la estequiometría de CdL.

En este punto es importante destacar la capacidad del ligante $(\text{dtpa2mnap})\text{H}_3$ (**4**) de reconocer a los dos metales Cd^{2+} y Zn^{2+} mediante señales fluorescente diferentes y completamente distinguibles entre sí, las cuales además se destacan por ser de tipo radiométrico (ver los valores de cambios en la intensidad de emisión, Δ , en la parte inferior de la **Tabla 5**). La tendencia inversa de las intensidades de emisión de excímero y monómero tras la complejación se observa mejor en la **Figura 17**. Hasta donde sabemos, con excepción del compuesto $(\text{edta2mnap})\text{H}_2$ (**Esquema I**) reportado por nuestro grupo (ver detalles en Introducción),³⁰ no existen en la literatura quimiosensores fluorescentes reportados capaces de distinguir entre cadmio y zinc emitiendo respuestas radiométricas inversas. Otro punto a remarcar es que los compuestos preparados en este trabajo actúan bajo condiciones 100% acuosas y no en solventes orgánicos o mezclas buffer acuoso-solvente orgánico, como es el caso de los sensores reportados por otros autores, los cuales se citan en la última sección de Antecedentes de este trabajo.

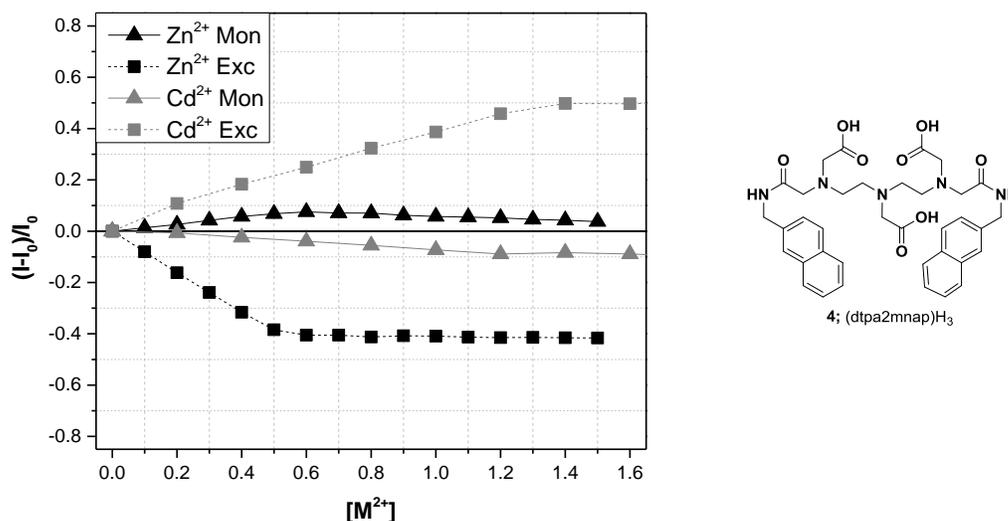


Figura 17. Tendencia de excímero y monómero para los complejos formados de dtpa2mnap con Cd²⁺ y Zn²⁺.

En el caso del derivado (dtpa1mnap)H₃ (**3**), la coordinación a Cd²⁺ solo causó un incremento de intensidad de la banda de emisión a $\lambda=400$ nm correspondiente a excímero (**Figura 16**, izquierda). Este modo de respuesta también es opuesto al efecto del ion Zn²⁺, el cual provocó disminución de la intensidad a esa longitud de onda (ver **Figura 13**, izquierda). Dado que la emisión de excímero está localizada en el rango visible, la propiedad que presenta (dtpa1mnap)H₃ (**3**) lo hace muy atractivo como un sensor de Cd²⁺ y Zn²⁺ basado en el cambio de intensidad de fluorescencia que actúa en un medio 100% acuoso.

3.3.2.3. Análisis de los resultados de la coordinación de (dtpa1mnap)H₃ (**3**) y (dtpa2mnap)H₃ (**4**) a Zn²⁺ y Cd²⁺

En cuanto a la mejora esperada en las respuestas fluorescentes a Zn²⁺ por modificación de la cadena de interconexión a una tipo dtpa en los derivados **3** y **4**, respecto a las de los compuestos análogos de edta (edta1mnap)H₂ y (edta2mnap)H₂ (**Esquema I**), puede concluirse que esto solo ocurrió con el derivado (dtpa1mnap)H₃ (**3**). La fluorescencia de este compuesto varió de manera radiométrica, mientras que el derivado análogo (edta1mnap)H₂ fue prácticamente insensible a Zn²⁺ (Ver **Figura 15** y **Figura Anexo 4**).⁵⁸ En el caso de los

derivados (edta2mnap)H₂ y (dtpa2mnap)H₃ (**4**), sus respuestas a Zn²⁺ son comparables (**Figura 15** y **Figura Anexo 4**) y solo difieren en las estequiometrías de los complejos, que en el primer caso es 1:1 M:L y en el segundo 1:2 M:L.

Por otro lado, en lo que respecta a la coordinación a Cd²⁺, la modificación de la cadena de interconexión a una tipo dtpa en los derivados **3** y **4**, no se tradujo en mejores respuestas fluorescentes respecto a las de los compuestos análogos derivados de edta (edta1mnap)H₂ y (edta2mnap)H₂ (**Esquema I**). De acuerdo a lo reportado,^{30, 58} a pH 8.5, estos últimos responden de manera radiométrica y lineal a Cd²⁺ con estequiometrías bien definidas. En contraste, de los dos derivados de dtpa, solo (dtpa2mnap)H₃ (**4**) actúa como sensor radiométrico de Cd²⁺, pero su respuesta no es lineal y la curva de titulación es asintótica.

3.4. Estudio comparativo del efecto de la coordinación a diversos cationes metálicos en la fluorescencia de los ligantes (dtpa1nap)H₃ (**1**), (dtpa2nap)H₃ (**2**), (dtpa1mnap)H₃ (**3**) y (dtpa2mnap)H₃ (**4**)

Los iones metálicos pueden tener dos efectos opuestos en la emisión de ligantes fluorescentes: (1) la coordinación del metal aumenta la rigidez del marco molecular del ligante e incrementa el rendimiento cuántico de la emisión; (2) la naturaleza paramagnética o el efecto de átomo pesado apagan la fluorescencia. Generalmente un efecto predomina sobre el otro.

Una vez llevado a cabo el estudio del efecto de Zn²⁺ y Cd²⁺ en la fluorescencia de los ligantes **1-4**, nos propusimos evaluar a un grupo amplio de cationes metálicos entre los que se incluyen iones alcalinotérreos (Ca²⁺ y Mg²⁺), iones divalentes de metales de transición (Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺ y Cu²⁺) y a los iones Hg²⁺ y Pb²⁺, éstos últimos iones diamagnéticos de átomos pesados.

En la

Figura 18 (arriba) se observa que, en el caso de los ligantes (dtpa1nap)H₃ (**1**) y (dtpa2nap)H₃ (**2**), de una forma predominante los iones metálicos solo presentan un efecto de

apagamiento de la intensidad de fluorescencia, tanto en la banda correspondiente a monómero, como en la banda que corresponde a excímero. Excepto para Ca^{2+} y Mg^{2+} , el efecto puede explicarse por la naturaleza paramagnética y/o característica de átomos pesados de los iones.³¹

En el caso de los ligantes $(\text{dtpa1mnap})\text{H}_3$ (**3**) y $(\text{dtpa2mnap})\text{H}_3$ (**4**) (

Figura 18 abajo), el efecto general del grupo de metales en la fluorescencia es distinto al que ejercen sobre $(\text{dtpa1nap})\text{H}_3$ (**1**) y $(\text{dtpa2nap})\text{H}_3$ (**2**) y podemos distinguir las respuestas previamente observadas a los iones de cadmio y zinc de ambos ligantes (ver sección anterior de este Capítulo). La inserción del espaciador CH_2 conduce a la respuesta selectiva a los iones Cd^{2+} y Zn^{2+} . Estos experimentos respaldan la teoría de que las dtpa-bisamidas son sensores radiométricos potenciales específicamente hacia los iones metálicos relevantes cadmio y zinc.

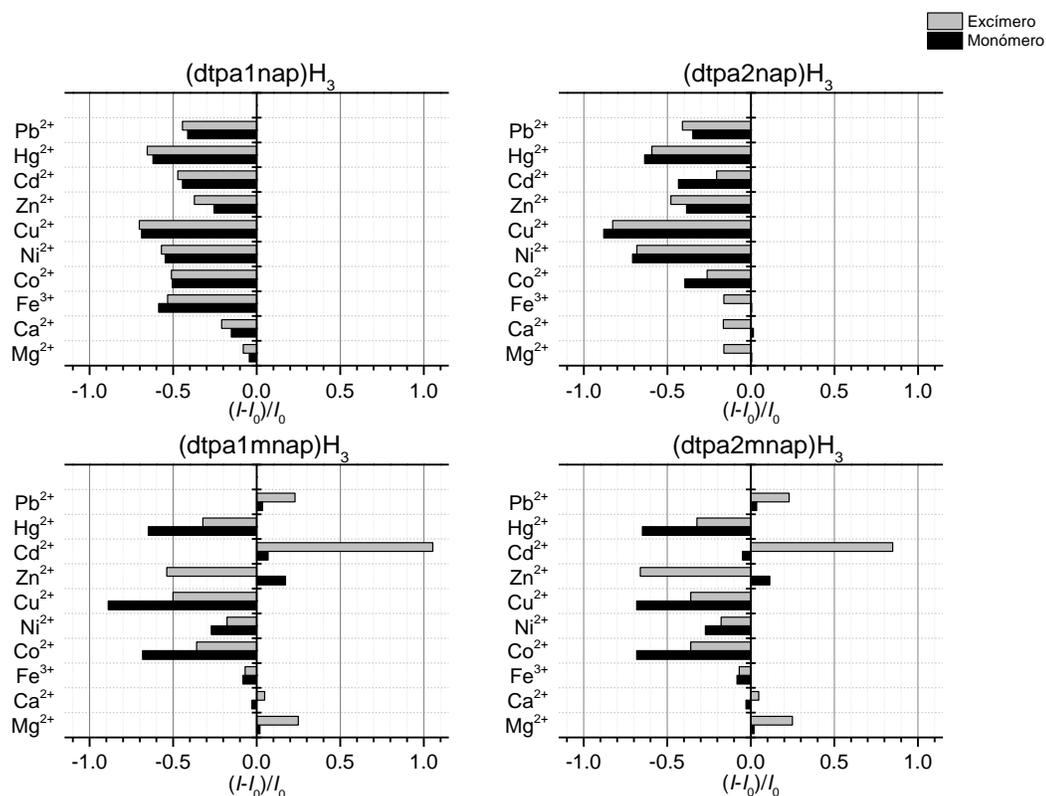


Figura 18. Variación de las intensidades de emisión, $(I - I_0)/I_0$, de monómero (barras negras) y excímero (barras grises) de (dtpa1nap)H₃ y (dtpa2nap)H₃ (arriba) y (dtpa1mnap)H₃ y (dtpa2mnap)H₃ (abajo) en presencia de varios iones metálicos (añadidos en forma de cloruros). I_0 es la intensidad de emisión del ligante solo, I es la intensidad en $[M]_t/[L]_t = 5$. El último se corrigió por dilución con base en la ley de Beer. En el caso de Pb-(dtpa1nap)H₃, la intensidad de emisión está dada por $[M]_t/[L]_t = 0.5$ y (Pb-dtpa2nap)H₃ $[M]_t/[L]_t = 1$ debido a la precipitación a mayores concentraciones de metal. $[L]_t = 5 \times 10^{-5}$ M para (dtpa1nap)H₃ y (dtpa2nap)H₃ y 1×10^{-6} M para (dtpa1mnap)H₃ y (dtpa2mnap)H₃; pH 7.2 en solución amortiguadora MOPS 0.01 M; $\lambda_{exc} = 280$ nm.

4. CONCLUSIONES

- En este trabajo se sintetizaron dos nuevos quimiosensores fluorescentes acíclicos tipo dtpa-bis-naftilo, (dtpa1nap)H₃ (**1**) y (dtpa2nap)H₃ (**2**), y se evaluó su capacidad de discriminar entre los iones Zn²⁺ y Cd²⁺ en agua a pH fisiológico mediante respuestas radiométricas opuestas basadas en la variación de intensidades excímero/monómero (I_E/I_M). Estas propiedades fueron también evaluadas con los compuestos análogos bis-metilnaftilo previamente sintetizados, (dtpa1mnap)H₃ (**3**) y (dtpa2mnap)H₃ (**4**), con fines de comparación.
- Se encontró que del grupo de compuestos **1-4**, únicamente (dtpa2mnap)H₃ (**4**) presentó respuestas radiométricas opuestas a los cationes Zn²⁺ y Cd²⁺, lo cual lo posiciona como un quimiosensor con capacidad de discriminar entre los dos cationes, que actúa en medio 100% acuoso a pH fisiológico.
- Las propiedades sensoras y afinidades hacia Zn²⁺ y Cd²⁺ de los compuestos **1-4** se compararon con las de cuatro ligantes análogos derivados de edta reportados previamente, (edta1nap)H₃, (edta2nap)H₃, (edta1mnap)H₃ y (edta2mnap)H₃, con el propósito de establecer si éstas mejoran por efecto del incremento en la longitud de la cadena de interconexión y en el número de átomos donadores. En cuanto a las propiedades sensoras, se encontró que únicamente en el caso de (dtpa1mnap)H₃ (**3**) la respuesta fluorescente hacia Zn²⁺ mejoró respecto a su análogo (edta1mnap)H₃, ya que este último es insensible a la presencia del metal mientras que el primero responde a Zn²⁺ en forma radiométrica. Por otro lado, en cuanto al incremento en afinidad, se determinó que los derivados (dtpa1nap)H₃ (**1**) y (dtpa2nap)H₃ (**2**) coordinan a Cd²⁺ con constantes de formación (K_f) más altas que las de sus análogos (edta1nap)H₃ y (edta2nap)H₃, lo cual se atribuyó a que la cadena quelante tipo dtpa se adapta mejor al radio iónico del metal.
- Con el propósito de establecer la selectividad de la respuesta del derivado (dtpa2mnap)H₃ (**4**) hacia Zn²⁺ y Cd²⁺, se realizó un estudio de coordinación comparativo en el cual se incluyeron un grupo amplio de iones metálicos (Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺, Ni²⁺ y Pb²⁺). Se encontró que la señalización radiométrica opuesta que presenta (dtpa2mnap)H₃ (**4**) hacia Zn²⁺ y Cd²⁺, es exclusiva para esta pareja

de cationes, lo cual reafirma las propiedades de la molécula como quimiosensor fluorescente altamente selectivo.

5. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo titulaciones de RMN ^1H de los ligantes **1-4** con los metales cadmio y zinc.
- Formar complejos de los ligantes **1-4** con los metales cadmio y zinc.
- Obtener cristales de los complejos metal ligante para cadmio y zinc con los ligantes **1-4**.
- Realizar cálculos teóricos de los posibles modos de coordinación entre cadmio y zinc con el derivado (dtpa2mnap) H_3 (**4**) y los metales cadmio y zinc.
- Establecer los límites de detección y cuantificación para el derivado (dtpa2mnap) H_3 (**4**) con los metales cadmio y zinc.
- Realizar estudios de competencia entre los diferentes metales estudiados vs cadmio y zinc.

6. REFERENCIAS

1. Kikuchi, K.; Komatsu, K.; Nagano, T., Zinc sensing for cellular application. *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, *8* (2), 182-191.
2. Carter, K. P.; Young, A. M.; Palmer, A. E., Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (8), 4564-4601.
3. 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.
4. Xie, X.; Smart, T. G., A physiological role for endogenous zinc in rat hippocampal synaptic neurotransmission. *Nature* **1991**, *349* (6309), 521-524.
5. Falchuk, K. H., The molecular basis for the role of zinc in developmental biology. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1998**, *188* (1), 41-48.
6. Mikata, Y.; Ohnishi, R.; Ugai, A.; Konno, H.; Nakata, Y.; Hamagami, I.; Sato, S.-i., OFF-ON-OFF fluorescent response of N, N, N', N'-tetrakis (1-isoquinolylmethyl)-2-hydroxy-1, 3-propanediamine (1-isoHTQHPN) toward Zn²⁺. *Dalton Transactions* **2016**, *45* (17), 7250-7257.
7. Maret, W., Analyzing free zinc(II) ion concentrations in cell biology with fluorescent chelating molecules. *Metallomics* **2015**, *7* (2), 202-211.
8. Maret, W.; Li, Y., Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chemical reviews* **2009**, *109* (10), 4682-4707.
9. Andreini, C.; Banci, L.; Bertini, I.; Rosato, A., Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of proteome research* **2006**, *5* (1), 196-201.
10. Blindauer, C. A., Advances in the molecular understanding of biological zinc transport. *Chemical Communications* **2015**, *51* (22), 4544-4563.
11. 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.
12. Dai, Z.; Canary, J. W., Tailoring tripodal ligands for zinc sensing. *New Journal of Chemistry* **2007**, *31* (10), 1708-1718.

13. Mati, S. S.; Chall, S.; Konar, S.; Rakshit, S.; Bhattacharya, S. C., Pyrimidine-based fluorescent zinc sensor: Photo-physical characteristics, quantum chemical interpretation and application in real samples. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *201*, 204-212.
14. Casalino, E.; Calzaretti, G.; Sblano, C.; Landriscina, C., Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* **2002**, *179* (1), 37-50.
15. Chaoui, A.; Mazhoudi, S.; Ghorbal, M. H.; El Ferjani, E., Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* **1997**, *127* (2), 139-147.
16. Hussain, T.; Shukla, G. S.; Chandra, S. V., Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats: in vivo and in vitro studies. *Pharmacology & toxicology* **1987**, *60* (5), 355-358.
17. Wu, K.; Gao, Y.; Yu, Z.; Yu, F.; Jiang, J.; Guo, J.; Han, Y., A facile fluorescent chemosensor based on naphthalene-derived Schiff base for zinc ions in aqueous solution. *Analytical Methods* **2014**, *6* (11), 3560-3563.
18. Bush, A. I., The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences* **2003**, *26* (4), 207-214.
19. Huang, Y. H.; Shih, C. M.; Huang, C. J.; Lin, C. M.; Chou, C. M.; Tsai, M. L.; Liu, T. P.; Chiu, J. F.; Chen, C. T., Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu, Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *Journal of cellular biochemistry* **2006**, *98* (3), 577-589.
20. Thévenod, F., Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicology and applied pharmacology* **2009**, *238* (3), 221-239.
21. Bridges, C. C.; Zalups, R. K., Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and applied pharmacology* **2005**, *204* (3), 274-308.
22. Xu, Z.; Yoon, J.; Spring, D. R., Fluorescent chemosensors for Zn²⁺. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39* (6), 1996-2006.
23. Lee, S. K.; Choi, M. G.; Choi, J.; Chang, S.-K., Fluorescence signaling of Zn²⁺ levels in synthetic urine by dipicolylamine-armed hydroxynaphthalimide. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *207*, 303-307.

24. Kim, S. Y.; Hong, J.-I., Naphthalimide-based fluorescent Zn^{2+} chemosensors showing PET effect according to their linker length in water. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50* (23), 2822-2824.
25. Lu, C.; Xu, Z.; Cui, J.; Zhang, R.; Qian, X., Ratiometric and Highly Selective Fluorescent Sensor for Cadmium under Physiological pH Range: A New Strategy to Discriminate Cadmium from Zinc. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72* (9), 3554-3557.
26. Xu, Z.; Baek, K.-H.; Kim, H. N.; Cui, J.; Qian, X.; Spring, D. R.; Shin, I.; Yoon, J., Zn^{2+} -Triggered Amide Tautomerization Produces a Highly Zn^{2+} -Selective, Cell-Permeable, and Ratiometric Fluorescent Sensor. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (2), 601-610.
27. Xue, L.; Liu, C.; Jiang, H., Highly Sensitive and Selective Fluorescent Sensor for Distinguishing Cadmium from Zinc Ions in Aqueous Media. *Organic Letters* **2009**, *11* (7), 1655-1658.
28. Zhou, X.; Li, P.; Shi, Z.; Tang, X.; Chen, C.; Liu, W., A Highly Selective Fluorescent Sensor for Distinguishing Cadmium from Zinc Ions Based on a Quinoline Platform. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51* (17), 9226-9231.
29. Machi, L.; Santacruz, H.; Sánchez, M.; Inoue, M., Bichromophoric Naphthalene Derivatives of Ethylenediaminetetraacetate: Fluorescence from Intramolecular Excimer, Protonation and Complexation with Zn^{2+} and Cd^{2+} . *Supramolecular Chemistry* **2006**, *18* (7), 561-569.
30. Machi, L.; Santacruz, H.; Sánchez, M.; Inoue, M., Cd^{2+} -sensitizing bichromophore: Excimer emission from an EDTA-methylnaphthalene derivative. *Inorganic Chemistry Communications* **2007**, *10* (5), 547-550.
31. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd edition ed.; Springer: 2006.
32. Formica, M.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Micheloni, M., New fluorescent chemosensors for metal ions in solution. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, *256* (1), 170-192.
33. Machi, L.; Santacruz Ortega, H.; Carrillo Moreno, E., Derivados dtpa-aminometilnaftaleno: nuevos quimiosensores fluorescentes de cationes metálicos en

- solución. *Revista de la Sociedad Química de México*, The Journal of the Mexican Chemical Society: México, DF, 2007; Vol. Vol. 1, p 95.
34. 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^{2+} in water. *Dalton Transactions* **2013**, 42 (6), 1969-1972.
 35. Cetin, I.; Berti, C.; Calabrese, S., Role of micronutrients in the periconceptual period. *Human Reproduction Update* **2009**, 16 (1), 80-95.
 36. Zhu, L.; Yuan, Z.; Simmons, J. T.; Sreenath, K., Zn(II)-coordination modulated ligand photophysical processes—the development of fluorescent indicators for imaging biological Zn(II) ions. *RSC advances* **2014**, 4 (39), 20398-20440.
 37. Clarke, N. D.; Berg, J. M., Zinc fingers in *Caenorhabditis elegans*: finding families and probing pathways. *Science* **1998**, 282 (5396), 2018-2022.
 38. 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.
 39. Guo, Z.; Kindy, M. S.; Kruman, I.; Mattson, M. P., ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation impairs cerebral synaptic glucose and glutamate transport and exacerbates ischemic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **2000**, 20 (3), 463-468.
 40. Kruman, I. I.; Pedersen, W. A.; Springer, J. E.; Mattson, M. P., ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Experimental neurology* **1999**, 160 (1), 28-39.
 41. Kondoh, M.; Araragi, S.; Sato, K.; Higashimoto, M.; Takiguchi, M.; Sato, M., Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells. *Toxicology* **2002**, 170 (1), 111-117.
 42. Rurack, K., Flipping the light switch 'ON' – the design of sensor molecules that show cation-induced fluorescence enhancement with heavy and transition metal ions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2001**, 57 (11), 2161-2195.
 43. 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.
44. 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.
 45. Valeur, B., *Molecular fluorescence: principles and applications*. Wiley-VCH: 2002.
 46. 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.
 47. de Melo, J. S.; Albelda, M. T.; Diaz, P.; Garcia-Espana, E.; Lodeiro, C.; Alves, S.; Lima, J. C.; Pina, F.; Soriano, C., Ground and excited state properties of polyamine chains bearing two terminal naphthalene units. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **2002**, (5), 991-998.
 48. Lodeiro, C.; Pina, F., Luminescent and chromogenic molecular probes based on polyamines and related compounds. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, 253 (9-10), 1353-1383.
 49. Song, E. J.; Kang, J.; You, G. R.; Park, G. J.; Kim, Y.; Kim, S.-J.; Kim, C.; Harrison, R. G., A single molecule that acts as a fluorescence sensor for zinc and cadmium and a colorimetric sensor for cobalt. *Dalton Transactions* **2013**, 42 (43), 15514-15520.
 50. Fan, J.; Wu, Y.; Peng, X., A naphthalimide fluorescent sensor for Zn²⁺ based on photo-induced electron transfer. *Chemistry letters* **2004**, 33 (10), 1392-1393.
 51. Xue, L.; Liu, Q.; Jiang, H., Ratiometric Zn²⁺ Fluorescent Sensor and New Approach for Sensing Cd²⁺ by Ratiometric Displacement. *Organic Letters* **2009**, 11 (15), 3454-3457.
 52. Vogel, A. I.; Mendham, J., *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis*. 5th ed.; Longman Scientific & Technical, 1989.
 53. Ueno, K., Guide for selecting conditions for EDTA titrations. *Journal of Chemical Education* **1965**, 42 (8), 432.
 54. Chen, R. F., Fluorescence Quantum Yields of Tryptophan and Tyrosine. *Analytical Letters* **1967**, 1 (1), 35-42.

55. Teale, F. W. J.; Weber, G., Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. *Biochemical Journal* **1957**, *65* (3), 476-482.
56. Inoue, M., Excel® Worksheets for Spectrometry. Universidad de Sonora: 2009.
57. 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.
58. Santacruz, H.; Machi, L., Titulaciones espectrométricas no publicadas de los derivados de EDTA-metil-naftaleno. 2006.
59. Motomichi, I., *Spectrometric Titration: a guide to experimental methods*. Universidad de Sonora: Mexico, 2013.
60. Vera, M.; Santacruz Ortega, H.; Inoue, M.; Machi, L., Bichromophoric naphthalene derivatives of diethylenetriaminepentaacetate (DTPA): fluorescent response to H⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺. *Supramolecular Chemistry* **2019**, *31* (5), 336-348.

7. ANEXO 1

7.1. Determinación de las constantes de protonación mediante titulaciones espectrométricas.

Las constantes de protonación (K_p) de moléculas *mono-*, *di-* o *poliácidas*, pueden determinarse experimentalmente mediante titulaciones espectrométricas cuando algún parámetro espectral observado I_{obs} (desplazamiento químico δ , absorbancia, fluorescencia, etc.) cambia con la concentración de protón $[H^+]$.

En el Capítulo 6 del texto “*Spectrometric Titration: A guide to experimental methods*”,⁵⁹ M. Inoue demuestra en forma detallada que para una especie básica poliprótica BsH_n , los cambios en el parámetro espectral I_{obs} por efecto de $[H^+]$ están dados por la siguiente ecuación:

$$I_{obs}([H^+]) = \frac{I_0 + I_1\beta_{p1}[H^+] + I_2\beta_{p2}[H^+]^2 + \dots}{1 + \beta_{p1}[H^+] + \beta_{p2}[H^+]^2 + \dots} \text{ Ec. 2}$$

Donde I_0 representa el parámetro espectral intrínseco de la especie no-protonada, I_n el de las diferentes especies protonadas y β_{pn} es la constante de protonación total de BsH_n definida por:

$$\beta_{pn} = \frac{[BsH_n]}{[Bs][H]^n} = K_{p1}K_{p2}K_{p2}$$

Del ajuste de los datos experimentales a la **Ecuación 2** se pueden obtener las K_p de la molécula en estudio.

7.2. Determinación de K_p mediante mediciones del desplazamiento químico de protón en función del pD.

El uso de ^1H RMN para la determinación de las K_p se basa en medir los cambios en los δ de los protones en función del pD. En este caso, el parámetro espectral observado es δ y la **Ecuación 2** toma la siguiente forma:⁵⁹

$$\delta(pD) = \frac{[\delta_0 + \delta_1 \cdot K_{D1} 10^{-pD} + \delta_2 \cdot K_{D1} \cdot K_{D2} 10^{-2pD}]}{[1 + K_{D1} 10^{-pD} + K_{D1} \cdot K_{D2} 10^{-2pD}]} \text{ Ec. 3}$$

7.3. Determinación de K_p mediante la medición de los cambios en la intensidad de fluorescencia en función del pH.

La protonación de átomos donadores directamente unidos a sistemas conjugados en una molécula puede originar cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia (I_F) derivados de modificaciones en la estructura electrónica. En estos casos, los datos experimentales de intensidad de emisión a diferente pH pueden ajustarse con la **Ecuación 2**, en la cual en el parámetro espectral I_{obs} es I_F .⁵⁹

Además de lo anterior, los cambios en pH también pueden alterar los procesos de relajación y originar cambios en la fluorescencia que no están vinculados a protonaciones. Este efecto ha sido observado y reportado anteriormente por nuestro grupo de investigación para receptores acíclicos *bis*-amida, derivados de dtpa y ttha, funcionalizados con pireno.⁵⁷

En este trabajo de tesis, la fluorescencia de los cuatro receptores (ligantes **1-4**) presenta cambios en intensidad tanto debido a protonaciones reales (detectadas por RMN ^1H) como a procesos no asociados a protonación. Para el ajuste de los datos experimentales de I_F vs pH se requirió tomar en cuenta tanto el “efecto amida” que ocurre a pH alto y que está descrito a detalle más adelante, como la interconversión reversible de las especies monoprotonadas LH^{2-} en las formas LH_a^{2-} y LH_b^{2-} , respectivamente, la cual origina un cambio espectral claramente distinguible en los cuatro casos.

Por lo anterior, para el ajuste de los datos experimentales de I_F vs pH y el cálculo de las constantes de equilibrio de los receptores **1-4**, la **Ecuación 2** se modificó y toma la forma:

$$I(pH) = \frac{\sum I_n \cdot f_n}{\sum f_n}$$

$$\sum I_n \cdot f_n = I_{ob} \cdot K_{0ab} 10^{pH} + I_{0a} + I_{1b} \cdot K_{p1} 10^{-pH} + I_{1a} \cdot B_1 10^{-2pH} + I_2 \cdot B_2 10^{-3pH}$$

$$\sum f_n = K_{0ab} 10^{pH} + 1 + K_{p1} 10^{-pH} + B_{1a} 10^{-2pH} + B_2 10^{-3pH} \text{ Ec 4}$$

Aquí β_1 y β_2 son los productos de constantes escalonadas: $\beta_1 = K_{p1} \cdot K_{1ba}$ y $\beta_2 = K_{p1} \cdot K_{1ba} \cdot K_{p2}$. En la ecuación (4), I_n es La intensidad de emisión de la especie indicada por el subíndice.

7.3.1. Descripción del efecto amida en la intensidad de fluorescencia para el cálculo de sus constantes.

El cambio de emisión por encima del pH 10 se interpreta como una respuesta del grupo de amida a un cambio ambiental y/o por la desprotonación parcial del grupo. Este proceso se describe en términos de $K_{0ab} 10^{pH}$, en el que K_{0ab} es la constante de la conversión reversible de L_a^{3-} (especie ácida) a L_b^{3-} (especie básica). La conversión de L_a^{3-} a L_b^{3-} con pH eta dado por la ecuación:

$$f_b = \frac{K_{ab} 10^{pH}}{(1 + K_{ab} 10^{pH})}$$

Donde, $K_{ab} = [L_b]/[L_a]$, es una constante relacionada con la interconversión entre L_a^{3-} a L_b^{3-} . Cuando este equilibrio es incluido en el cambio de intensidad con pH. La podemos reescribir como:

$$I = \frac{(I_{ob} \cdot K_{ab} \cdot 10^{pH} + I_{0a} + \sum L_n \cdot \beta_n \cdot 10^{-npH})}{(K_{ab} \cdot 10^{pH} + 1 + \sum \beta_n \cdot 10^{-npH})}$$

Donde, I_{ob} y I_{0a} son intensidades de emisión de L_a^{3-} y L_b^{3-} , respectivamente.

7.4. Determinación de K_{cond} para complejos metálicos en fluorescencia

Dado que los complejos de los metales de transición son altamente estables, sus constantes de estabilidad pueden determinarse por el cambio de la fluorescencia del ligante con la variación de la concentración de metal a un pH constante. La formación de complejos metálicos compite con dos tipos de reacciones en un medio acuso dependiente del pH, la protonación del ligando ya que este puede ser capaz de coordinarse al ion metálico actúa como un buen aceptor de H^+ y la formación de hidróxidos metálicos que son formados en soluciones básicas.⁵⁹ Por ende, estas reacciones compiten con las reacciones de formación de un complejo:

Las titulaciones espectroscópicas son usualmente llevadas a cabo a pH constante, si $[HL]$ y $[M(OH)]$ no están cerca del pH experimental, la constante obtenida es llamada constante de formación condicional y la podemos definir como:

$$K_{LM}' = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

El cambio espectroscópico observado por la adición del metal lo podemos definir como:

$$[L]_f = \frac{[L]_{tj} - [M]_t D_j / D_{ML}}{1 + 10^{-p[H]} K_p}$$

Donde podemos asumir que $D_{ML} = I_{ML} - I_M$ y $[ML] = (D_j I / D_{ML}) [M]_t$ para definir la ecuación

$$K_{ML} = \frac{(1 + 10^{-p[H]} K_p) D_j / D_{ML}}{\left(1 - \frac{D_j}{D_{ML}}\right) \left([L]_{tj} - \frac{[M]_t D_j}{D_{ML}}\right)}$$

A pH contante la podemos reescribir como

$$K_{cond} = \frac{1}{\left(\frac{D_{ML}}{D_j} - 1\right) \left([L]_{tj} - \frac{[M]_t D_j}{D_{ML}}\right)} \text{ Ec. 5}$$

Cuando se forma un complejo ML_n ($n > 1$), el complejo es formado por n pasos de reacción

$$K_{LM'} = \frac{[ML_n]}{[ML_{n-1}][L]}$$

Para $M+nL \rightleftharpoons ML_n$

Algunos complejos metálicos muestran las siguientes propiedades, donde K_{f1} y K_{f2} son rápidamente determinadas.⁵⁹

- 1) Espectros distinguibles de ML y ML_2 , cuando dos tipos de complejos muestran diferentes espectros, que los parámetros espectrales individuales pueden ser observados y tratados de manera individual.
- 2) Pasos de reacción separados, si el segundo paso de reacción LM_2 empieza cuando la formación de complejo ML está completa. La curva de titulación puede ser separada en dos curvas de saturación y cada una puede ser determinada asumiendo que la reacción dos ocurre de manera independiente.
- 3) Coordinación simultánea cuando todas las moléculas ligando se coordinan al ion metálico para formar ML_2 .

Para este trabajo la formación de complejos ocurrió como en el último caso y las constantes de formación se determinaron por las siguientes ecuaciones.

$$\beta_1'(K_1') = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

$$\beta_2' = \frac{[M_2L]}{[L]^2 [M]}$$

$$I = \frac{(IL \times [L] + IML[ML] + IML_2 \times 2[ML_2])}{[L]_t} \text{ Ec. 6}$$

8. ANEXO 2

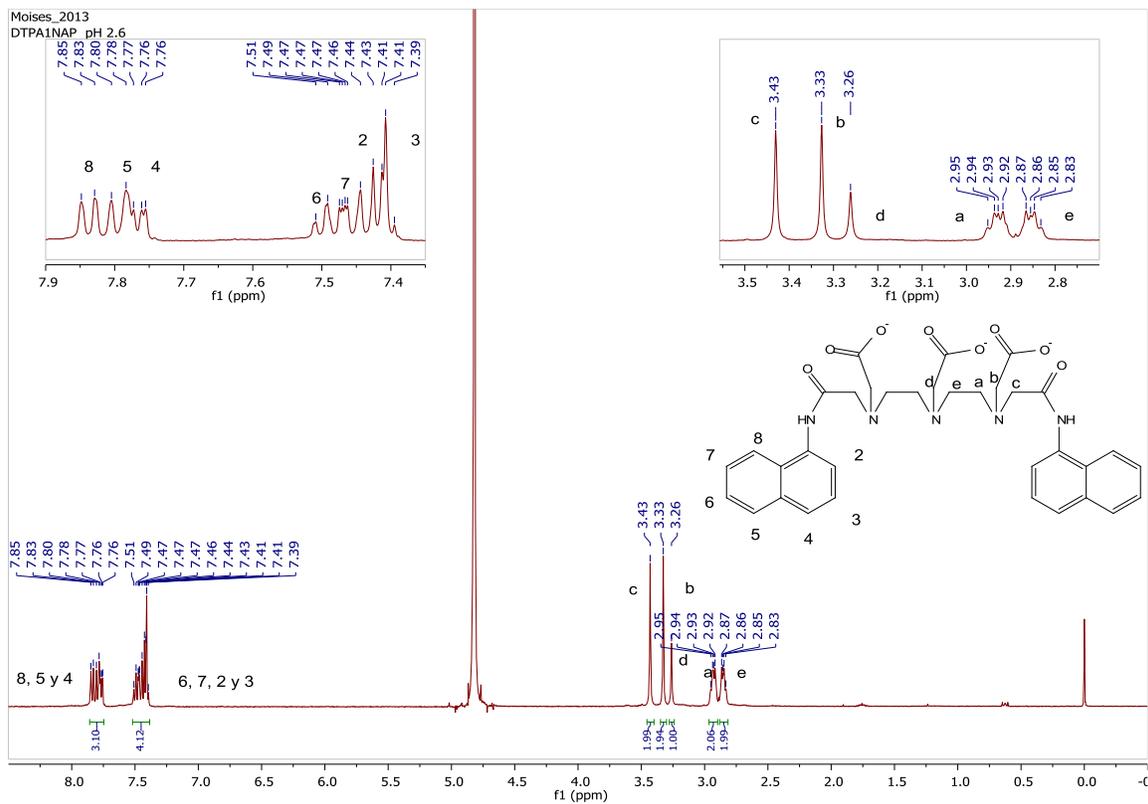


Figura Anexo 1. Espectro de RMN ^1H de **1** (dtpa1nap) H_3 en $\text{D}_2\text{O}/\text{DSS}$ $\text{pD} = 9.0$.

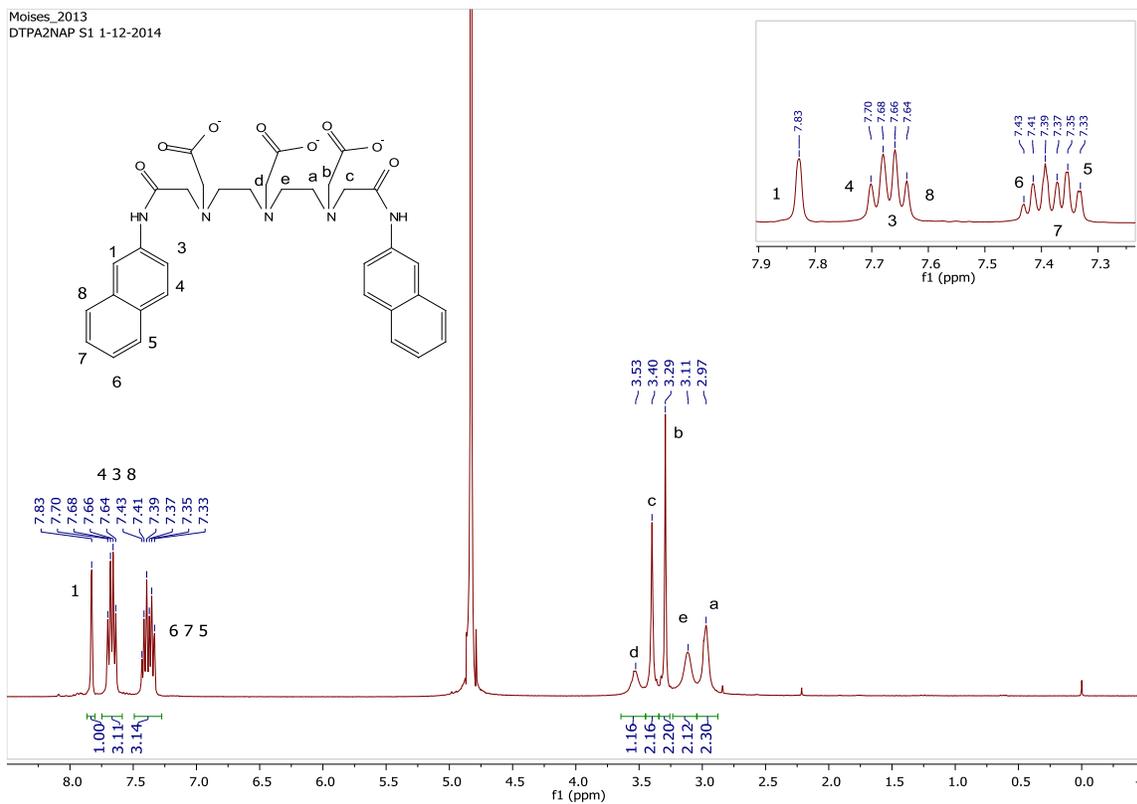


Figura Anexo 2. Espectro de RMN 1H de 2 (dtpa2nap) H_3 en D_2O/DSS pD = 10.2 .

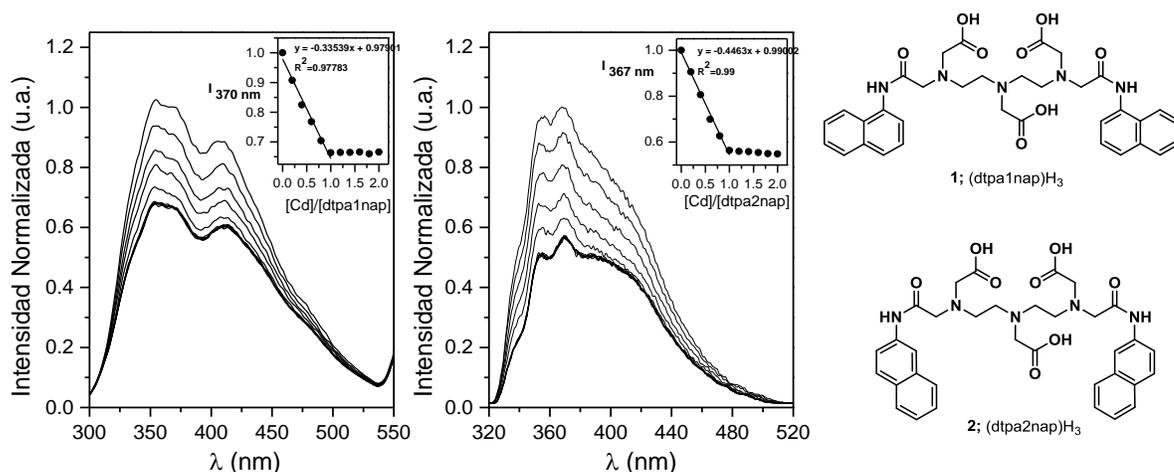


Figura Anexo 3. Espectros de fluorescencia de (dtpa1nap) H_3 (1) (izquierda) y (dtpa2nap) H_3 (2) (derecha) en presencia de Cd^{2+} a diferentes concentraciones $[Cd]_t/[L]_t$ a pH 7.2 en 0.01 M MOPS buffer. $[L]_t = 5 \times 10^{-5}$ M, $\lambda_{exc} = 280$ nm. Recuadros: intensidad del máximo de emisión en función de $[Cd]_t/[L]_t$; la línea sólida representa la regresión lineal.

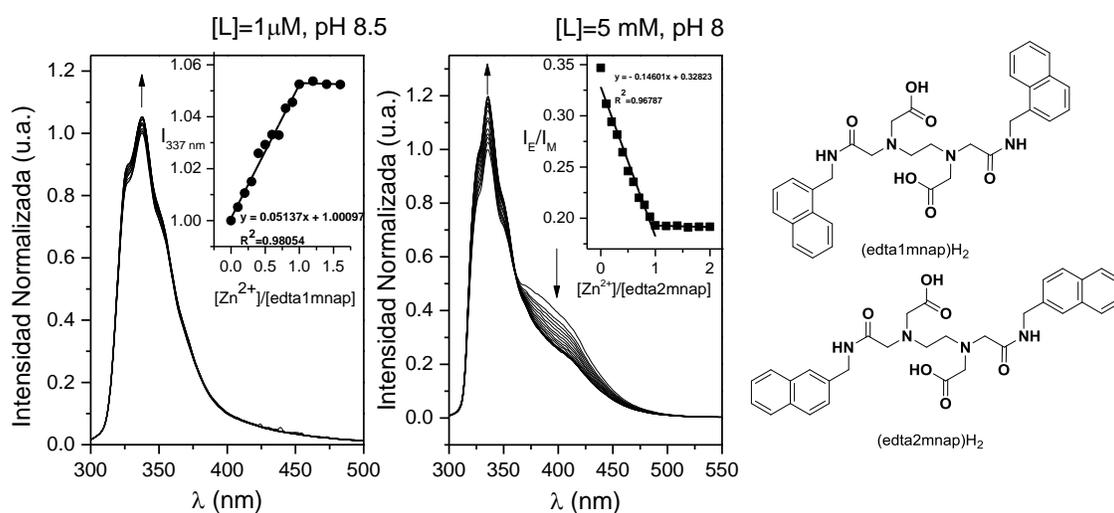


Figura Anexo 4. Espectros de fluorescencia de (edta1mnap) H_2 (izquierda) y (edta2mnap) H_2 (derecha) en presencia de Zn^{2+} a diferentes concentraciones $[Zn^{2+}]/[L]_t$ a pH 8.5 y 8.0 respectivamente en 0.01 M TRIS buffer. $[L]_t = 5 \times 10^{-5}$ M y $[L]_t = 1 \times 10^{-6}$ M, $\lambda_{exc} = 280$ nm. Recuadro izquierdo: intensidad del máximo de emisión en función de $[Zn^{2+}]/[L]_t$ y Recuadro derecha: relación excímero/monómero en función de $[Zn^{2+}]/[L]_t$; la línea sólida representa la regresión lineal.⁵⁸

Tabla Anexo 1. Estequiometría y constantes logarítmicas condicionales (con desviación estándar en el dígito menos significativo) de los complejos de Cd^{2+} a pH 8.5 (solución reguladora tris 0.01 M) para $(\text{edta1nap})\text{H}_2$ y $(\text{edta2nap})\text{H}_2$ y pH 7.2 (solución reguladora MOPS 0.01 M) para $(\text{dtpa1nap})\text{H}_3$ y $(\text{dtpa2nap})\text{H}_3$: constantes condicionales, $K_{f1}' = [\text{ML}]/[\text{M}][\text{L}']$ para ML.

	Cd^{2+}
$(\text{edta1nap})\text{H}_2$	ML; 5.0 (3)
$(\text{edta2nap})\text{H}_2$	ML; 6.4 (5)
$(\text{dtpa1nap})\text{H}_3$	ML; $\geq 8^\dagger$
$(\text{dtpa2nap})\text{H}_3$	ML; $\geq 8^\dagger$

† Respuesta lineal hasta $[\text{M}]_t/[\text{L}]_t = 1$; $\log K_{f1}'$ está fuera del límite superior que se puede determinar en la titulación.^{58, 60}

9. PRODUCTOS DE ESTE TRABAJO

Artículos:

1. **Moises Vera**, Hisila Santacruz Ortega, Motomichi Inoue & Lorena Machi (2019) Bichromophoric naphthalene derivatives of diethylenetriaminepentaacetate (DTPA): fluorescent response to H^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} , *Supramolecular Chemistry*, 31:5, 336-348, DOI: 10.1080/10610278.2019.1588971

Congresos

1. Derivados acíclicos de DTPA y naftaleno como sensores fluorescentes de metales a pH fisiológico. **Moises Vera Pacheco**, Lorena Machi Lara, Hisila Santacruz Ortega. XXXIX encuentro nacional de la AMIDIQ. Mayo **2018**.
2. Derivados acíclicos de DTPA y naftaleno como sensores fluorescentes de metales bajo condiciones fisiológicas de pH. **Moises Vera Pacheco**, Lorena Machi Lara, Hisila Santacruz Ortega. Encuentro de Química Inorgánica y la Universidad de Sonora. Septiembre **2017**.
3. Nuevos sensores fluorescentes de zinc basados en derivados de DTPA funcionalizados con unidades naftaleno, evaluados en condiciones fisiológicas. **Moises Vera**, Lorena Machi, Hisila Santacruz. XII Coloquio Bienal en ciencia de Materiales. Marzo **2017**.
4. Síntesis y caracterización de ligantes acíclicos derivados de DTPA con unidades naftaleno como sensores fluorescentes de zinc bajo condiciones fisiológicas de pH, **Moises Vera**, Lorena Machi, Hisila Santacruz. III Simposio Mexicano de Química Supramolelcular. Octubre **2016**.
5. Síntesis de ligantes derivados de DTPA con unidades Naftaleno como sensores de zinc bajo condiciones fisiológicas. **Vera M**, Machi L, XI Coloquio Bienal en ciencia de Materiales. Marzo **2015**.