



COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

Universidad
de Alcalá

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2018/19

DOCTORANDO: **FUEYO GONZÁLEZ, FRANCISCO JOSÉ**

D.N.I./PASAPORTE: ****7729X

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D424-QUÍMICA MÉDICA**

DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: **QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA INORGÁNICA**

TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

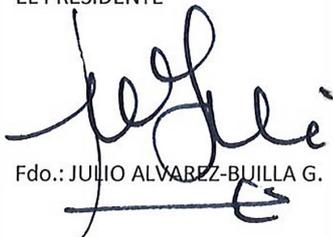
En el día de hoy 26/03/19, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **M^a ROSARIO HERRANZ HERRANZ // JUAN ANTONIO GONZÁLEZ VERA.**

Sobre el siguiente tema: *NUEVOS FLUORÓFOROS CON APLICACIÓN EN EL DESARROLLO DE BIOSENSORES FLUORESCENTES DE PROTEÍNAS*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL¹ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares 26 de Marzo de 2019

EL PRESIDENTE



Fdo.: JULIO ALVAREZ-BUILLA G.

EL SECRETARIO



Fdo.: DIONISIA SANZ DEL CASTILLO

EL VOCAL

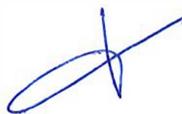


Fdo.: ANGEL ORTE GUTIERREZ

Con fecha 24 de abril de 2019 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"
- No conceder la Mención de "Cum Laude"

FIRMA DEL ALUMNO,



Fdo.: FUEYO GONZÁLEZ, FRANCISCO JOSÉ

La Secretaria de la Comisión Delegada



¹ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:



Universidad
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 24 de abril, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *FUEYO GONZÁLEZ, FRANCISCO JOSÉ*, el día 26 de marzo de 2019, titulada *NUEVOS FLUORÓFOROS CON APLICACIÓN EN EL DESARROLLO DE BIOSENSORES FLUORESCENTES DE PROTEÍNAS*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 24 de abril de 2019

EL VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA



F. Javier de la Mata

F. Javier de la Mata de la Mata

Copia por e-mail a:

Doctorando: FUEYO GONZÁLEZ, FRANCISCO JOSÉ

Secretario del Tribunal: DIONISIA SANZ DEL CASTILLO

Directores de Tesis: M^a ROSARIO HERRANZ HERRANZ // JUAN ANTONIO GONZÁLEZ VERA



Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: soporte electrónico impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: _____ se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20 _____



Fdo. El Funcionario



Programa de Doctorado en Química Médica

NUEVOS FLUORÓFOROS CON APLICACIÓN EN EL DESARROLLO DE BIONSENSORES FLUORESCENTES DE PROTEÍNAS

Tesis Doctoral presentada por
Francisco José Fueyo González

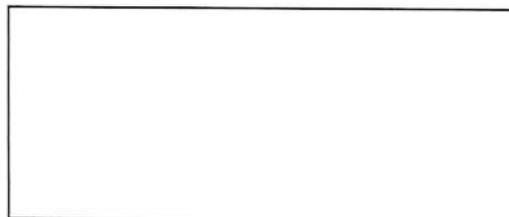
Director/a: Dra. M^a del Rosario Herranz Herranz / Dr. Juan Antonio González Vera

Alcalá de Henares, 2018



Universidad
de Alcalá

Prof. Julio Alvarez-Builla G.
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E
INORGÁNICA
Universidad de Alcalá. Campus Universitario
28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Telf.: (91) 885 46 06
Fax.: (91) 885 46 86
julio.alvarez@uah.es



Alcalá de Henares, 17 de diciembre de 2018

JULIO ALVAREZ-BUILLA G., Catedrático emérito de Química Orgánica de la
Universidad de Alcalá

CERTIFICA: Que el trabajo recogido en la presente memoria titulada: nuevos fluoróforos con aplicación en el desarrollo de biosensores fluorescentes de proteínas”, ha sido realizado por D. FRANCISCO FUEYO GONZALEZ en el Instituto de Química Médica del CSIC, dentro del programa de Doctorado de Química Médica de la UAH, y como Coordinador del Programa de Doctorado, autorizo su presentación y defensa para la obtención del Título de Doctor.

Para que conste, firmo el presente certificado en Alcalá de Henares, a 14 de Diciembre de 2018.

Julio Alvarez-Builla



Instituto de Química Médica (IQM)

M^o DEL ROSARIO HERRANZ HERRANZ, doctora en Ciencias Químicas,
Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA: **Que el trabajo recogido en la presente memoria titulada: “Nuevos fluoróforos con aplicación en el desarrollo de biosensores fluorescentes de proteínas” ha sido realizado, bajo su dirección, por D. FRANCISCO JOSÉ FUEYO GONZÁLEZ** en el Instituto de Química Médica del CSIC y autoriza su presentación para ser calificada como Tesis Doctoral.

Para que conste, firmo el presente certificado en Madrid a catorce de diciembre de 2018.

Fdo.: M^o del Rosario Herranz

C/ Juan de la Cierva nº 3
28006 MADRID
Tel. +34-91 5622900
Telefax +34-91 5644853

CSV : GEN-4583-2536-53ae-5d14-f19c-3010-e99c-3834

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN : <https://portafirmas.redsara.es>

FIRMANTE(1) : M.ROSARIO HERRANZ HERRANZ | FECHA : 14/12/2018 13:05 | NOTAS : F





UNIVERSIDAD DE GRANADA

Dr. Juan Antonio González Vera
Departamento de Físicoquímica. Facultad de Farmacia
Universidad de Granada
Cartuja Campus. 18071 Granada
teléfono: +34 958 243 826
E-mail: gonzalezvera@ugr.es

14 de diciembre de 2018

JUAN ANTONIO GONZÁLEZ VERA, doctor en Farmacia, Profesor Ayudante Doctor de la Universidad de Granada,

CERTIFICA: Que el trabajo incluido en la presente memoria titulada: *Nuevos fluoróforos con aplicación en el desarrollo de biosensores fluorescentes de proteínas* ha sido realizado, bajo su codirección, por D. FRANCISCO JOSÉ FUEYO GONZÁLEZ en el Instituto de Química Médica del CSIC y autoriza su presentación para ser calificada como Tesis Doctoral.

Para que conste, firmo el presente certificado en Granada a catorce de diciembre de 2018.

Dr. Juan Antonio González Vera
Departamento de Físicoquímica. Facultad de Farmacia
Universidad de Granada
Cartuja Campus. 18071 Granada
teléfono: +34 958 243 826
E-mail: gonzalezvera@ugr.es

Dr. Juan Antonio González Vera – Dept de Físicoquímica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada | Tel. +34 958 243 826 | gonzalezvera@ugr.es

Firmado por: JUAN ANTONIO GONZÁLEZ VERA 

Sello de tiempo: 14/12/2018 16:31:03 Página: 1 / 1



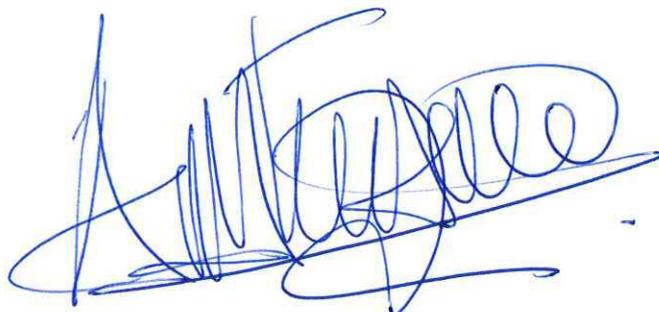
Gsd5c8ocqij4X5fJXdoqpX5CKCJ3NmbA

La integridad de este documento se puede verificar en la dirección <https://sede.ugr.es/verifirma/pfinicio.jsp> introduciendo el código de verificación que aparece debajo del código de barras.

ANA MARÍA CUADRO PALACIOS, Catedrático de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA: Que el trabajo recogido en la presente memoria titulada: “*Nuevos fluoróforos con aplicación en el desarrollo de biosensores fluorescentes de proteínas*” ha sido realizado, por D. FRANCISCO JOSÉ FUEYO GONZÁLEZ en el Instituto de Química Médica del CSIC, dentro del Programa de Doctorado de Química Médica de la UAH, y como Tutora de dicho trabajo autoriza su presentación y defensa para la obtención del Título de Doctor.

Para que conste, firmo el presente certificado en Alcalá de Henares, a 14 de Diciembre 2018.



Fdo.: Ana M. Cuadro

Madrid 18 de Diciembre de 2018

Durante los años que ha durado el trabajo de mi tesis doctoral, he vivido muchas situaciones y conocido a una gran cantidad de gente. El conjunto de todas esas cosas me ha hecho cambiar y madurar, así como mejorar en gran cantidad de campos de mi vida. Por ello, me gustaría agradecer:

La financiación del Ministerio de Economía y Competitividad a los proyectos “*Búsqueda de moduladores de interacciones proteína-proteína. Nuevas vías hacia fármacos novedosos*” (SAF2012-32209) y “*Herramientas para el estudio de interacciones proteína-proteína: Aplicación al estudio y validación de la proteína DREAM como diana terapéutica*” (BFU2015-67284-R), sin cuya financiación no habrían sido posibles los contratos laborales asociados a proyecto que han posibilitado la realización de esta tesis.

Al Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQM-CSIC), centro donde se ha realizado la tesis, y a sus sucesivas Directoras la Dra. M^a Jesús Pérez Pérez y la Dra. Ana Castro Morera por su acogida y ayuda en todo momento.

A los directores de esta tesis doctoral: En primer lugar, a la Dra. M^a del Rosario Herranz Herranz, por la increíble paciencia, cariño y esfuerzo que me ha demostrado, te estaré eternamente agradecido. En segundo lugar, y no menos importante, al Dr. Juan Antonio González Vera por ser mi maestro en este maravilloso campo de la luminiscencia, explicándome siempre las cosas con pasión lo que ha hecho que, además de ser mi maestro, sea un buen amigo.

A todos los miembros del grupo de investigación Peptidomiméticos en el que se ha realizado la tesis, particularmente, a las Dras Marta Gutiérrez, Rosario González Muñiz, Mercedes Martín y M^a Jesús Pérez de Vega.

Al personal de Gerencia del IQM, por su ayuda con todos los pesados papeleos y por su eficaz labor administrativa. Al personal del laboratorio de Análisis Instrumental del IQM por su buen hacer y eficacia y a Javier Renau, informático del IQM.

A todo el personal del IQM que siempre me han tratado con cariño y amabilidad.

Al personal de los servicios técnicos del Centro de Química Orgánica Manuel Lora Tamayo, en especial a los servicios de RMN, espectrometría de masas, microanálisis y biblioteca, que con su buen hacer han colaborado en diferentes

aspectos de esta Tesis. Particularmente, a la Dra. M^a Luisa Jimeno, Jefa del servicio de RMN.

A los grupos de investigación sin cuya colaboración no habría sido posible la realización de la tesis: El Dr. Ibon Alcorta del IQM; la Dra. May C. Morris del Institut des Biomolécules Max Mousseron, (IBMM) de Montpellier en Francia; la Dra. Lourdes Infantes del Instituto de Química Física Rocasolano (IQFR-CSIC); el Dr. Ángel Orte en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada; la Dra. Mar Fernández Gutiérrez del grupo de Biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polimeros del CSIC (ICTP-CSIC) y la Dra. Cristina Vicent del Instituto de Química Orgánica General (IQOG-CSIC).

A la Universidad de Alcalá de Henares, en especial a la Dra. Ana Cuadro y al Dr. Julio Alvarez-Builla, por su ayuda en la tramitación y las gestiones administrativas de la tesis.

Al Dr. Christophe Dardonville, con el que empecé mis primeros pasos en el mundo de la investigación, por su ayuda y orientación hacia esta tesis.

A mi gran amigo el Dr. Enrique Man, porque posiblemente nunca haya conocido a alguien más polímata, que me ha hecho crecer no solo en cultura general, sino también en la amistad.

A mis colegas los Drs. Felipe Reviriego, Paco Sanchez, José Cumella y Peter por la amistad que nos une.

Al amor de mi vida, Barbara Fernández López, con la que espero estar el resto de mi vida y a su familia, Mariano, Ana y Urri por el amor que me han dado.

A mis amigos desde la infancia porque mi vida no habría sido la misma sin vosotros.

Y finalmente, aunque no por ello menos importante, por supuesto a toda mi familia, mis padres, mi hermana, Ally, mis tias Lel y Marián que siempre han estado ahí, dándome todo su cariño, aunque yo no siempre haya estado a la altura, os quiero. A toda la familia Fueyo porque sin duda somos únicos.

A mi tío fallecido Jose Lada por enseñarme las curiosidades de la ciencia, lo que me hizo descubrir un mundo lleno de preguntas y a partir del cual ha guiado mi vida.

Por todo ello, y mucho más, muchas gracias.

*Algunas personas escuchan sus propias voces interiores
con gran claridad y actúan según lo que oyen.
Esas personas se vuelven locas o se convierten en leyendas.....*

Jim Harrison

ÍNDICE

NOTA SOBRE NOMENCLATURA.....	xxi
NOTA SOBRE PUNTUACIÓN Y ABREVIATURAS	xxi
ABREVIATURAS.....	xxii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES	3
1.1.1. Biosensores	3
1.1.2. Biosensores fluorescentes.....	4
1.1.3. Introducción a la fluorescencia	8
1.1.4. Propiedades fotofísicas de los fluoróforos.....	12
1.1.5. Fluoróforos más comunes	14
1.1.6. 1,8-Naftalimidias	19
1.1.7. Quinolinas	24
1.1.8. Antenas de lantánidos	27
1.2. ANTECEDENTES INMEDIATOS	35
1.3. HIPÓTESIS DE DISEÑO DE QUINOLIMIDAS Y ANTENAS	
DE LANTÁNIDOS	37
1.4. OBJETIVOS GENERALES	39
1.5. PLAN DE TRABAJO	40

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
2.1. NUEVOS FLUORÓFOROS SOLVATOCRÓMICOS DERIVADOS	
DE QUINOLIMIDA	45
2.1.1. Derivados de 9-metoxiquinolimidias	45
2.1.1.1. Síntesis.....	45
2.1.1.2. Síntesis de 3-ciano-quinolimidias.....	52
2.1.1.3. Síntesis de 9-hidroxi-quinolimidias análogas de Sox.....	55
2.1.1.4. Propiedades fotofísicas.....	56
2.1.1.5. Propiedades fotofísicas. Sensibilidad al pH.....	65
2.1.1.6. Cálculos TD-DFT de las propiedades fotofísicas.....	68
2.1.1.7. Solubilidad en H ₂ O.....	70
2.1.1.8. Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas.....	71
2.1.1.9. Síntesis de reactivos para el marcaje fluorescente de péptidos y proteínas.....	71
2.1.1.10. 9-Metoxi-quinolimidias en sensores de quinasas dependientes de ciclinas.....	75
2.1.1.10.1. Estudio <i>In Vitro</i> de la interacción CDK5/p25.....	78
2.1.1.10.2. Estudio <i>in cellulo</i> de la Interacción CDK5/p25.....	80
2.1.1.11. Conclusiones.....	81
2.1.2. Derivados de 9-aminoquinolimidias	82
2.1.2.1. Síntesis.....	83
2.1.2.2. Propiedades fotofísicas.....	85
2.1.2.3. RMN dinámica.....	92

2.1.2.4.	Análisis de difracción de rayos X.....	94
2.1.2.5.	Cálculos TD-DFT.....	96
2.1.2.6.	Citotoxicidad en líneas celulares de cánceres humanos	98
2.1.2.7.	Estudios de la agregación del péptido β -amiloide.....	98
2.1.2.8.	Síntesis de bromometil-acetamidas derivadas de 9-amino- quinolimidias como reactivos de marcaje fluorescente de péptidos	104
2.1.2.9.	Sensores <i>in vitro</i> de la interacción CDK5/p25.....	105
2.1.2.10.	Visualización <i>in cellulo</i> de la interacción CDK5/p25.....	107
2.1.2.11.	Conclusiones	109
2.1.3.	Fluoróforos PET derivados de naftalimida y quinolimida	111
2.1.3.1.	Síntesis.....	113
2.1.3.2.	Propiedades fotofísicas	113
2.1.3.3.	Cálculos TD-DFT.....	119
2.1.3.4.	Análisis de difracción de rayos X.....	123
2.1.3.5.	Estudio de RMN de la naftalimida 157	123
2.1.3.6.	Sensores de H ₂ O.....	125
2.1.3.7.	Sensibilidad al pH	127
2.1.3.8.	Exploración estructural para mejora de los fluoróforos	128
2.1.3.8.1.	Síntesis.....	129
2.1.3.8.2.	Propiedades fotofísicas	130
2.1.3.9.	Citotoxicidad en líneas celulares de cánceres humanos	134
2.1.3.10.	Sondas para visualización celular	135

2.1.3.11.	Interacción con ADN.....	140
2.1.3.11.1.	Interacción de la naftalimida 165 con ADN	140
2.1.3.11.2.	Interacción de la quinolimida 167 con ADN	142
2.1.3.12.	Conclusiones	144
2.2.	ANTENAS DE LANTÁNIDOS	145
2.2.1.	Propiedades fotofísicas de (8-metoxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclo- penta-[de]quinolin-3-il)-fosfonatos y –carboxilatos	146
2.2.2.	Diseño y síntesis de derivados de carbostirilo	156
2.2.3.	Propiedades fotofísicas de los derivados de carbostirilo	158
2.2.4.	Antenas de lantánidos sensores de H ₂ O.....	162
2.2.5.	Antenas de lantánidos sensores de tioles	165
2.2.6.	Conclusiones	178
3.	CONCLUSIONES GENERALES	181
4.	PARTE EXPERIMENTAL	187
4.1.	Productos de partida comerciales.....	189
4.2.	Métodos generales	193
4.3.	NUEVOS FLUÓROFOROS SOLVATOCRÓMICOS DERIVADOS DE QUINOLIMIDA	195
4.3.1.	Síntesis de 9-metoxi-quinolimidas	195
4.3.2.	Síntesis de 9-aminoquinolimidas	227
4.3.3.	Fluoróforos pet derivados de naftalimida y quinolimida.....	237
4.3.4.	Antenas de lantánidos.....	245
4.3.4.1.	Síntesis de derivados de carboestirilo	245

4.3.4.2.	Síntesis de derivados de dihidrociclopenta[de]quinolin-3-ona	247
4.4.	MÉTODOS FOTOFÍSICOS	252
4.4.1.	Experimentos de fluorescencia.....	252
4.4.2.	Determinación de rendimientos cuántico de fluorescencia	252
4.4.3.	Ensayos de fotoestabilidad.....	253
4.4.4.	Determinación de tiempos de vida de fluorescencia	253
4.5.	RMN DINÁMICA	255
4.6.	CÁLCULOS SEMIEMPÍRICOS	261
4.6.1.	Barreras rotacionales (estado relajado, vacío)	261
4.6.2.	Momentos dipolares	262
4.7.	EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD	264
4.8.	VALORACIONES DE FLUORESCENCIA DE PÉPTIDOS	
	DERIVADOS DE CDK5	266
4.9.	CULTIVO CELULAR, INTERNALIZACIÓN Y MICROSCOPIA	267
4.10.	ESTUDIOS DE LA AGREGACIÓN DEL PEPTIDO β-AMILOIDE	268
4.10.1.	Valoración espectroscópica del peptido β -amiloides.....	268
4.10.2.	FLIM de doble color.....	269
4.11.	MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM)	271
4.12.	CULTIVO CELULAR Y VISUALIZACIÓN DE FLUORESCENCIA	
	EN MACROFAGOS	272
4.13.	ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON ADN	273
4.13.1.	Estudios de interacción de la naftalimida 165 y la quinolimida 167	
	con ADN.....	273
5.	BIBLIOGRAFÍA	275

NOTA SOBRE NOMENCLATURA

A lo largo de esta Memoria se han utilizado la nomenclatura y simbolismos de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB ("Nomenclature and Symbolism for Aminoacids and Peptides", *Pure & Appl. Chem.* **1994**, *56*, 595-674. <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/iubmb.html#03>).

Los aminoácidos se han nombrado por el sistema de símbolos de una o tres letras y pertenecen a la serie natural L, salvo que se indique lo contrario. Las sustituciones en el grupo α -NH₂ se indican anteponiendo el símbolo aceptado para el sustituyente al símbolo del aminoácido, mientras que las sustituciones en los grupos funcionales de las cadenas laterales se indican entre paréntesis, inmediatamente después del símbolo del aminoácido.

En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina N-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre se denomina C-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo N-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo C-terminal.

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN Y ABREVIATURAS

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de numeración inglesa, en esta Memoria se utiliza este sistema. Así, las cifras decimales se indican con punto en lugar de con coma, habiendo sido aceptado este sistema por la Real Academia Española de la Lengua, como se recoge en el Diccionario Panhispánico de Dudas, desde su primera edición en octubre de 2005.

Hay terminología científico-técnica que frecuentemente se utiliza de forma abreviada, pero para la cual en la versión en español no existe o no se utiliza una abreviatura, en estos casos se ha utilizado la abreviatura inglesa.

ABREVIATURAS

A β : β -Amiloide

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AMC: 7-Amino-4-Metilcumarina

APP: Amyloid Precursor Protein = Proteína Precursora Amiloide

ARN: Ácido Ribonucleico

Boc: *tert*-butyloxycarbonyl = *tert*-butiloxicarbonil

BODIPYs: Boron Difluoride Dipyrromethanes = Difluoro-boro-dipirrometanos

CDKs: Quinasas Dependientes de Ciclinas

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Cy5: Cianina 5

Cy7: Cianina 7

DAPI: 4',6-Diamidino-fenilindol

DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

DC: Dicroismo Circular

DEAD: Azodicarboxilato de dietilo

DIPEA: Diisopropiletilamina

DO3A: 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid = Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclo dodecano-1,4,7-triacético

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium = Medio Eagle modificado de Dubelcco

4-DMN: 4-Dimetilamino-1,8-naftilamida

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTPA: Ácido etilentríaminopentácetico

EDANS: 5-((2-Aminoetil)amino)naftaleno-1-ácido sulfónico

EDTA: Ácido etilendiaminotetrácetico

ET: Energy Transfer = Transferencia de Energía

FITC: Fluoresceína

FLIM: Fluorescence Lifetime Image Microscopy = Imagen de Microscopia de Tiempo de Vida de Fluorescencia

FMN: Flavin MonoNucleotide = Flavín Mono Nucleótido

FRET: Förster Resonance Energy Transfer = Transferencia de Energía de Resonancia de Förster

GFP: Green Fluorescent Protein = Proteína Verde Fluorescente

GGT: γ -Glutamiltanspeptidasa

GI₅₀: Inhibitory Growth 50 % = Inhibición del Crecimiento 50%

GSH: Glutati3n

HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulf3nico

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation = Correlaci3n Heteronuclear de Múltiples Enlaces

HPLC-MS: High-performance liquid chromatography-Mass Spectroscopy = Cromatografía LÍquida de Alto Rendimiento-Espectrometría de Masas

HOBt: Hidroxibenzotriazol

HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital = Orbital Molecular Ocupado de Mayor energÍa

HSQC: Heteronuclear Single-Quantum Correlation = Correlaci3n Heteronuclear de Un Solo Cuanto

5-HT: 5-Hidroxil Triptamina

HTS: High Throughput Screening = Cribado de Alto Rendimiento

ICT: Intramolecular Charge Transfer = Transferencia de Carga Intramolecular

IQFR: Instituto de Química Física Rocasolano

IQM: Instituto de Química Médica

ISC: Intersystem Crossing = Cruzamiento Intersistemas

LC₅₀: Lethal Concentration 50% = Concentración Letal 50%

LE: Locally Excited = Localmente Excitado

LOD: Limit Of Detection = Limite De Detección

LUMO: Lowest Unoccupied Molecular Orbital = Orbital Molecular Desocupado de Mínima energía

MIT. Massachusetts Institute of Technology = Instituto Tecnológico de Massachusetts

MLE: Maximum Likelihood Estimation = Estimación de máxima similitud

MRI: Magnetic Resonance Image = Imagen de Resonancia Magnética

MW: Microondas

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen = Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NAT: *N*-Acetiltransferasa

NBD: Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole = Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol

NCI: National Cancer Institute = Instituto Nacional del Cancer

NOE: Nuclear Overhauser Effect = Efecto Nuclear Overhauser

PBS: Phosphate-buffered saline = Tampón Fosfato Salino

PET: Photoinduced Electron Transfer = Transferencia de Electrones Fotoinducida

PET: Positron Emission Tomography = Tomografía de Emisión de Positrones

PICT: Planar Intramolecular Charge Transfer = Transferencia Intramolecular Planar de Carga

P.f. : Punto de fusión

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

SNC: Sistema Nervioso Central

SPECT: Single-Photon Emission Computed Tomography =Tomografía Computerizada
de Emisión de un Solo Fotón

SPT: Single Photon Synchronization = Sincronización de un Solo Fotón

TAC: Tomografía Axial Computerizada

TD-DFT: Time-Dependent Density Functional Theory = Teoría Funcional de la Densidad
Dependiente del Tiempo

TEM: Transmission Electron Microscopy = Microscopía de Transmisión Electrónica

TFA: Ácido Trifluoro Acético

TGI: Total Growth Inhibition = Inhibición Total del Crecimiento

THF: Tetrahidrofurano

TICT: Twisted Intramolecular Charge Transfer = Transferencia intramolecular de carga
con torsión

TS: Estado de Transición

TSQ: 6-Methoxy-8-*p*-Toluenesulfonamido-Quinoline = 6-Metoxi-8-*p*-Toluensulfonamido-
Quinolina

UV: Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Biosensores

Conocer la estructura y propiedades funcionales de las células, órganos y organismos vivos representa un reto en la biología y medicina modernas, que inspira el desarrollo de técnicas analíticas y de visualización ingeniosas e innovadoras, en las que el uso de biosensores ocupa un lugar destacado.

La definición más aceptada de biosensor es “un dispositivo analítico que incorpora un elemento biológicamente activo, bio-receptor o unidad de reconocimiento, y un traductor físico apropiado, para generar una señal proporcional a la concentración de especies químicas en cualquier tipo de muestra”¹. El desarrollo del primer biosensor de glucosa por Clark y Lyons² en 1962 marca el arranque en la investigación en este campo. Desde entonces, los biosensores han sido ampliamente estudiados y extensivamente utilizados en diversas aplicaciones, que van desde los campos de la salud y el medio ambiente a los de la seguridad y la defensa, pasando por la agricultura y la seguridad y control de la calidad de los alimentos. En la actualidad ésta es un área de investigación multidisciplinar donde confluyen principios de ciencias básicas (física, química y biología) y de ciencias aplicadas (micro/nano-tecnología, electrónica y medicina).

Los biosensores se clasifican según el mecanismo biológico de señalización o según el tipo de traducción de señal que emplean. En cuanto a la transmisión de la

señal, la mayoría de los biosensores se agrupan en tres tipos: electroquímicos, ópticos y acústicos.

En los biosensores ópticos la traducción de la señalización se produce a través de la luz y las técnicas de detección son diversas según la espectroscopia utilizada, tales como: absorción, fluorescencia, fosforescencia, Raman, refracción y dispersión. Además, estos métodos permiten medir diversas propiedades de la luz, tales como la energía, la intensidad, la polarización, el tiempo de caída y/o la fase, que pueden modificarse en respuesta a una señalización biológica. Estos métodos tienen la ventaja de su rapidez de respuesta y de permitir la detección de varios análisis, pues las muestras pueden ser interrogadas simultáneamente con varias longitudes de onda sin interferencias entre ellas³. En este grupo, los biosensores fluorescentes se encuentran entre los más utilizados debido a su selectividad, sensibilidad y versatilidad, pudiéndose utilizar incluso en aplicaciones in vivo⁴. Esta técnica implica la excitación de las biomoléculas, mediante irradiación con luz UV/visible, seguida de relajación a su estado fundamental, mediante emisión de gran parte de la energía absorbida en forma de luz. Las biomoléculas pueden ser excitadas repetidamente, produciendo una señal brillante, que puede ser detectada y medida, incluso a nivel de una sola célula^{1,5} y de una sola molécula⁶.

1.1.2. Biosensores fluorescentes

El desarrollo de biosensores fluorescentes ha estado impulsado fundamentalmente por el deseo de eliminar los trazadores o biosensores radiactivos, altamente costosos y difíciles de desechar. Además, con respecto a los agentes de contraste más convencionales utilizados en las técnicas de imagen (TAC, MRI, etc...), que emiten señales continuamente y, por lo tanto, con alto ruido de fondo, los sensores fluorescentes se pueden diseñar para que la emisión de luz se produzca solo cuando se produce la interacción con la diana que se quiere observar⁴. Esta característica da lugar a la alta sensibilidad y especificidad de estos biosensores.

Los biosensores fluorescentes son capaces de detectar biomoléculas en su ambiente nativo y de monitorizar procesos dinámicos en muestras biológicas complejas. Estos biosensores responden a la presencia, actividad o conformación de la diana a través de cambios sensibles en la fluorescencia de uno o varios fluoróforos acoplados a

un receptor de la diana de interés (generalmente un sustrato o el dominio de una proteína) (Figura 1). El sensor puede ser una proteína codificada genéticamente, fusionada con una proteína autofluorescente, o un péptido o proteína conjugada con un pequeño fluoróforo sintético, que señalizan a través de cambios en la localización celular o cambios en sus propiedades espectrales (intensidad de fluorescencia, tiempo de vida, longitudes de onda de excitación y de emisión, etc...). Los biosensores fluorescentes proporcionan información, tanto *in vitro* como en células vivas (*in cellulo*) e *in vivo*, con alta resolución espacial y temporal, permitiendo la monitorización de forma continua reversible y no invasiva de cambios dinámicos en el espacio y en el tiempo^{7, 8}.

La emisión de luz presenta la ventaja de una mayor sensibilidad con respecto a la absorción (sensores colorimétricos), debido a que la absorción se mide como la diferencia de intensidad de la luz a través de la muestra con respecto a una referencia, mientras que, en la emisión la intensidad de la luz emitida se mide directamente, sin comparación con una referencia.

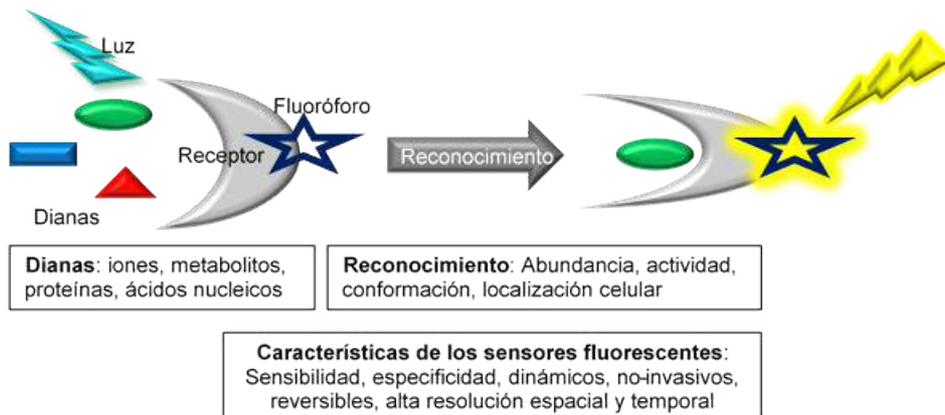


Figura 1. Esquema general de los biosensores fluorescentes

Hay cuatro tipos de detección de procesos biológicos mediante fluorescencia. El primero consiste en la detección directa de una biomolécula de interés, aprovechando la presencia de fluoróforos endógenos, también conocidos como intrínsecos, en dichas

biomoléculas (Figura 2). Este es el caso de los aminoácidos aromáticos de las proteínas, fundamentalmente del anillo de indol del triptófano, que absorbe a 280 nm y emite a 340 nm⁹. La emisión del triptófano es altamente sensible a su entorno local. Por ello, ha sido muy utilizada para el estudio de cambios conformacionales de proteínas. Sin embargo, tiene el inconveniente de que en la zona de su emisión hay alto ruido de fondo debido al solapamiento con la autofluorescencia de tejidos y muestras biológicas, por lo que la relación señal/ruido es baja y poco sensible. Además, gran parte de las biomoléculas no son fluorescentes, como por ejemplo los ácidos nucleicos o los lípidos, o su fluorescencia no es la adecuada para experimentación con buena sensibilidad, como ya se ha comentado para las proteínas. En estos casos se realiza una detección indirecta mediante el marcaje de las moléculas de interés con fluoróforos adecuados (Figura 2b).

En proteínas este marcaje puede realizarse mediante codificación genética, fusionándolas con una proteína autofluorescente, como la proteína verde fluorescente (GFP)¹⁰⁻¹². Estos biosensores genéticamente codificados tienen el inconveniente de que requieren largo tiempo para su expresión ectópica¹³.

En los biosensores no genéticos el marcaje se realiza en proteínas o péptidos, mediante el acoplamiento sintético de un fluoróforo, denominado en este caso extrínseco, con propiedades fotofísicas adecuadas y en una posición apropiada¹².

El tercer tipo de detección de fluorescencia es mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET, Figura 2c). Este proceso se produce cuando el espectro de emisión de un fluoróforo, denominado dador, solapa con el espectro de absorción de otro fluoróforo, denominado aceptor. En este caso se produce una transferencia de energía del dador al aceptor, mediante interacción dipolo-dipolo. El dador y el aceptor pueden estar localizados en la misma molécula o en moléculas diferentes, la transferencia de energía es a través del espacio. Esta transferencia de energía depende del solapamiento entre los respectivos espectros de emisión y absorción, y es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre ambos fluoróforos. Esta distancia debe estar en el rango de la conocida como distancia de Förster (15-60 Å)⁹. La dependencia de FRET con la distancia entre fluoróforos se ha utilizado mucho para la determinación de distancias moleculares y distancias entre diferentes biomoléculas.

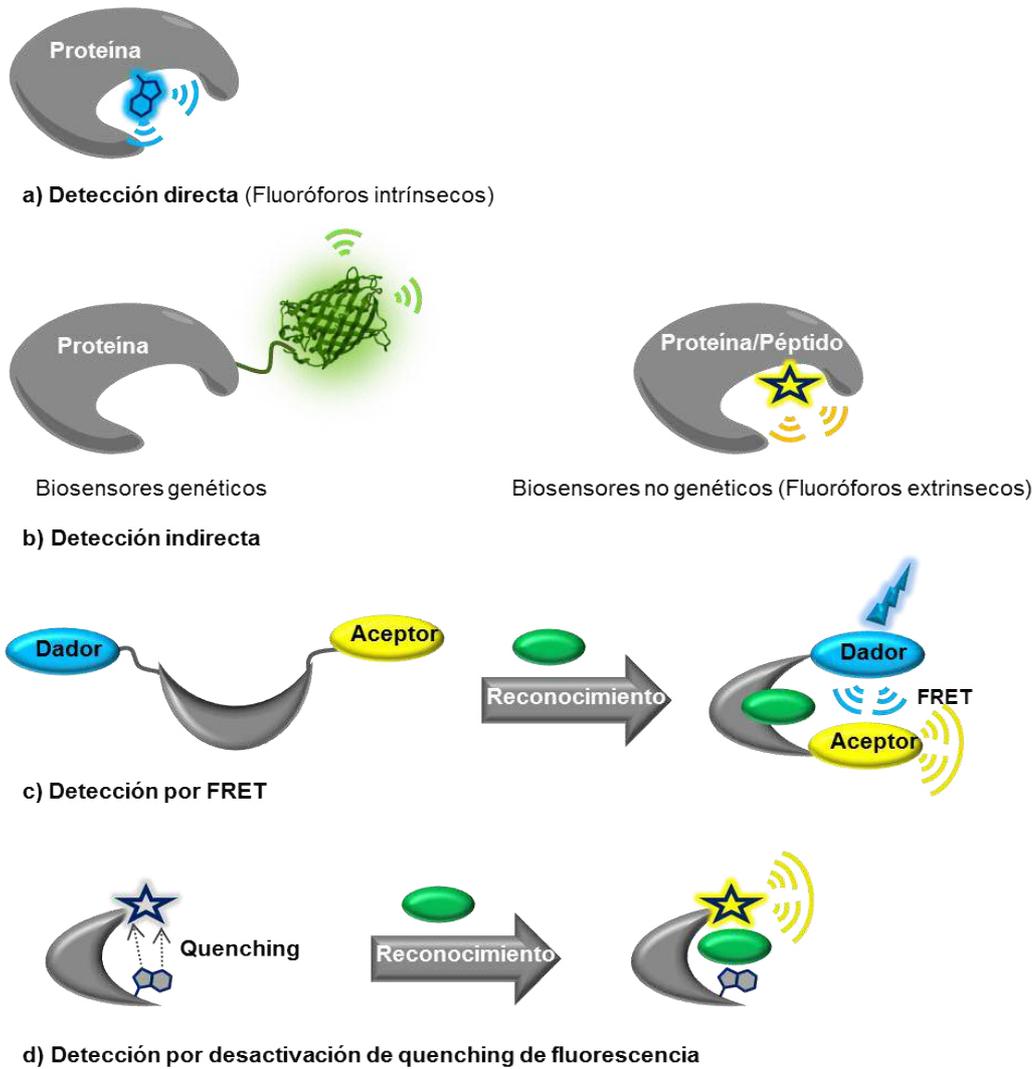


Figura 2. Tipos de detección de biosensores de fluorescencia

El cuarto tipo de detección de fluorescencia está basado en la capacidad de ciertos grupos o moléculas para desactivar o inhibir la fluorescencia de fluoróforos, conocida por el término inglés de “quenching”⁹ (Figura 2d). En inglés estos grupos desactivadores de fluorescencia se denominan “quenchers”, en esta memoria este término se ha adaptado

como “quencheadores”. La desactivación puede tener lugar por diversos procesos, tales como por colisión molecular, o por interacción π - π en el caso de grupos aromáticos. Este es uno de los mecanismos de quenching de fluorescencia más frecuentemente utilizados en el diseño de biosensores y se basa en que la energía absorbida por un fluoróforo, en lugar de ser emitida en forma de luz, es transferida a un grupo aromático situado a una distancia adecuada para interacción π - π . Cuando el reconocimiento entre el biosensor y la biomolécula diana impide esta interacción responsable del quenching, la relajación del fluoróforo tiene lugar mediante emisión de luz y se observa fluorescencia.

1.1.3. Introducción a la fluorescencia

La emisión de luz (fotones) no acompañada de aumento de temperatura se denomina luminiscencia. Cuando esta emisión se produce como consecuencia de una excitación previa por absorción de fotones se denomina fotoluminiscencia¹⁴. Dependiendo de la naturaleza del estado excitado, la fotoluminiscencia se denomina fluorescencia o fosforescencia. En la fluorescencia la emisión de luz tiene lugar desde un estado excitado singlete. En este estado el electrón excitado está apareado (espines opuestos) con el correspondiente electrón en el estado fundamental. Por lo que, el retorno del estado excitado al estado fundamental está permitido y ocurre rápidamente, mediante la emisión de un fotón, con tiempo de vida de la fluorescencia corto (1-10 ns). El conocido diagrama de Jablonski describe bien las transiciones electrónicas producidas por excitación y por relajación (Figura 3). Cuando la emisión de luz tiene lugar desde un estado excitado triplete se denomina fosforescencia. En el estado triplete el electrón excitado tiene la misma orientación de espín que en el estado fundamental. Por lo cual, la transición del estado excitado al estado fundamental está prohibida y la emisión de luz es lenta con valores de vida comprendidos entre milisegundos y segundos.

La distinción entre fluorescencia y fosforescencia no siempre es clara, pues hay materiales, como los complejos orgánicos de metales de transición, que muestran un comportamiento mixto singlete-triplete, con tiempos de vida del orden de los submicrosegundos a microsegundos⁹.

Las moléculas que absorben y emiten luz se denominan fluoróforos y, generalmente, suelen ser compuestos aromáticos o ciclos con múltiples enlaces π , o

complejos de metales de transición. Como se muestra en la Figura 3, la absorción de un fotón excita el fluoróforo del estado fundamental singlete S_0 a alguno de los estados excitados singletes S_1 o S_2 de mayor energía. En cada uno de estos estados electrónicos puede haber varios niveles de energía vibracional.

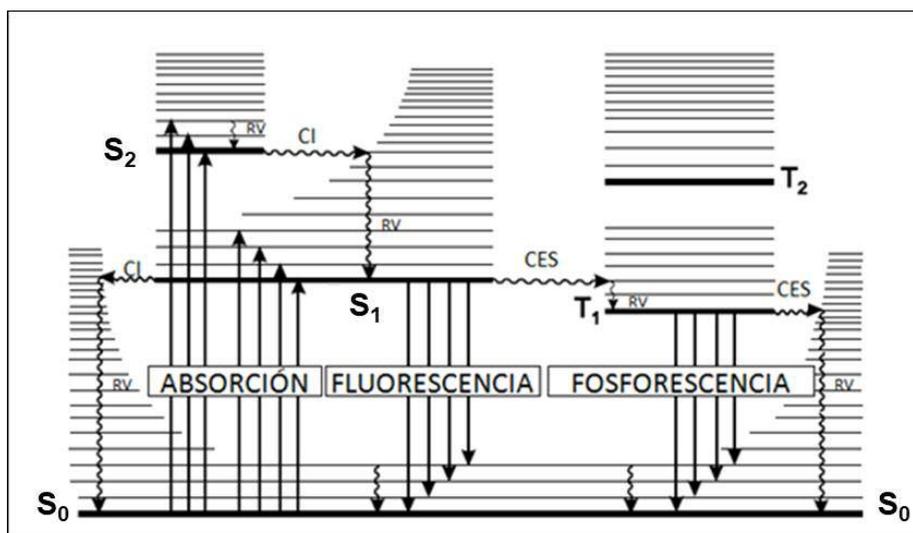


Figura 3. Representación de los niveles energéticos del estado fundamental y de los estados excitados tomada de la referencia 14. S_0 : estado fundamental tipo singlete; S_1 y S_2 : estados excitados tipo singlete; T_1 y T_2 : estados excitados tipo triplete; CI: conversión interna; CES: cruzamiento entre sistemas; RV: relajación vibracional.

La relajación del estado excitado al estado fundamental puede tener lugar a través de diversos procesos:

a) Relajación vibracional, generalmente, la excitación lleva a la molécula a los niveles vibracionales superiores de los estados electrónicos S_1 o S_2 , que rápidamente se relajan al nivel vibracional mínimo del correspondiente estado electrónico.

b) Conversión interna, es una transición no radiativa entre estados electrónicos de la misma multiplicidad de espín ($S_2 \rightarrow S_1$, $S_1 \rightarrow S_0$).

c) Fluorescencia, es la emisión de fotones que acompaña a la relajación $S_1 \rightarrow S_0$. Salvo pequeñas excepciones, la fluorescencia tiene lugar desde el estado S_1 , por lo cual, sus características son independientes de la longitud de onda de excitación¹⁴.

d) Cruzamiento entre sistemas, es una transición entre niveles vibracionales isoenergéticos pertenecientes a estados electrónicos de multiplicidad diferente, por ejemplo $S_1 \rightarrow T_1$. La posterior relajación vibracional lleva el sistema al mínimo nivel vibracional del estado T_1 .

e) Fosforescencia.- En disolución y temperatura ambiente la desexcitación no radiativa desde el estado triplete predomina sobre la desexcitación radiativa. De hecho la transición $T_1 \rightarrow S_0$, como ya se dijo, está prohibida y es muy lenta. Durante este lento proceso las colisiones con el disolvente favorecen tanto el cruzamiento entre sistemas como la relajación vibracional en S_0 . Sin embargo, a temperatura baja o en estado sólido se puede observar fosforescencia. El espectro de emisión de fosforescencia se localiza a longitudes de onda mayores que el de la fluorescencia, pues la energía del estado triplete es menor que la del estado singlete.

La estructura del fluoróforo es determinante tanto de su excitación por absorción de luz como de su posterior relajación. Como ya se ha indicado, la mayoría de los fluoróforos son compuestos aromáticos en los que el aumento de electrones π en el sistema conduce a desplazamientos tanto del espectro de absorción como del de emisión hacia longitudes de onda mayores. La presencia en el fluoróforo de sustituyentes dadores y aceptores de electrones, y de heteroátomos en el sistema π , determinan de forma importante sus propiedades fluorescentes. En la excitación, las transiciones electrónicas van acompañadas de cambios en el momento dipolar de la molécula, que, generalmente, aumenta⁹. Este aumento es importante cuando el fluoróforo posee grupos dadores y aceptores de electrones conjugados, produciéndose separación de cargas, denominado estado de transferencia de carga intramolecular (ICT). En estos fluoróforos este estado excitado es el de menor energía en disolventes polares, mientras que, en disolventes apolares el estado sin separación de cargas, denominado excitado localmente (LE), es el de menor energía^{9, 14}. Por ello, la fluorescencia de fluoróforos portadores de grupos dadores y aceptores de electrones varía mucho con la polaridad del disolvente, mostrando comportamiento solvatocrómico¹⁵⁻¹⁸.

En ciertos fluoróforos portadores de grupos con pares de electrones libres, no directamente unidos al esqueleto aromático responsable de la fluorescencia, la excitación puede fotoinducir transferencia electrónica intramolecular, a través del espacio

(no a través de enlaces covalentes), que quenchee o impida la fluorescencia (Figura 4). En estos fluoróforos, el receptor del analito es un grupo dador de electrones (D) y el fluoróforo es aceptor de electrones. La excitación del fluoróforo induce el movimiento de un electrón del último orbital ocupado HOMO al primer orbital vacío LUMO. Esta transferencia electrónica posibilita la transferencia de un electrón del orbital HOMO del receptor (dador) al orbital semiocupado HOMO del fluoróforo (aceptor), quencheando su fluorescencia. Este fenómeno se denomina PET, por las siglas inglesas del proceso. En presencia del analito, la energía del orbital HOMO del receptor disminuye por debajo de la energía HOMO del fluoróforo y no tiene lugar el efecto PET, produciéndose fluorescencia.

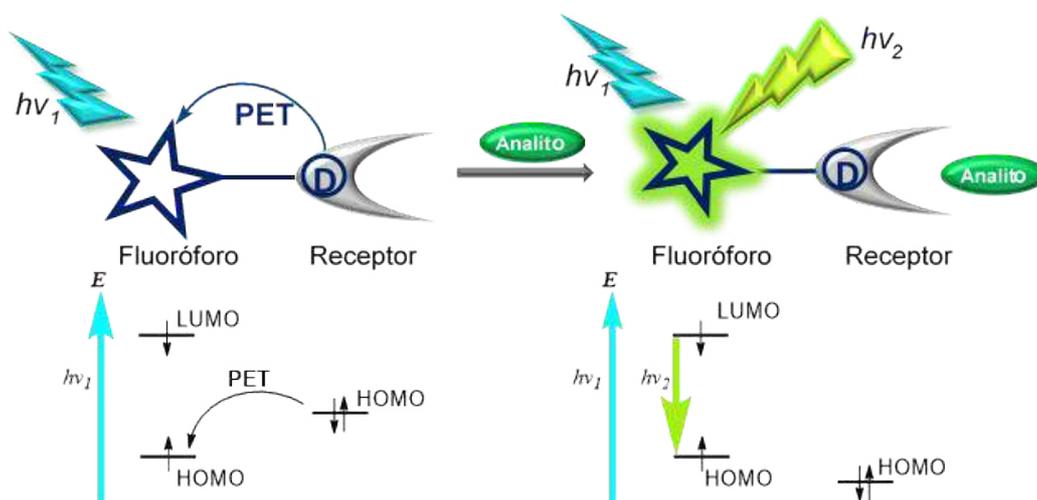


Figura 4. Representación esquemática de fluoróforos PET

Este mecanismo se ha utilizado fundamentalmente en sensores de pH y de cationes, que inhiben este PET, desbloqueando la fluorescencia. El caso más habitual es el PET inducido por aminas, como en el derivado de naftalimida sensor del Zn^{2+} lisosomal indicado en la Figura 5¹⁹.

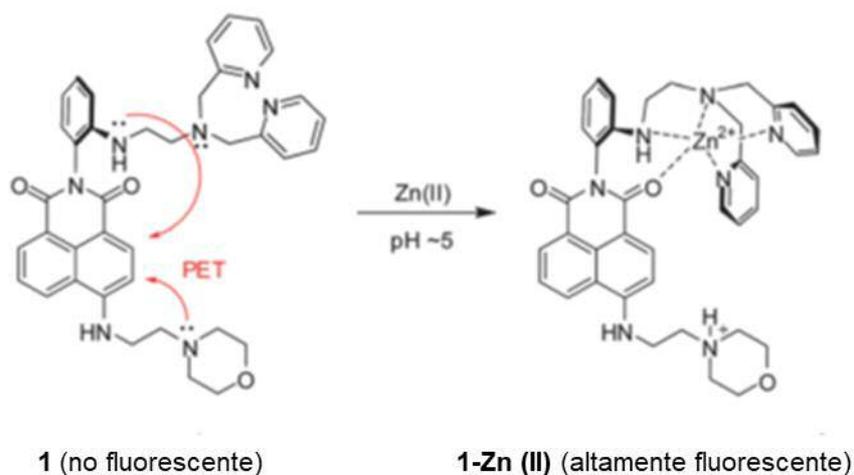


Figura 5. Ejemplo de sensor de Zn^{2+} basado en PET ¹⁹

Las características del microentorno de un fluoróforo, tales como: la polaridad, los enlaces de hidrógeno, el pH, la presión, la viscosidad, la temperatura, la presencia de grupos quencheadores de iones, o de otros fluoróforos, pueden afectar a la emisión del fluoróforo. Esta dependencia de la emisión de fluorescencia del fluoróforo de su microentorno es fundamental para suministrar información espacial y temporal de éste, muy útil en el desarrollo de biosensores.

1.1.4. Propiedades fotofísicas de los fluoróforos

La estructura y el entorno de un fluoróforo determinan una serie de características de su comportamiento, que se indican a continuación y algunas se indican en la Figura 6:

$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$: *Longitud de onda de absorción máxima* en el espectro de absorción. Está relacionada con la diferencia energética entre el estado fundamental (S_0) y un estado excitado (S_1, S_2, \dots).

ϵ : *Coefficiente de extinción molar*. Es la absorbancia de luz de un compuesto a concentración 1 M y se expresa en $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

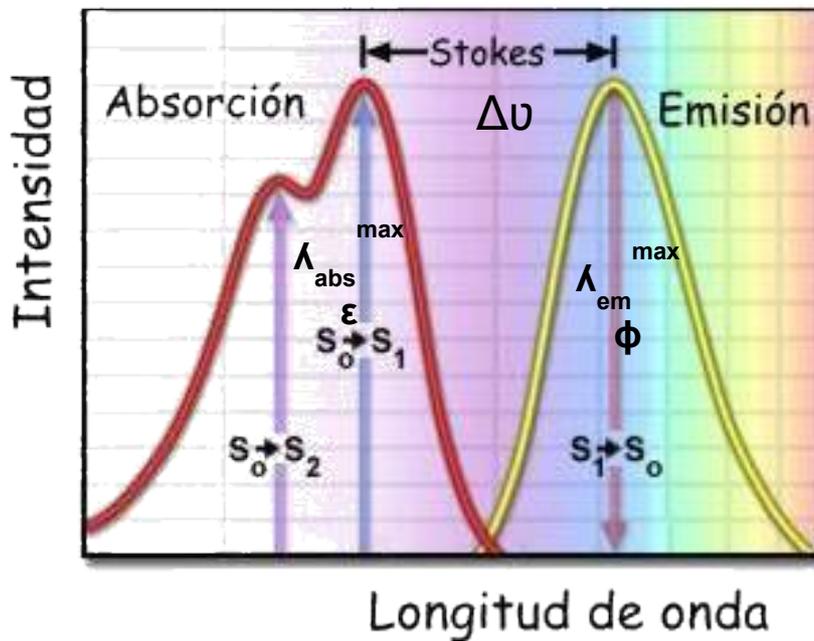


Figura 6. Ejemplo de espectro de absorción y emisión con indicación de propiedades fotofísicas ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, ϵ , $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$, $\Delta\nu$, Φ)

$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$: Longitud de onda de emisión máxima en el espectro de emisión. Está relacionada con la energía de relajación por emisión de fotones entre un estado excitado y el estado fundamental (S_0), que, como ya se ha comentado, es menor que la del proceso de absorción o excitación.

$\Delta\nu$: Desplazamiento de Stokes: Diferencia entre el máximo de la primera banda de absorción y el máximo de la longitud de onda de emisión.

Φ : Rendimiento cuántico: Relación entre el nº de fotones emitidos con respecto al nº de fotones absorbidos. Equivalente a la fracción de moléculas excitadas que retornan al estado fundamental con emisión de fotones.

I_F : Intensidad de fluorescencia: Cantidad de fotones (en moles) emitidos por unidad de tiempo (segundos) y por unidad de volumen de disolución (litro). *Luminosidad*

(o brillo) de la fluorescencia: Se define como el producto $\epsilon \times \Phi$. Es útil para comparar fluoróforos diferentes. Da una medida de la cantidad de luz absorbida y de la eficacia cuántica del fluoróforo.

τ : *Tiempo de vida de fluorescencia*: Duración de la fluorescencia, que va disminuyendo exponencialmente después de la excitación, y es reflejo del tiempo medio de vida de las moléculas en el estado excitado S_1 antes de retornar al estado fundamental.

Fotoestabilidad: Es la resistencia al fotoblanqueo. Casi todos los fluoróforos pierden la fluorescencia tras iluminación continuada (fotoblanqueo). Esta pérdida de fluorescencia depende de la intensidad de la luz de excitación y es especialmente importante en microscopia de fluorescencia, donde la luz de irradiación es muy intensa.

1.1.5. Fluoróforos más comunes

Como ya se ha comentado, entre los fluoróforos intrínsecos o endógenos los aminoácidos aromáticos fenilalanina (Figura 7, **1**), tirosina (**2**) y triptófano (**3**) emiten fluorescencia tras excitación con luz UV. De estos, el triptófano es el más fluorescente, con $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ 280 nm, $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ 348 nm, ϵ de $6.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y Φ de 0.13²⁰. La variación de la fluorescencia del triptófano con su entorno se ha utilizado como índice para diversidad de procesos biológicos, incluyendo el plegamiento de proteínas y la unión de ligandos²¹. También se ha empleado en aplicaciones FRET²² o como quencheador de la fluorescencia de diversos fluoróforos²³. Otros fluoróforos endógenos incluyen los cofactores reducidos de la nicotinamida (NADH, **4**), que presenta fluorescencia con $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}/\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 340/435 \text{ nm}$ ²⁴; las flavinas, como el mononucleótido de flavina (FMN, **5**, $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}/\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 450/530 \text{ nm}$ ²⁵); las porfirinas o los derivados de piridoxal²⁶. Estos fluoróforos endógenos son responsables de la autofluorescencia de células y tejidos, que puede enmascarar las señales deseadas de entidades marcadas en estudios de imagen y en experimentos *in cellulo* e *in vivo*²⁷. Los fluoróforos con fluorescencia desplazada hacia el rojo evitan este problema y, además, permiten una mayor penetración²⁸. Además, las longitudes de onda de excitación más largas no dañan el ADN ni los tejidos (los nucleósidos absorben a $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} \approx 260 \text{ nm}$)²⁹. Entre los fluoróforos extrínsecos más utilizados se encuentran los compuestos policíclicos aromáticos o heteroarómicos,

cuya utilidad aumenta en la medida que sus propiedades fotofísicas, indicadas en el apartado anterior, sean mayores, es decir: posean $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ y $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ desplazadas hacia el rojo y altos valores de ϵ , $\Delta\nu$, Φ y luminosidad y sean fotoestables. En general, las propiedades espectrales correlacionan con su tamaño, tipo de sustituyentes y con la abundancia de electrones π . En la Figura 7 se indican algunos de los fluoróforos más representativos. Entre estos destacan diversos derivados de naftaleno, como el cloruro de dansilo (**6**), uno de los primeros fluoróforos descritos³⁰, muy utilizado para el marcaje de proteínas, sobre todo en medidas de polarización, debido a su favorable tiempo de vida (10 ns). El grupo dansilo absorbe ≈ 350 nm y emite ≈ 520 nm, con fluorescencia altamente sensible a la polaridad del disolvente. Más recientemente, entre los derivados de naftaleno destaca el 5-((2-aminoetil)amino)naftaleno-1-ácido sulfónico³¹ (EDANS), muy usado en experimentos FRET³² y, en especial, diversos derivados de naftalimida, como el amarillo Lucifer^{33, 34} (**7**), que se comentaran más ampliamente en el apartado siguiente.

También se comentarán más ampliamente los derivados de quinolina, uno de los esqueletos heterocíclicos más frecuentes en fluoróforos. Entre estos, la quinina (**8**) fue el primer fluoróforo descrito en 1845³⁵, absorbe la luz UV del sol y emite a ≈ 450 nm, y sigue siendo una de las referencias más utilizadas en fluorescencia^{9, 20}.

Entre los derivados policíclicos aromáticos, además de los derivados de naftaleno, destacan los derivados de pireno (**9**), con $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}/\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ de 340/376 nm, ϵ de $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y Φ de 0.75, alta sensibilidad ambiental y largo tiempo de vida (>100 ns)^{20, 34}, por lo que han sido muy utilizados en estudios de plegamiento del ARN³⁶. Algunos derivados de pireno muestran sensibilidad al pH y alta solubilidad en agua^{34, 37}. También hay derivados de antraceno, como los derivados de perileno³⁸ y de coroneno³⁹, aunque han sido menos utilizados.

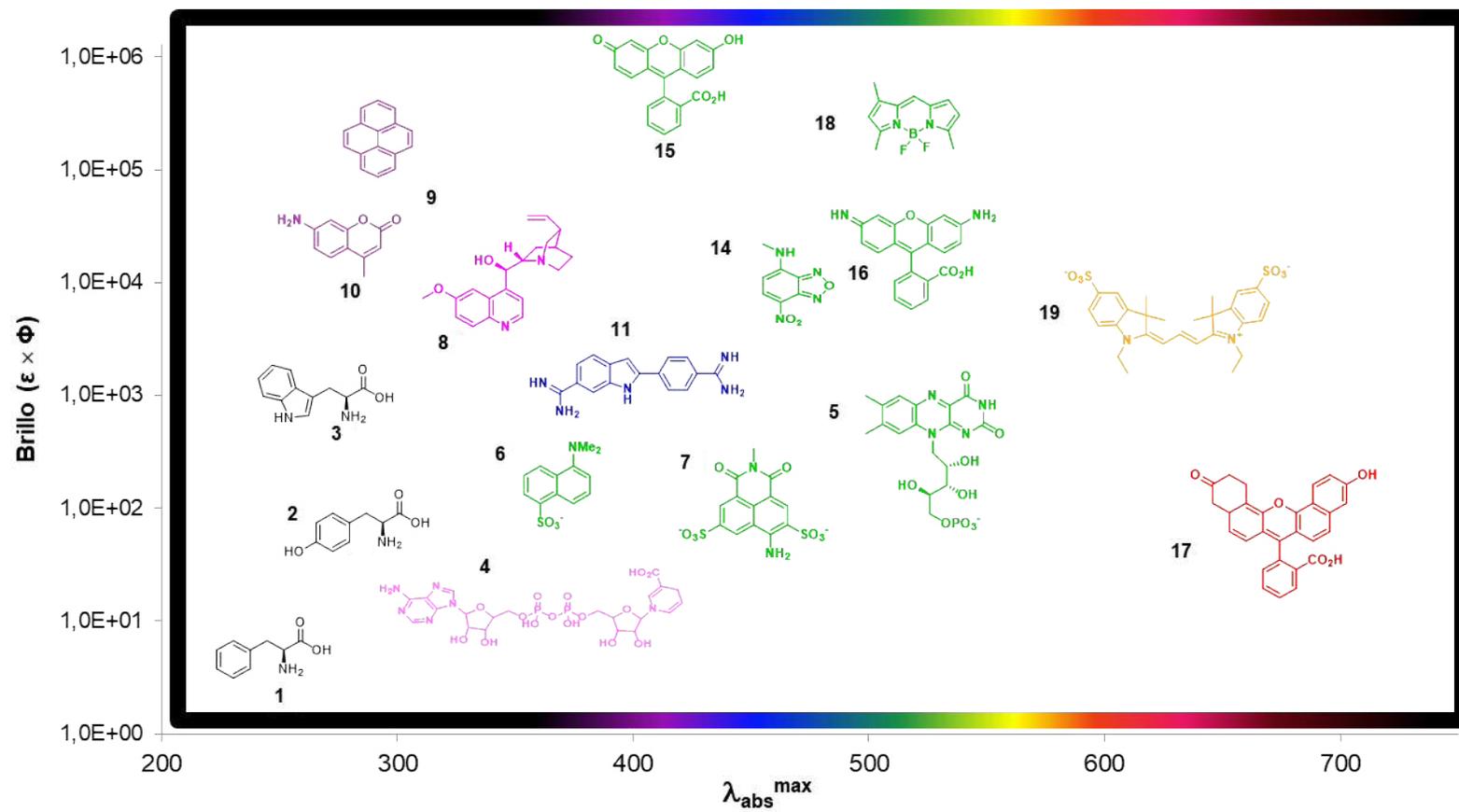


Figura 7. Ejemplos de fluoróforos representados por su brillo de emisión frente a λ_{abs}^{max} . El color de las estructuras representa el color de su λ_{em}^{max} . Figura adaptada de la referencia 20.

En el grupo de los heterociclos aromáticos, además de las quinolinas, por su pequeño tamaño molecular y su comportamiento destacan los derivados de cumarina, como la 7-amino-4-metilcumarina³⁴ (AMC, **10**). Estos derivados presentan grandes desplazamientos de Stokes y se han utilizado para el marcaje de diversas biomoléculas, mediante el anclaje a través de grupos reactivos unidos a las posiciones 3 o 4 del anillo de cumarina³⁴. Las características espectrales de estos derivados se han manipulado mediante la introducción de diversos sustituyentes en el anillo⁴⁰, con aplicación fundamentalmente en estudios enzimáticos (hidrolasas^{41, 42}, proteasas⁴³, desacetilasas⁴⁴ o esterasas⁴⁵).

Los derivados de indol y benzoxadiazol también han destacado entre los heterociclos de pequeño tamaño, tales como el 4',6-diamidino-fenilindol (DAPI, **11**), que se une al surco menor del ADN⁴⁶, produciendo un gran aumento en la fluorescencia, por lo que se ha utilizado para el teñido del ADN en experimentos de visualización celular⁴⁷. Entre los derivados de benzoxadiazol, destacan los derivados de 4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD,**14**), que se conjuga con pequeñas moléculas, tales como azúcares, para mantener su actividad biológica⁴⁸. Son sensibles al entorno, por lo que se han utilizado en la preparación de sensores de lípidos⁴⁹ y de sustratos de quinasas⁵⁰.

Numerosos derivados heteroarómicos de mayor tamaño se han desarrollado como fluoróforos, entre los que destacan los derivados de xanteno como las fluoresceínas o las rodaminas. La fluoresceína (**15**) fue sintetizada por primera vez por Baeyer in 1871⁵¹, pero, a pesar de su antigüedad, sigue siendo uno de los fluoróforos más usados. Puede existir en siete formas prototrópicas con diferentes propiedades fotofísicas, siendo las biológicamente más relevantes las formas mono- y dianiónicas, que se intercambian a $pK_a \approx 6.4$. De éstas, la dianiónica es la más fluorescente ($\lambda_{abs}^{max}/\lambda_{em}^{max}$ de 490/514 nm, ϵ de $9.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y Φ de 0.95)^{9, 34}. El esqueleto de la fluoresceína ha resultado muy versátil, pues se puede unir con grupos reactivos a diversas biomoléculas para su marcaje⁵² y sus propiedades espectrales se pueden manipular mediante la introducción de diversidad de sustituyentes^{53, 54}. Presenta sensibilidad al pH^{55, 56} y, mediante la introducción de grupos quelantes, permite la detección de diversos iones biológicamente importantes⁵⁷⁻⁶². También se puede enmascarar con grupos fotolábiles⁶³, útiles para estudios de cinética enzimática⁶⁴ y visualizaciones in vivo⁶⁵.

Las rodaminas son análogos de la fluoresceína con sustituyentes amino en lugar de hidroxilo o alcoxilo, con características espectrales similares, pero poca sensibilidad al pH. El miembro más sencillo de este tipo de fluoróforos, la rodamina 110 (**16**) posee propiedades fotofísicas muy similares a la fluoresceína ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}/\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ de 496/517 nm, ϵ de $7.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y Φ de 0.92 en agua)⁶⁶. Las rodaminas se suelen utilizar en experimentos FRET pareadas con derivados de fluoresceína debido a la alta eficiencia en la transferencia de energía entre los compuestos derivados de xanteno³⁴. La introducción de un anillo de benceno fusionado al esqueleto de xanteno tanto en las fluoresceínas como en las rodaminas produce un desplazamiento batocrómico importante en las longitudes de onda de emisión, como por ejemplo en la naftofluoresceína⁶⁷ (**17**), que emite ≈ 95 nm más hacia el rojo que la fluoresceína, pero que muestran menor coeficiente de extinción molar y menor rendimiento cuántico, por lo cual el brillo de su fluorescencia es menor.

Los derivados de boro, denominados BODIPYs (boro difluoro dipirrometanos), también destacan entre los derivados heteroaromáticos más utilizados⁶⁸. Son muy lipófilos, insensibles al entorno y presentan pequeños desplazamientos de Stokes^{34, 69}. El esqueleto base de BODIPY (**18**) presenta propiedades espectrales similares a las de la fluoresceína ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}/\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ de 505/511 nm, ϵ de $9.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y Φ de 0.94)³⁴, pero es sensible al medio básico, lo que limita su uso y aplicación, por ejemplo en la síntesis de péptidos en fase sólida⁷⁰. Aunque se han utilizado fundamentalmente para el marcaje de biomoléculas, los BODIPYs también se han utilizado como indicadores de iones⁷¹ y han resultado especialmente útiles en técnicas de polarización de la fluorescencia⁷².

Por último, destacan las cianinas, término que engloba a los sistemas de colorantes portadores de una cadena polimetilénica entre dos átomos de nitrógeno, generalmente heterocíclicos (como indol) [$\text{R}_2\text{N}-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{CH}=\text{N}^+\text{R}_2$], similar al pigmento retinaldiimina de la rodopsina⁷³. Estos fluoróforos se han utilizado mucho como etiquetas marcadoras⁷⁴, tintes de ADN⁷⁵ o como sensores del potencial de membranas^{76, 77}. Entre ellos, los más utilizados son los basados en la estructura de sulfoindocianina⁷⁸, abreviados como CyDye y a los que se les da nombres comunes según el número de átomos de carbono que separa las dos unidades de dihidroindol. La más pequeña Cy3 (**19**), posee propiedades espectrales similares a las rodaminas ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}/\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ de 554/568 nm, ϵ de $1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y Φ de 0.14 en agua)²⁰. Al aumentar el tamaño (Cy5, Cy7),

aumenta la longitud de onda de emisión hacia el rojo, aunque con bajada en los rendimientos cuánticos²⁰. Estos fluoróforos se han utilizado para el marcaje en microarrays⁷⁹, como pares en experimentos FRET⁸⁰ y en estudios de visualización celular de ultra-alta resolución⁸¹.

1.1.6. 1,8-Naftalimididas

El esqueleto de 1,8-naftalimida (imida del ácido naftaleno-1,8-dicarboxílico) ha sido uno de los más utilizados en el diseño de fluoróforos, por su pequeño tamaño, la facilidad de síntesis y su versatilidad para manipular y ajustar sus propiedades fotofísicas con la introducción de diversidad de sustituyentes. El grupo imida es electroatractor y se suele combinar con grupos dadores de electrones (aminas, OR,...etc.) en posición 4, lo que hace que, en general, las naftalimididas se comporten como fluoróforos ICT, con estados excitados altamente dipolares, dando lugar a bandas anchas, tanto en los espectros de absorción, centradas entre 350 y 450 nm, como en los de emisión, generalmente centradas a 420-500 nm. El carácter ICT de las naftalimididas hace que sean muy solvatocrómicos y su fluorescencia sea muy dependiente de la polaridad del disolvente.

Mediante la manipulación de los sustituyentes en la posición 4 y en el nitrógeno imídico del anillo de 1,8-naftalimida, introduciendo grupos capaces de complejar o quelar selectivamente iones, se han obtenido sensores tanto de cationes como de aniones. En el primer caso, se han obtenido sensores de cationes modificando el carácter ICT, mediante la introducción sobre un grupo amino en posición 4 de grupos capaces de quelar cationes de forma selectiva⁸², como por ejemplo el sensor de cobre (II) **20**⁸³ (Figura 8) o los sensores de Ca²⁺ **21a**⁸⁴ y de Hg²⁺ **21b**⁸⁵, en los que se ha introducido un éter azacorona para complejar los cationes. Sin embargo, la mayoría de los sensores tanto de pH como de cationes derivados de naftalimida se basan en la inactivación de un efecto PET, fundamentalmente, de aminas terciarias unidas, tanto a un grupo amino en posición 4 como al nitrógeno imídico, a través de un espaciador que suele ser una cadena polimetilénica⁸², como los sensores de pH **22a**⁸⁶ y **22b**⁸⁷ o el sensor de Zn²⁺ **23**⁸⁸.

De forma similar, la introducción de grupos que unen aniones, como las ureas o las tioureas, tanto en el grupo amino en posición 4 como en el nitrógeno imídico, ha dado lugar a sensores de aniones⁸⁹. En este caso la unión del anión a los grupos urea o tiourea, ricos en electrones, potencia el efecto PET sobre el fluoróforo 1,8-naftalimida, y

el reconocimiento se traduce en una disminución de la fluorescencia al aumentar la concentración del anión reconocido. Ejemplos de estos sensores de aniones son el sensor de iones F^- **24**⁹⁰ y **25**, sensor de protones y cationes a través de la amina terciaria, y de los aniones F^- , $H_2PO_4^-$ y AcO^- a través del grupo urea⁹¹.

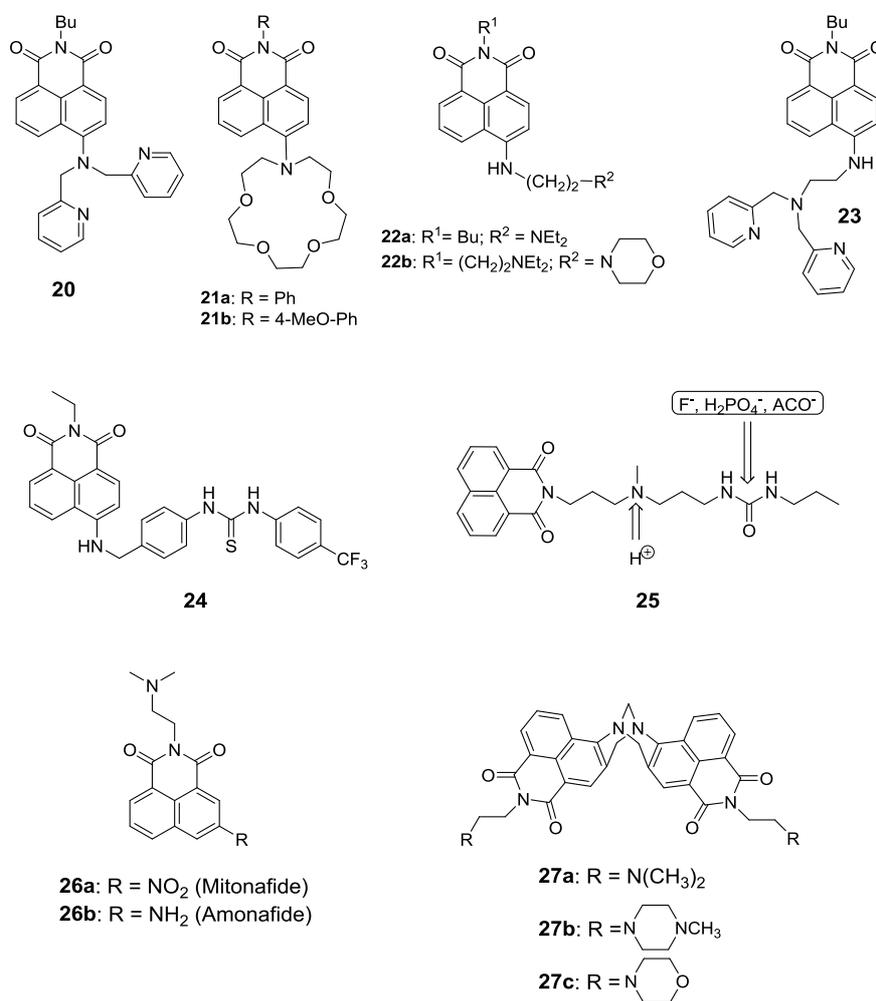


Figura 8. Ejemplos de 1,8-naftalimidias sensores de cationes y de aniones

Entre los sensores de aniones hay que destacar los que se unen al ADN, como **26a** y **26b**, en los que el grupo dimetilamino se protona a pH fisiológico facilitando la unión al ADN a través del polianión trifosfato⁸⁹. En naftalimidias análogas, en las que se sustituye el grupo dimetilamino por pirazina o morfolina, se ha observado que la unión al ADN es mayor cuanto mayor es el pKa de la amina terciaria^{89, 92}. A partir de estas naftalimidias se desarrollaron las bases de Tröger **27a-c**, derivadas de 4-amino-1,8-naftalimida, que se unen fuertemente al ADN, mediante interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno, a través de las aminas terciarias protonadas a pH fisiológico^{92, 93}. La irradiación con luz en presencia de estas naftalimidias puede dañar o romper el ADN⁸⁹. Gran parte de estas naftalimidias que se unen al ADN han demostrado ser potentes antitumorales⁹⁴, como mitonafide (**26a**) o amonafide (**26b**)^{95, 96}, intercalantes del ADN e inhibidores de topoisomerasa II⁹⁷, que llegaron a estudios en fase clínica III en pacientes de leucemia mieloide⁹⁸.

Estas naftalimidias además de como intercalantes de ADN, se unen al surco menor del ADN, mediante interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno^{89, 92, 93}. También han demostrado aplicación como sensores para la visualización celular y en el desarrollo de marcadores de cánceres^{89, 94}.

Recientemente, la amida del ácido γ -glutámico y de amonafide **28** (Figura 9) se ha utilizado como sensor ratiométrico para visualizar el daño en el ADN de células cancerosas⁹⁹. La amida **28** emite en el azul (441 nm) y por la acción de la γ -glutamyltranspeptidasa (GGT), sobreexpresada en células cancerosas, es transformada a amonafide (**26b**), que emite en el verde (531 nm) y, a su vez, éste es acetilado por la acción de *N*-acetiltransferasa (NAT), sobreexpresada en zonas en las que hay daño en el ADN, para dar **29**, que nuevamente emite en el azul (455 nm). Por lo cual el sensor **28** permite seguir en tiempo real la cinética del daño en el ADN de células cancerosas que sobreexpresan GGT.

Aprovechando su fuerte carácter solvatocrómico, el fluoróforo 4-dimetilamino-1,8-naftalimida (4-DMN) se ha utilizado para el estudio de dinámica de proteínas y de interacciones proteína-proteína¹⁸, mediante su incorporación en secuencias de péptidos apropiadas, preparando previamente el correspondiente aminoácido **30**¹⁰⁰ (Figura 10) o derivados reactivos adecuados para el marcaje de péptidos y proteínas^{101, 102}. En agua o ambientes polares la 4-DMN es muy poco fluorescente, aumentando significativamente

la fluorescencia en ambientes no polares, como es el caso de los entornos lipófilos de las interacciones proteína-proteína. 4-DMN también se ha utilizado en estudios de la dinámica de interacciones de proteínas mediante FRET con otro fluoróforo¹⁰³.

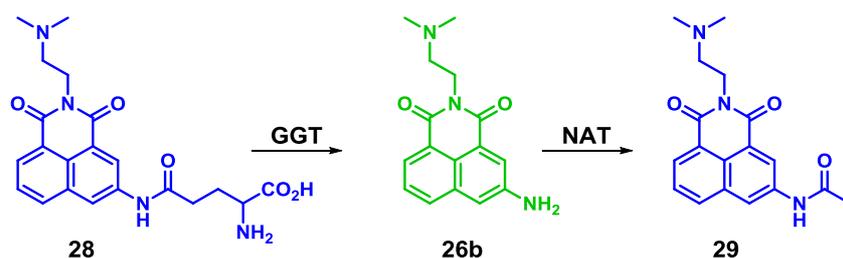
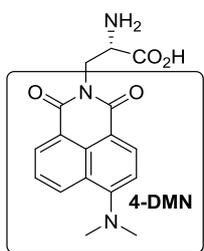


Figura 9. Sensor ratiométrico del daño en el ADN de células cancerosas

Aprovechando su fuerte carácter solvatocrómico, el fluoróforo 4-dimetilamino-1,8-naftalimida (4-DMN) se ha utilizado para el estudio de dinámica de proteínas y de interacciones proteína-proteína¹⁸, mediante su incorporación en secuencias de péptidos apropiadas, preparando previamente el correspondiente aminoácido **30**¹⁰⁰ (Figura 10) o derivados reactivos adecuados para el marcaje de péptidos y proteínas^{101, 102}. En agua o ambientes polares la 4-DMN es muy poco fluorescente, aumentando significativamente la fluorescencia en ambientes no polares, como es el caso de los entornos lipófilos de las interacciones proteína-proteína. 4-DMN también se ha utilizado en estudios de la dinámica de interacciones de proteínas mediante FRET con otro fluoróforo¹⁰³.



30

Figura 10. Aminoácido derivado de 4-DMN para la síntesis de péptidos

Las naftalimidias sustituidas en posición 4 con un grupo NH_2 muestran fuerte fluorescencia de color verde. Sin embargo, cuando este grupo se acila, al disminuir el carácter dador de electrones, la fluorescencia disminuye y se desplaza hacia el color azul. Esta característica ha sido aprovechada para desarrollar sensores ratiométricos de diversos bioanalitos, de fórmula general **31** (Figura 11), con aplicación tanto en estudios *in vitro* como en visualización celular. Este es el caso de los sensores selectivos de tioles, tales como SH_2 ^{104, 105}, el glutatión (GSH)¹⁰⁶ y la tiorredoxina¹⁰⁷, o de selenoles, como la selenocisteína de la tiorredoxina reductasa, enzima implicada en la etiología de la enfermedad de Parkinson¹⁰⁸. Tanto la tiorredoxina como la tiorredoxina reductasa están implicadas en la formación de especies de oxígeno reactivo en las mitocondrias, que están relacionadas con diversas enfermedades neurodegenerativas. Por ello, con el fin de direccionar el sensor hacia las mitocondrias, R^1 de la fórmula general **31** suele incluir grupos cargados positivamente, generalmente, sales de fosfonio^{107, 108}. En una transformación activadora se basan también los sensores de formaldehído de fórmula general **33**, en los que el grupo hidrazino en posición 4 quenchea la fluorescencia de la naftalimida por efecto PET.

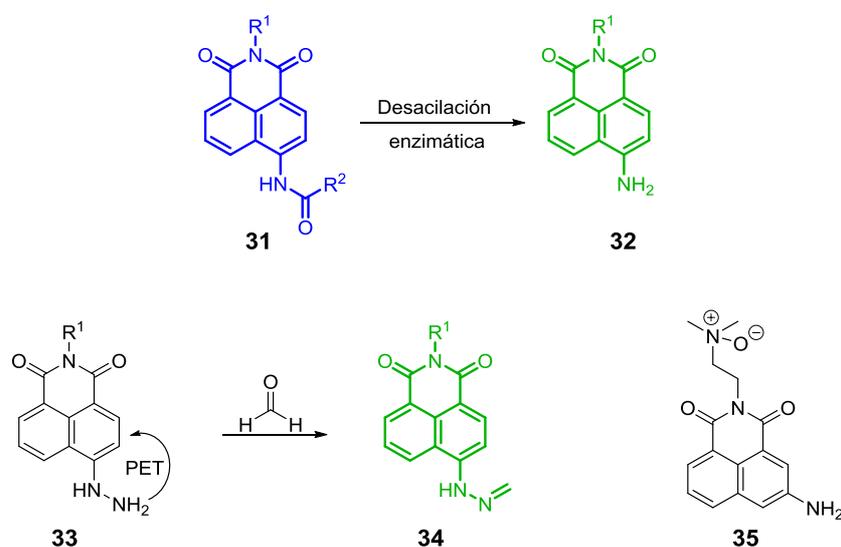


Figura 11. Sensores de tioles, formaldehído e hipoxia

La reacción de la hidrazina **33** con formaldehído da lugar a la hidrazona **34**, bloqueando el PET y dando fluorescencia verde intensa^{109, 110}. También en el bloqueo de un mecanismo PET se basa un sensor de creatinina en suero de sangre humana recientemente descrito¹¹¹.

Por último, señalar los sensores de hipoxia en células tumorales basados en la presencia de grupos capaces de biorreducirse enzimáticamente en condiciones de hipoxia, tales como los grupos nitro o los *N*-óxidos, que quenchean la fluorescencia y al reducirse a aminas dan lugar a derivados altamente fluorescentes¹¹²⁻¹¹⁴. Este es el caso del *N*-óxido de amonafide **35**, marcador de células hipóxicas en tumores sólidos¹¹⁴.

1.1.7. Quinolinas

El esqueleto de quinolina también es uno de los más repetidos en fluoróforos, empezando por la quinina (**8**), el primer fluoróforo descrito³⁵, ya comentado. Al igual que las naftalimidias, las quinolinas se han utilizado mucho en sensores de cationes^{115, 116}, en particular como sensores de Zn^{2+} . Este es el caso de la 6-metoxi-8-*p*-toluensulfonamido-quinolina (TSQ, Figura 12, **36**) cuya fluorescencia aumenta 100 veces al unirse a Zn^{2+} ,

selectivamente en presencia de concentraciones altas de Ca^{2+} o Mg^{2+} , pero su baja solubilidad en agua limita su aplicación¹¹⁷. Intentando resolver esta limitación surgió su análogo zinquin-A (**37**), portador de un ácido carboxílico en posición 6. Esta modificación dio lugar a un importante aumento de solubilidad y de fluorescencia en presencia de Zn^{2+} , mientras que Ca^{2+} y Mg^{2+} no afectan a la fluorescencia y Fe^{2+} y Cu^{2+} la quenchean¹¹⁸. Zinquin-A fue el primer sensor fluorescente de metales de transición utilizado en estudios *in cellulo*¹¹⁹. La capacidad quelante del grupo di(2-picolil)amino, altamente selectivo por Zn^{2+} en muestras biológicas frente a otros cationes, se ha aprovechado para desarrollar sensores de este catión, tales como **38**¹²⁰. La sustitución del grupo fenoxilo por un grupo metoxilo en posición 8 y la introducción de un grupo isobutoxilo en posición 4 cambian la selectividad hacia Cd^{2+} frente a Zn^{2+} y otros cationes dando lugar a sensores ratiométricos altamente sensibles y selectivos para cadmio¹²¹ (**39**). También se han desarrollado sensores de Zn^{2+} que combinan la potenciación de la fluorescencia por quelación con la inhibición de efecto PET, como en la di(2-quinolil)amina **40**¹²². Por el contrario, la chalcona derivada de 2-hidroxi-quinolina **41** es un sensor selectivo del catión Fe^{3+} al quenchar la fluorescencia por PET¹²³. En la potenciación de la fluorescencia por quelación también se basa el sensor selectivo de Hg^{2+} **42**, derivado de 2-benzoimidazolil-quinolina¹²⁴.

La conocida capacidad quelante de la 8-hidroxi-quinolina (Figura 12, **43**), además ser la base de sus múltiples aplicaciones terapéuticas¹²⁵, ha sido utilizada en el desarrollo de sensores de cationes, particularmente de Zn^{2+} desde 1968¹²⁶. Más recientemente, el grupo de Barbara Imperiali ha desarrollado sensores peptídicos muy selectivos de la actividad de quinasas¹²⁷⁻¹²⁹, basados en la utilización de la 8-hidroxi-5-(*N,N*-dimetilsulfonamido)-2-metilquinolina (**44**) como fluoróforo¹³⁰, que fue desarrollado inicialmente como sensor de Zn^{2+} . Estos sensores se basan en la potenciación de la fluorescencia por quelación del Mg^{2+} de las quinasas, formando un complejo conjunto con el fosfato que incorpora la quinasa en sus sustratos.

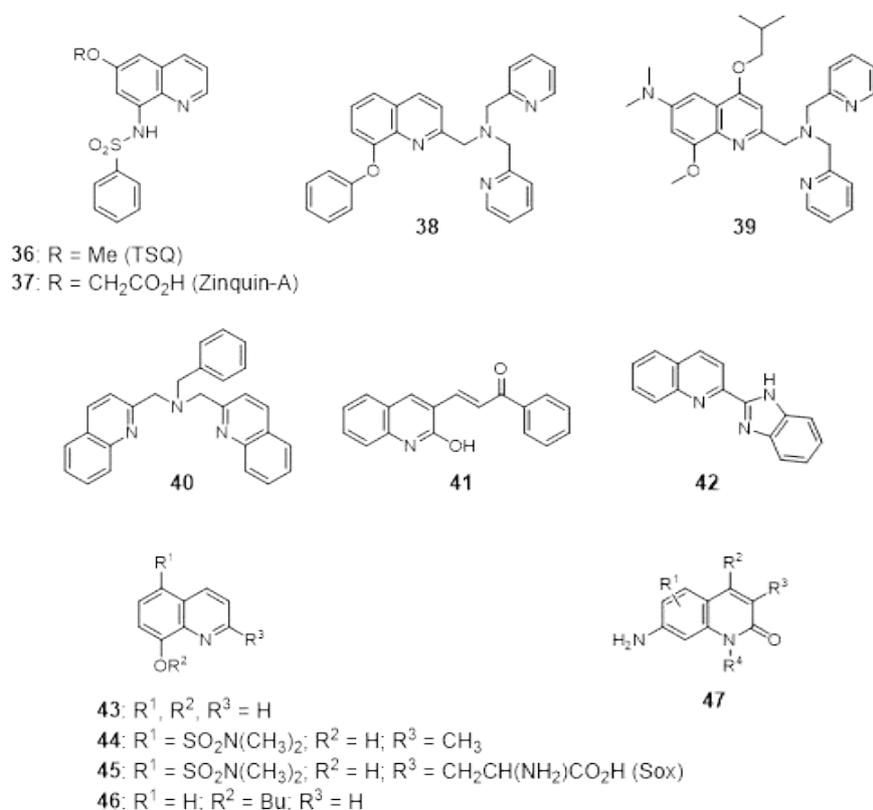


Figura 12. Fluoróforos derivados de quinolinas

Para la incorporación del fluoróforo en los péptidos fue necesario preparar el correspondiente aminoácido **45** (Sox) o reactivos apropiados para el marcaje en residuos de cisteína¹³¹. La sustitución del grupo sulfonamido por derivados de triazol, en los que se extiende la conjugación de electrones π , mejoró el fluoróforo, dando lugar a un significativo desplazamiento batocrómico en las longitudes de onda de excitación y de emisión¹³². Por otra parte, derivados de 8-hidroxi-quinolina en los que el grupo hidroxilo se sustituye por alcoxilo, tales como **46**, han dado lugar a fluoróforos solvatocrómicos con aplicación como sensores de proteínas como la albumina de suero bobino¹³³.

Entre los derivados de quinolina, también hay que destacar a los derivados de 2-quinolinone, de fórmula general **47**¹³⁴, denominados carbostirilos, utilizados como sensibilizadores o antenas de la fluorescencia de lantánidos, que se comentan en el apartado siguiente.

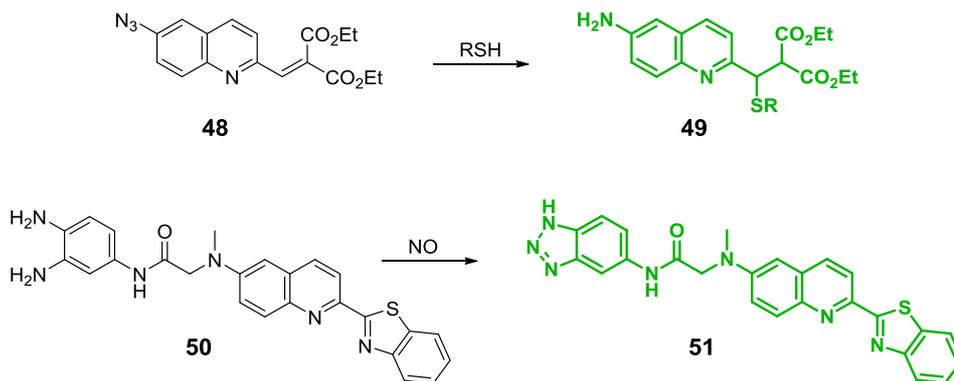


Figura 13. Sensores de fluorescencia derivados de quinolina basados en reactividad selectiva

Por último, señalar los sensores derivados de quinolinas basados en la activación de la fluorescencia por reacción de alguno de los grupos que incorpora, como el sensor de tioles *in cellulo* **48** (Figura 13), basado en el aumento de fluorescencia producido al reducirse un grupo azido a amino por la acción de tioles¹³⁵, o el sensor de óxido nítrico **50**, que, por irradiación de dos fotones, se transforma en el derivado de benzotriazol **51**, aumentando 12 veces la fluorescencia, por inhibición del efecto PET del grupo σ -diaminofenilo sobre la quinolina¹³⁶.

1.1.8. Antenas de lantánidos

Los lantánidos (Ln, desde el lantano al lutecio) se caracterizan por poseer electrones 4f (0-14), protegidos por los orbitales ocupados 5S², 5P⁶ y 6S². Debido a su bajo potencial de oxidación, los lantánidos en disolución existen casi exclusivamente en su estado trivalente, Ln(III). El apantallamiento de los electrones 4f hace que éstos interactúen poco con el entorno y que participen poco en enlaces covalentes con sus ligandos. La interacción de los cationes Ln³⁺ con sus ligandos es fundamentalmente electrostática. La entalpía de hidratación de estos cationes aumenta al aumentar el

número atómico, mientras que su radio atómico disminuye, produciéndose lo que se conoce como contracción del lantánido^{137, 138}. Debido a su pequeño tamaño los iones Ln^{3+} tienen alta densidad de carga superficial positiva, por lo que se comportan como ácidos de Lewis duros, coordinándose preferentemente con grupos dadores muy electronegativos (bases de Lewis duras), en el orden $\text{F}^- > \text{OH}^- > \text{H}_2\text{O} > \text{NO}_3^- > \text{Cl}$. Los números de coordinación de estos cationes se encuentran en el rango de 3-12, dependiendo del volumen estérico de los ligandos, siendo 8 y 9 las coordinaciones más frecuentemente observadas¹³⁸. Debido a su pequeño tamaño los iones Ln^{3+} presentan alta semejanza, en términos de radio iónico y oxofilia, con el catión divalente Ca^{2+} ¹³⁹. Esta semejanza ha permitido su sustitución en diversas proteínas dependientes de calcio^{140, 141}. Los cationes Ln^{3+} y sus complejos, tanto en estado sólido como en disolución, son luminiscentes con bandas estrechas, similares a líneas atómicas, correspondientes a transiciones electrónicas entre los orbitales 4f, que, según la regla de selección de Laporte¹⁴², son prohibidas. Como ya se ha comentado, el apantallamiento de los orbitales 4f por los electrones $5s^2$ y $5p^6$ hace que estén aislados del entorno, por ello, las bandas de absorción y, especialmente, las de emisión de estos cationes son muy finas y dependientes exclusivamente de la naturaleza del lantánido. Los orbitales 4f no son degenerados con idéntica energía, sino que se separan en diversos niveles energéticos debido a las diversas interacciones de los electrones en estos orbitales, entre las que destacan, por orden de importancia, las repulsiones electrónicas, los acoplamientos spin-orbita y el campo que generan los ligandos, como se muestra, de forma representativa para el Eu^{3+} , en la Figura 14. La repulsión electrónica separa los niveles en L términos, separados por intervalos del orden de 10^4 cm^{-1} , denominados con diferentes letras (F y D en el caso del Eu^{3+}), mientras que, los acoplamientos spin-orbita separan estos niveles en J intervalos del orden de 10^3 cm^{-1} . Por último, la presencia de un entorno de coordinación, tal como un cristal o un ligando orgánico, genera un campo eléctrico, que separa los niveles J en intervalos pequeños de unos 10^2 cm^{-1} , responsables de la estructura fina de los espectros tanto de absorción como de emisión y que solo se observa en espectrómetros de alta resolución. Los niveles energéticos degenerados se indican como $^{(2S+1)}L_J$, donde (2s+1) indica la multiplicidad de spines y es igual al nº de estados energéticos J para cada nivel L. Solo están permitidas las transiciones electrónicas entre los niveles $^{(2S+1)}L_J$ en las que $\Delta L = 0, \pm 1$ y $\Delta J = \pm 1$ ^{138, 142}.

143

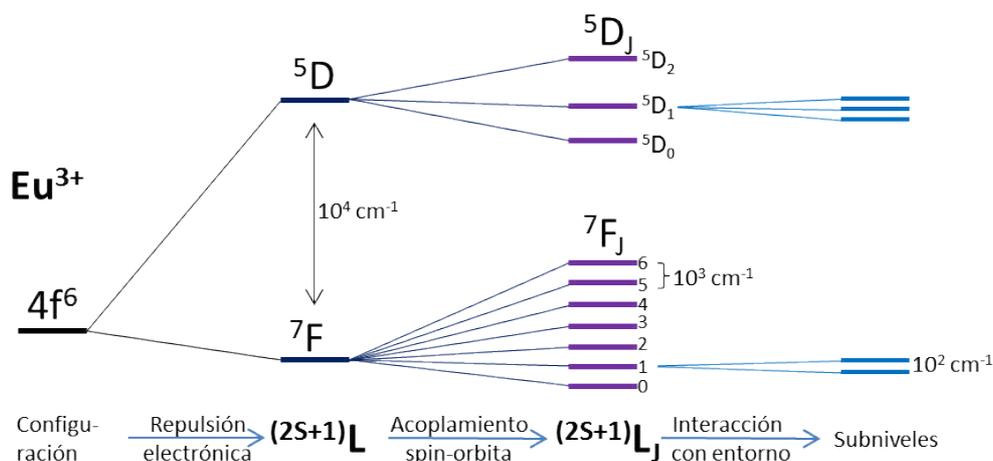


Figura 14. Representación de la distribución de los niveles energéticos de los orbitales 4f del Eu^{+3}

El carácter prohibido de las transiciones 4f es responsable de la baja absorbancia de los lantánidos, con coeficientes de extinción molar (ϵ) del orden de $10 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, y de sus relativamente largos tiempos de vida de luminiscencia, del orden de microsegundos para samario y disprosio y de milisegundos para europio y terbio. En comparación con los tiempos de fluorescencia de la mayoría de los fluoróforos orgánicos, del orden de los nanosegundos, los largos tiempos de fluorescencia de los lantánidos suponen una ventaja importante para estudios biológicos, pues permiten aplicar un retraso entre el pulso de excitación y la ventana de detección, lo que se conoce como experimentos resueltos en el tiempo, en los que se eliminan las interferencias por la autofluorescencia de los medios biológicos, aumentando sensiblemente la relación señal-ruido y, por lo tanto, la sensibilidad.

El salto energético entre el estado luminiscente más bajo y el no luminiscente más alto determina la zona de emisión del lantánido. En base a la zona de emisión se distinguen dos grupos, los lantánidos que emiten en el visible y/o infrarrojo cercano con baja luminiscencia, donde se incluyen praseodimio, neodimio, holmio, erbio, tulio e iterbio, en los que el salto energético es pequeño, por lo que la desactivación no radiativa, por interacción con osciladores de alta frecuencia, como el disolvente, compete con la emisión de luz; y los que emiten en el visible con alta luminiscencia, como el

samarium (naranja), el europio (rojo), el disprosio (amarillo) y el terbio (verde). De éstos, el Eu^{3+} (emisión ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$, 613 nm) y el Tb^{3+} (emisión ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_5$, 545 nm) son los que más se han utilizado para estudios biológicos.

Los bajos coeficientes de absorción de los lantánidos dificultan su excitación. Este problema se evita aprovechando la posibilidad de excitación indirecta mediante transferencia de energía desde cromóforos con alto coeficiente de absorción molar. Este proceso se conoce como sensibilización o efecto antena y al cromóforo se le denomina antena. Este proceso es la base de la mayoría de las aplicaciones de la luminiscencia de los lantánidos, es extremadamente sensible a cambios en el entorno tanto del metal como de la antena y complejo, implicando diversos niveles de energía de la antena dadora y del metal aceptor. En la Figura 15 se representa de forma simplificada el proceso de sensibilización del Eu^{3+} y del Tb^{3+} ¹⁴⁴. En la excitación, por absorción de un fotón, la antena pasa del estado fundamental S_0 al primer estado excitado singlete S_1 , que, por cruzamiento intersistemas (ISC), pasa al estado triplete T_1 . Desde aquí, la antena puede transferir energía (ET) a alguno de los orbitales luminiscentes 4f del lantánido (en el caso de Eu^{3+} , los ${}^5\text{D}_J$), mediante un mecanismo Dexter¹⁴⁵, que requiere el solapamiento físico de orbitales del dador y del aceptor y es muy dependiente de la distancia, de manera que la transferencia de energía disminuye drásticamente para distancias superiores a 5 Å. La desactivación del sistema se produce por emisión de luz al pasar el lantánido a alguno de los estados fundamentales 4f (en el caso de Eu^{3+} , los ${}^7\text{F}_J$). Dada la ya comentada dificultad de las transiciones entre orbitales 4f, responsable de los largos tiempos de vida de luminiscencia de los lantánidos, diversos mecanismos de desactivación compiten con este proceso: a) La fluorescencia de la antena y el quenching de su estado triplete T_1 por el O_2 disuelto en el medio. b) Si la diferencia de energía entre el estado T_1 de la antena y el estado excitado del lantánido es pequeña, el proceso de transferencia de energía (ET) puede revertir hacia el estado T_1 , pero si dicha diferencia es demasiado grande la transferencia de energía puede ser demasiado lenta. Se estima¹⁴⁶ que la diferencia de energía entre el estado T_1 de la antena y el estado luminiscente más bajo del lantánido debe ser superior a los 1.500 cm^{-1} . Algunos autores elevan esta diferencia a $2.500\text{-}3.500 \text{ cm}^{-1}$ ¹⁴⁷. c) La desactivación no radiativa del lantánido por acoplamiento con estados vibracionales de los OH y CH (osciladores de alta frecuencia) del entorno^{148, 149}. Para que se produzca este acoplamiento, el salto energético del lantánido desde el estado excitado al estado fundamental debe ser del

mismo orden que la energía del conjunto de estados vibracionales de dichos grupos¹⁵⁰. El Tb^{3+} , en el que el salto de energía es mayor, es el lantánido menos sensible a este quenching. Esta desactivación es particularmente importante en H_2O . Por ello, es conveniente que la esfera de coordinación del lantánido esté completamente ocupada por el ligando para evitar el quenching de luminiscencia por este disolvente y el tiempo de vida de la luminiscencia varía linealmente con el número de moléculas de H_2O de coordinación.

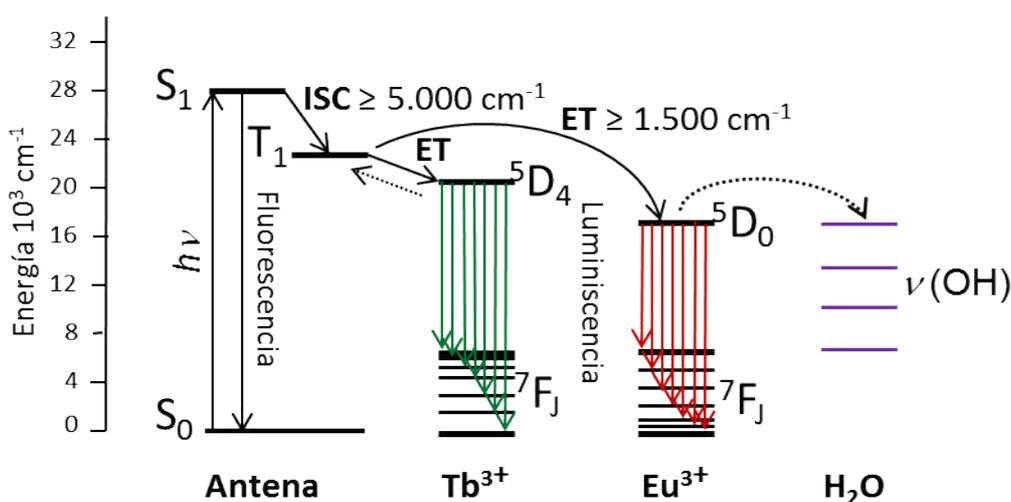


Figura 15. Diagrama simplificado de Jabloski, mostrando el flujo de energía en el proceso de sensibilización de Tb^{3+} y Eu^{3+} por una antena

La intensidad de la luminiscencia del proceso de sensibilización viene determinada por el producto del coeficiente de extinción molar de la antena (ϵ) por el rendimiento cuántico de sensibilización (Φ_{SE}).

Este rendimiento es el producto del rendimiento cuántico del entrecruzamiento entre sistemas (Φ_{ISC}) por el rendimiento cuántico de la transferencia de energía (Φ_{ET}), y por el rendimiento cuántico de la luminiscencia del lantánido (Φ_{LA}).

$$\Phi_{SE} = \Phi_{ISC} \times \Phi_{ET} \times \Phi_{LA}$$

Teniendo en cuenta que los cromóforos orgánicos suelen tener ϵ en el rango 10^3 - $10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, en comparación con las absorbancias de los lantánidos, del orden de 1 - $10 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, la antena puede aumentar la intensidad de la luminiscencia hasta un factor de 10^6 .

Teniendo en cuenta los factores que influyen en el proceso de sensibilización, para que éste sea eficaz se deben reunir las siguientes condiciones:

- La antena debe poseer alta absorbancia (ϵ).
- El rendimiento del entrecruzamiento entre sistemas de la antena ($S_1 \rightarrow T_1$, Φ_{ISC}) debe ser alto. En este sentido, la presencia del lantánido aumenta este rendimiento, por el conocido efecto de los átomos pesados externos¹⁵¹. La presencia del ion lantánido cercano a la antena induce en ésta una mezcla en los orbitales S_1 y T_1 , confiriendo al estado singlete cierto carácter de triplete y viceversa. Como consecuencia, se facilita la transición prohibida $S_1 \rightarrow T_1$ y, generalmente, la fluorescencia de la antena disminuye. Una eficiente población del estado triplete de la antena requiere también una eficiente población del estado singlete S_1 y, por tanto, como ya se ha indicado, alta absorbancia. Además, la energía del estado S_1 determina la longitud de onda de excitación de la antena. Se asume que la diferencia de energía entre los estados S_1 y T_1 de la antena es como mínimo 5.000 cm^{-1} , y la diferencia entre el estado triplete de la antena y el principal estado aceptor del lantánido debe ser $\geq 1.500 \text{ cm}^{-1}$ ^{138, 152}. Por ello, teniendo en cuenta la energía de los estados aceptores de los lantánidos, la longitud de onda de absorción de las antenas debe ser próxima a 370 nm para el Tb^{3+} y a 390 para el Eu^{3+} . Por otra parte, hay que tener en cuenta que la longitud de onda de excitación de la antena debe estar por encima de 350 nm para facilitar el uso de fuentes de excitación baratas y para evitar el daño celular en estudios *in cellulo*.
- La distancia entre la antena y el lantánido debe ser pequeña para que la transferencia de energía (ET) sea eficiente, pues, como ya se ha comentado, la transferencia se produce a través de un mecanismo de Dexter de intercambio electrónico, que requiere el contacto físico entre los orbitales del dador (antena) y el aceptor (lantánido).
- La esfera de coordinación del lantánido debe estar completamente ocupada por los ligandos, para evitar el quenching de luminiscencia que induce el disolvente, sobre todo en H_2O .

La antena puede formar parte de la estructura que coordina el Ln^{3+} y participar directamente en la esfera de coordinación, llamándose en este caso antena quelante, o estar unida a la estructura de coordinación a través de un espaciador sin participar en la esfera de coordinación^{138, 152}. Las antenas quelantes tienen la ventaja de que la corta distancia entre la antena y el lantánido facilita la transferencia de energía, pero, en este caso, suele ser más difícil optimizar la coordinación del lantánido, por lo que los complejos suelen ser poco estables en H_2O . Las primeras antenas descritas fueron β -dicetonas con sustituyentes aromáticos^{146, 153} (Figura 16, **52**). La estabilidad de sus quelatos en disolventes orgánicos depende del impedimento estérico de los sustituyentes y del pK_a , disminuyendo al aumentar la acidez de la β -dicetona, no son estables en H_2O . Con el fin de aumentar la estabilidad de los complejos en agua, aumentando la coordinación del lantánido, se han utilizado diversos derivados de cicleno (**52-56**) funcionalizados con 4 brazos que contienen grupos dadores tales como carboxilato, amida, fosfonato o fosfinato. Estos derivados de cicleno coordinan muy fuertemente los cationes Ln^{3+} , confiriendo buen apantallamiento frente al disolvente y alta estabilidad de los complejos en H_2O . Así por ejemplo, se han descrito complejos del cicleno **54** con Eu^{3+} , en combinación con β -dicetonas, como sensores de aniones¹⁵⁴. Las estructuras derivadas de carbostirilo como **55** se encuentran entre las más utilizadas como antenas¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. Para coordinar el lantánido se han utilizado también estructuras abiertas como derivados de los ácidos etilendiaminotetrácetico (EDTA)¹⁵⁹ o etilentriaminopentácetico (DTPA)¹⁶⁰, o estructuras de tipo criptato¹⁶¹ o calix[4]areno^{162, 163}. En estos casos, la antena puede formar parte de estas estructuras coordinantes, como es el caso del criptato derivado de bipyridina **57**¹⁶¹. Estos complejos tienen la ventaja de optimizar la coordinación junto con la corta distancia de separación de la antena y el lantánido. Cuando la antena va unida a la estructura coordinante a través de un espaciador, sin participar en la coordinación, hay que optimizar la distancia entre la antena y el lantánido, ya que, en estos casos, en la transferencia de energía predomina el mecanismo de Förster, que es dependiente de la inversa de la sexta potencia de dicha distancia.

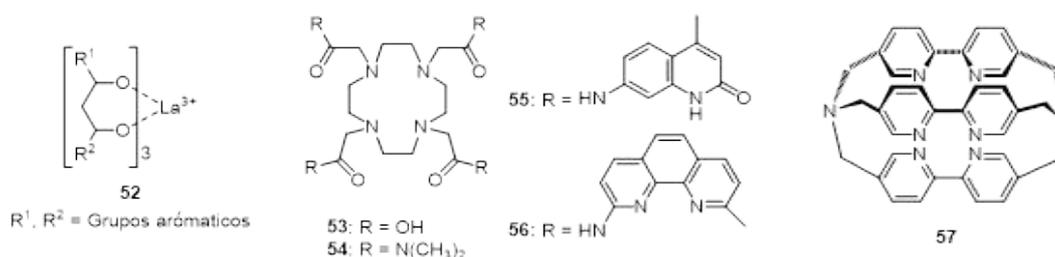


Figura 16. Ejemplos de antenas y estructuras coordinantes de La^{3+}

La utilidad de los sistemas antena/lantánido como biosensores viene determinada por la capacidad de los analitos de modular su luminiscencia¹⁴⁴. a) Modulación de la luminiscencia modificando la distancia antena/lantánido. El analito puede modular esta distancia induciendo cambios conformacionales en el espaciador entre la antena y el lantánido o afectando a su unión. b) Modulación de la luminiscencia modificando el número de moléculas de H_2O en la esfera de coordinación. El analito puede desplazar estas moléculas c) El analito es capaz de actuar como antena y coordinar al lantánido. d) Modulación de la luminiscencia mediante la inducción de cambios químicos en la antena que modifiquen sus propiedades fotofísicas y, por lo tanto, su comportamiento como antena. e) Modulación de la luminiscencia mediante la presencia de grupos capaces de modificar la transferencia de energía de la antena mediante transferencia electrónica fotoinducida (PET) debido a la presencia o ausencia de un analito.

El estudio de proteínas o ácidos nucleicos requiere, generalmente, la conjugación tanto de la antena como del complejo del lantánido a péptidos u oligonucleótidos apropiados para ser reconocidos selectivamente por la bio-macromolécula en cuestión^{141, 164, 165}. Por lo que ambos, la antena y el complejo del lantánido, requieren una funcionalización adecuada, con grupos reactivos, para su anclaje a la bio-macromolécula de estudio. En el caso de las proteínas sus residuos de triptófano o tirosina pueden actuar como antenas sensibilizadoras^{141, 164}. En estos casos, dada la dependencia de la sensibilización con la distancia, al igual que en los estudios FRET, la luminiscencia del lantánido se ha utilizado para medir distancias en estudios de dinámica de proteínas.

1.2. ANTECEDENTES INMEDIATOS

En el año 2013, dentro de un proyecto de investigación en moduladores de interacciones proteína-proteína, el grupo de investigación del Instituto de Química Médica (IQM) en el que se ha desarrollado el trabajo descrito en esta Memoria inició su incursión en el campo del desarrollo de sondas fluorescentes como herramientas para el estudio de interacciones proteína-proteína. Además del interés de esta temática para el desarrollo del mencionado proyecto, la incursión estuvo motivada por la reincorporación al grupo de investigación del Dr. Juan Antonio González Vera, mediante un contrato JAE Doc del CSIC, después de sus sucesivas estancias posdoctorales en los grupos de la Prof. Barbara Imperiali en el Massachusetts Institute of Technology (MIT, Cambridge, USA) y de la Prof. M^a Luz López Rodríguez en la Universidad Complutense de Madrid, ambos grupos expertos en el desarrollo de sondas y biosensores fluorescentes y en su utilización como herramientas para la identificación y validación de nuevas dianas terapéuticas, respectivamente. Durante su estancia en el grupo de la Prof Imperiali, el Dr. González Vera había estado trabajando en derivados de 8-hidroxiquinolina¹²⁷⁻¹³², tipo Sox, como reactivos de marcaje fluorescente de substratos peptídicos de quinasas, para el desarrollo de biosensores de estas enzimas, ya comentados en el apartado 1.1.7.

Con la reincorporación del Dr. González Vera al IQM, se inició una colaboración con la Prof. Imperiali para preparar fluoróforos con esqueleto híbrido entre el de quinolina presente en el Sox (Figura 17, **45**) y el de las naftalimidias (**B**), ambos de pequeño tamaño, y, como ya se ha comentado, muy frecuentes en diversos fluoroforos. En primer lugar, se planteó la síntesis de derivados de 9-hidroxi-quinolimida de formula general **A1**.



Figura 17. Diseño de derivados de 9-hidroxiquinolimida, quimeras quinolina-naftalimida

Las 9-hidroxiquinolimididas **A1** no fueron fluorescentes, ni emitían fluorescencia en presencia de cationes Mg^{2+} ($MgCl_2$) o de diversos cationes metálicos (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , Cu^+ , Ag^+ , Al^{3+}). Estos resultados indicaban que, a diferencia de los derivados tipo Sox, no se formaban quelatos fluorescentes en presencia del catión Mg^{2+} , presente en el centro activo de quinasas. La formación de quelatos mixtos con fosfatos, a través del grupo hidroxilo y del nitrógeno de la quinolina, es la base de la utilización del Sox en sensores de la actividad de quinasas. La falta de fluorescencia en las 9-hidroxiquinolimididas **A1** se podría explicar debido a que el efecto electroattractor del grupo imida retira carga del grupo hidroxilo, desfavoreciendo la formación de quelatos, o que, si se forma un quelato, disminuiría el carácter electrodonador del grupo hidroxilo y, por lo tanto, disminuiría la transferencia de carga (ICT) desde el hidroxilo hacia el grupo imida, que es el mecanismo de fluorescencia en las naftalimididas. Sin embargo, las 9-metoxiquinolimididas **A2**, sintetizadas como intermedios para la preparación de **A1**, si emitían fluorescencia y, como se describe en el capítulo 2.1 de esta Memoria, mostraron un comportamiento altamente solvatocrómico, superior al de las naftalimididas análogas, y su estudio constituye la base del desarrollo de esta tesis doctoral.

1.3. HIPÓTESIS DE DISEÑO DE QUINOLIMIDAS Y ANTENAS DE LANTÁNIDOS

Uno de los inconvenientes más frecuentes en la mayoría de los fluoróforos, es su baja solubilidad en agua¹⁸, que dificulta su utilización en medios fisiológicos, requiriendo la incorporación en su estructura de grupos que faciliten su solubilización. En el caso de las naftalimidias **B**, la introducción de un átomo de nitrógeno protonable, para dar lugar a las quinolimidas **A** (Figura 18), aumentaría significativamente la solubilidad en agua. Además, la introducción de un heteroátomo desplazaría las longitudes de onda de absorción y emisión máximas de las quinolimidas hacia el rojo, con respecto a las de las naftalimidias **B**¹⁶⁶.

Teniendo en cuenta estas consideraciones y tomando como punto de partida los antecedentes inmediatos comentados en el apartado anterior, se planteó la síntesis y el estudio de las propiedades fotofísicas de quinolimidas de estructura general **A**. Además, hay que señalar que, cuando se inició este proyecto de investigación, solo había un precedente sobre quinolimidas en la literatura. En el año 2004, Braña, M. F. *et al.*¹⁶⁷ habían descrito la síntesis y actividad antitumoral de derivados de 2-arilquinolimida.

Más recientemente, en el año 2014, se ha descrito la actividad de 2-metoxiquinolimidas como ligandos de receptores 5-HT₄¹⁶⁸ y derivados de 9-hidroxi-quinolimidas han sido patentados para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central (SNC) y de enfermedades oncológicas¹⁶⁹. Ninguno de estos antecedentes hacían mención a propiedades fotofísicas y utilización de quinolimidas como fluoróforos.

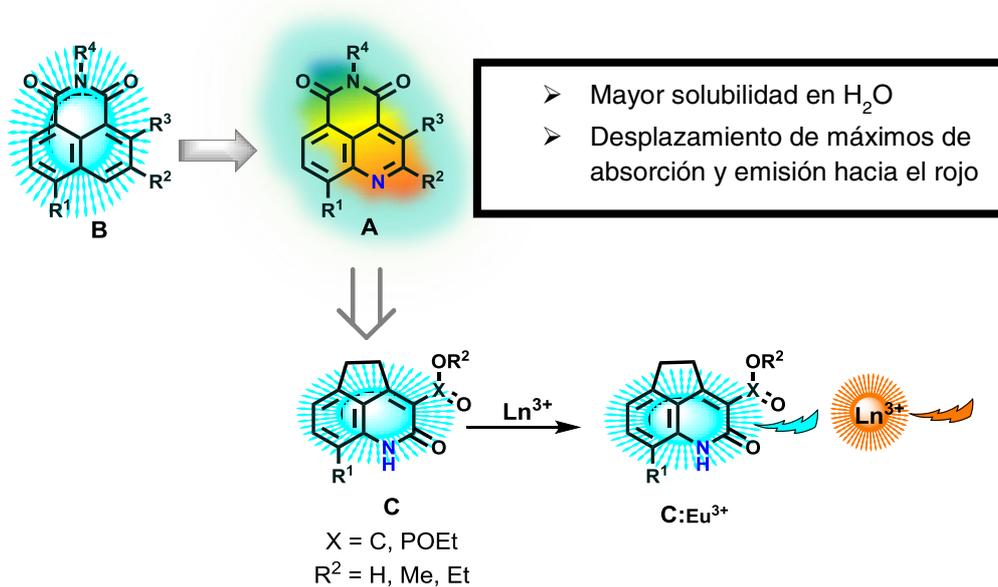


Figura 18. Hipótesis de diseño de quinolimidas y antenas de lantánidos

Por otra parte, el esquema de síntesis propuesto para la construcción del anillo de quinolimida contemplaba la utilización de las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas de fórmula general **C** como intermedios para su síntesis. Estos derivados de quinolin-2-ona tienen carácter β -dicarbonílico y, por lo tanto, podrían actuar como antenas de la fluorescencia de lantánidos.

1.4. OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido el desarrollo de sensores de fluorescencia como herramientas para el estudio de interacciones proteína-proteína y se encuadra en el marco de dos proyectos sucesivos desarrollados por el grupo de investigación del IQM en el que se ha realizado la tesis: “*Búsqueda de moduladores de interacciones proteína-proteína. Nuevas vías hacia fármacos novedosos*” (SAF2012-32209) y “*Herramientas para el estudio de interacciones proteína-proteína: Aplicación al estudio y validación de la proteína DREAM como diana terapéutica*” (BFU2015-67284-R). Teniendo en cuenta las hipótesis de diseño indicadas en el apartado anterior, este objetivo general se ha concretado en los siguientes objetivos específicos:

- a) Desarrollo de metodologías sintéticas apropiadas para la síntesis de quinolimidias diversamente sustituidas de fórmula general **A** y de derivados de quinolin-2-ona de fórmula general **C**, así como de los análogos de estas estructuras, necesarios para la optimización de las propiedades fotofísicas.
- b) Caracterización y determinación de las propiedades fotofísicas de los fluoróforos sintetizados, así como estudio de la influencia del disolvente, del pH o de la presencia de cationes sobre dichas propiedades fotofísicas.
- c) Síntesis de derivados adecuados para el marcaje fluorescente de péptidos y proteínas de los mejores fluoróforos obtenidos.
- d) Estudio de la aplicabilidad de los nuevos fluoróforos como herramientas para el desarrollo de biosensores, tales como biosensores de quinasas, agregación del péptido β -amiloide, H₂O o biotioles.

1.5. PLAN DE TRABAJO

Tal como se muestra de forma esquemática en la figura 19, la consecución de los objetivos propuestos se abordó mediante un plan de trabajo pluridisciplinar en el que se han coordinado estudios de síntesis, caracterización espectroscópica y análisis de difracción de rayos X, determinaciones fotofísicas, cálculos TD-DFT, y evaluación biológica *in vitro* e *in cellulo*.

En primer lugar, tras la correspondiente revisión bibliográfica, se llevó a cabo la puesta a punto y optimización de la metodología de síntesis de quinolimidas **A**, seguida de los primeros estudios de sus propiedades fotofísicas, mediante la determinación de los espectros de absorción UV y de emisión de fluorescencia en diversos disolventes. Los buenos resultados fotofísicos de las primeras quinolimidas sintetizadas fueron determinantes para abordar su cristalización, con el fin de obtener las estructuras tridimensionales mediante difracción de rayos X. Estos estudios se realizaron en colaboración con el grupo de la Dra. Lourdes Infantes del Instituto de Química Física Rocasolano (IQFR-CSIC) y se llevaron a cabo de forma paralela a estudios de cálculos TD-DFT, realizados en el IQM por el Prof. Ibon Alkorta, con la finalidad de correlacionar la estructura con las propiedades fotofísicas.

Las buenas propiedades fotofísicas de la 1ª serie de quinolimidas preparadas fueron también determinantes para su derivatización en reactivos adecuados para el marcaje de péptidos y proteínas, que fueron utilizados para el marcaje de secuencias peptídicas de la quinasa CDK5, implicada en glioblastoma y en el desarrollo de gliomas.

Introducción

Estos estudios se realizaron en colaboración con el grupo de la Dra. May C. Morris del Institut des Biomolécules Max Mousseron, (IBMM) de Montpellier en Francia. Los péptidos derivados de CDK5 marcados con quinolimidas fluorescentes fueron utilizados como sensores de la interacción CDK5 con la proteína que regula su actividad, denominada p25, tanto *in vitro* como *in cellulo*.

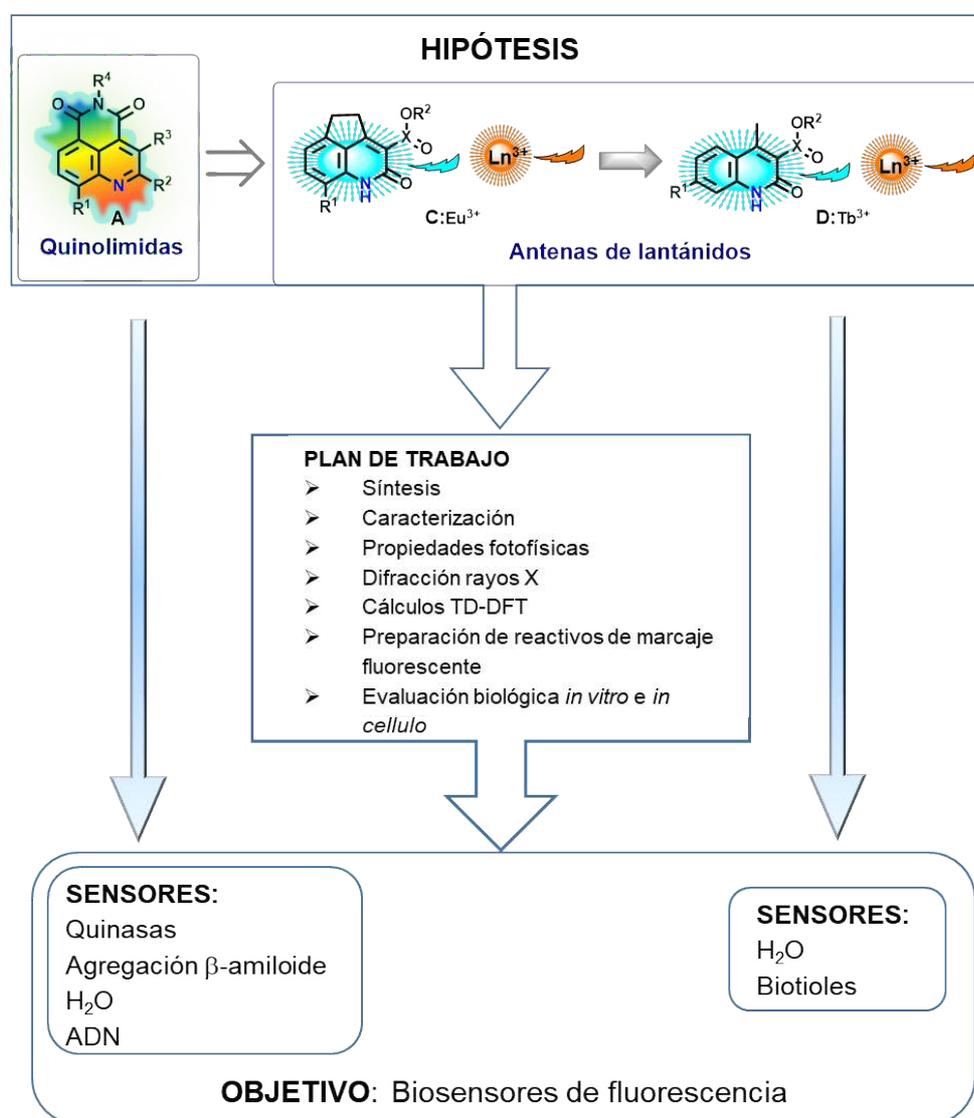


Figura 19. Esquema de Hipótesis de diseño, Plan de trabajo y Objetivos

Introducción

Por otra parte, las mejores quinolimidas fueron también utilizadas para el estudio de la agregación del péptido β -amiloide, en colaboración con el grupo de la Universidad de Granada que dirige el Dr. Ángel Orte en la Facultad de Farmacia. Por último, la introducción en el esqueleto de quinolimida de grupos capaces de quenchar su fluorescencia se planteó como vía para la obtención de sensores de H_2O , que se unen a ADN y han resultado buenas sondas para la visualización del núcleo celular.

Los resultados relativos al diseño, síntesis, caracterización y aplicación de quinolimidas como biosensores se comentan en los capítulos 2.1 y 2.2 de esta Memoria.

En cuanto a las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas **C**, intermedios necesarios en el esquema de síntesis propuesto para las quinolimidas (**A**), se planteó el estudio de sus propiedades fotofísicas en ausencia y presencia de lantánidos. Estos estudios indicaron un buen comportamiento como antenas de lantánidos y que también podrían tener aplicación como sensores de H_2O . Al igual que en el caso de las quinolimidas, se ha trabajado para la obtención de cristales adecuados para difracción de rayos X, tanto de las antenas solas como de sus complejos con lantánidos. Como antenas de lantánidos, se planteó la preparación de derivados adecuados para el marcaje de péptidos y su aplicación como sensores de biotioles (SH_2 , cisteína, homocisteína o glutatión). Además, con el fin de simplificar su estructura, se planteó la síntesis de análogos de tipo carbostirilo de fórmula general **D** y el estudio de sus propiedades fotofísicas. Estos estudios también fueron realizados en colaboración con el grupo del Dr. Ángel Orte de la Universidad de Granada y se comentan en el capítulo 2.3.

Por último, como es habitual en el grupo de investigación, todos los nuevos compuestos sintetizados fueron incluidos en los cribados HTS de citotoxicidad en diversas líneas celulares tumorales de la compañía farmacéutica PharmaMar, S.A. Hay que señalar que, para su aplicación en biosensores, los fluoróforos deben estar libres de citotoxicidad

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. NUEVOS FLUORÓFOROS SOLVATOCRÓMICOS DERIVADOS DE QUINOLIMIDA

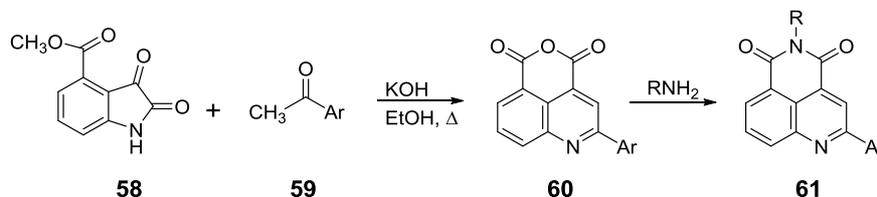
En este capítulo se describen los resultados de la síntesis y estudio de propiedades fotofísicas de nuevos fluoróforos solvatocrómicos derivados de quinolimida y los estudios preliminares para su aplicación en diversos biosensores.

2.1.1. Derivados de 9-metoxiquinolimidias

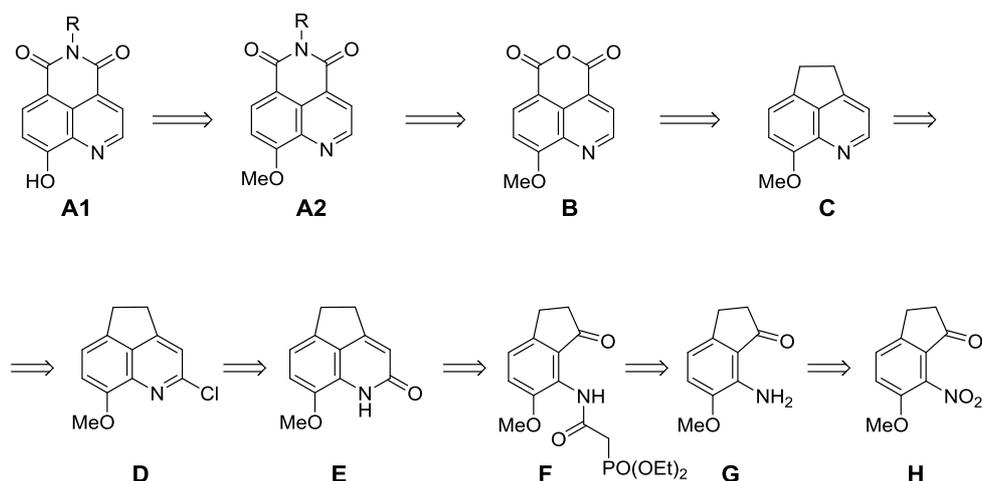
2.1.1.1. Síntesis

Como se ha comentado en los antecedentes inmediatos (apartados 1.2 y 1.3), cuando se inició el proyecto de síntesis de derivados de quinolimidas análogos de Sox¹²⁷⁻¹³² de fórmula general **A1** (Figura 17), solo había un precedente bibliográfico sobre la preparación de quinolimidas, el trabajo del grupo de Miguel Braña, en el que sintetizaban 2-aril-quinolimidas **61** (Esquema 1) a partir del correspondiente anhídrido del ácido 2-aril-quinolin-4,5-dicarboxílico **60**, que era obtenido por reacción de isatin-4-carboxilato de metilo (**58**) con arilmetilcetonas¹⁶⁷ (**59**). Los rendimientos descritos para los anhídridos **60** eran menores del 25 %. Estos bajos rendimientos, junto con la dificultad de adaptar el procedimiento para la obtención de las quinolimidas necesarias para la preparación de análogos de Sox **A1** (Figura 17), que requerían en posición 9 del anillo de quinolimida un grupo OMe, hicieron que se plantease un nuevo esquema para su síntesis. Esta metodología, que de forma retrosintética se indica en el Esquema 2, implicaba la utilización de la dihidrociclopenta[de]quinolina **C** como intermedio de síntesis.

La síntesis de **C** había sido descrita previamente en una patente del año 2009, como intermedio para la síntesis de derivados de quinolina inhibidores de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana¹⁷⁰.



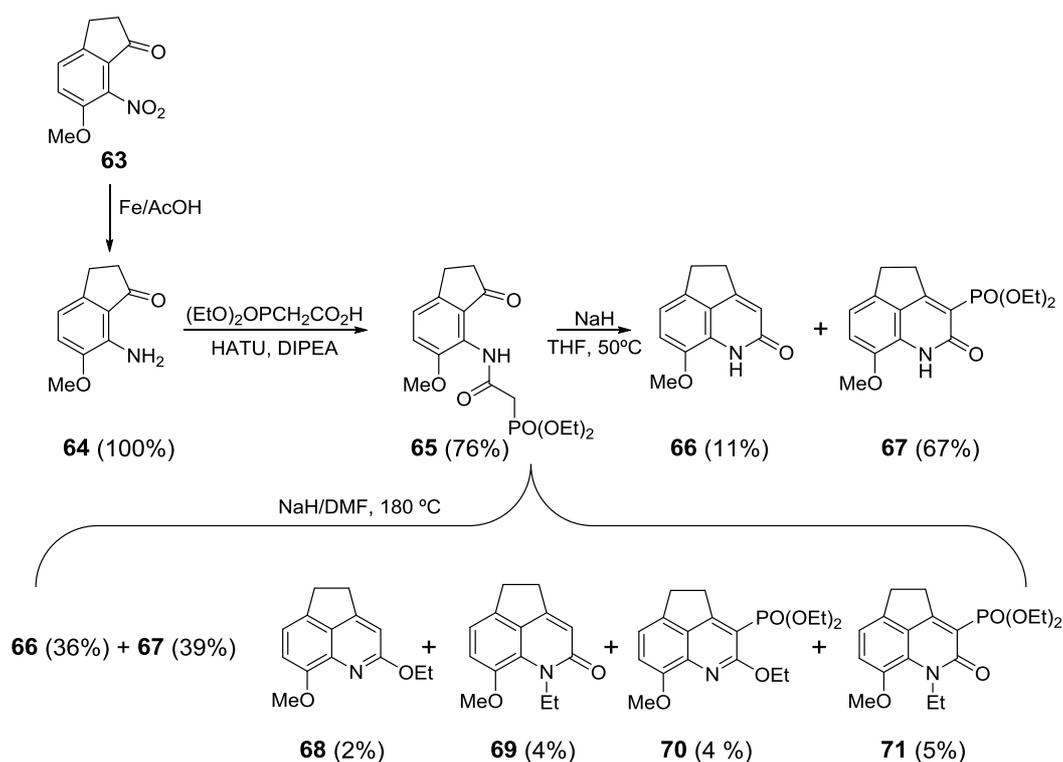
Esquema 1. Precedente bibliográfico para la síntesis de quinolimidaz



Esquema 2. Retrosíntesis propuesta para las quinolimidaz **A1** análogas de Sox

La aplicación del esquema de síntesis descrito para la dihidrociclopenta[de]quinolina **C** implicaba la reducción de la 7-nitro-dihidroindenona comercial **63** con virutas de hierro en ácido acético (Esquema 3), seguida de acilación de la amina **64** por reacción con el ácido dietilfosfonoacético y ciclación de la amida formada **65**, mediante una reacción intramolecular Wittig-Horner en presencia de NaH a 50 °C, obteniendo la dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona **66** en un 37 % de rendimiento. Sin embargo cuando

nosotros intentamos reproducir estos resultados, obtuvimos **66** como producto minoritario en un 11 %, junto con un 67 % del fosfonato **67**, que en la referida patente no se comentaba¹⁷⁰.



Esquema 3. Estudio de la síntesis de las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas **66** y **67**

Con el fin de mejorar el rendimiento de la dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona deseada **66**, se realizó un estudio de condiciones de reacción, variando la base (NaH, DIEA, DBU, DBU/LiCl, LiOH, Cs₂CO₃, y K^tBuO), el disolvente (THF, DMF y CH₃CN), la temperatura y el tiempo de reacción, determinando proporciones de productos de reacción por HPLC-MS. Como se muestra de forma resumida en la de Tabla 1, al bajar la temperatura de reacción (entrada 2) disminuyeron los rendimientos, tanto de **66** como de **67**, mientras que al aumentarla hasta 180 °C, por irradiación con microondas, aumentó significativamente el rendimiento de **66** hasta igualarse al del fosfonato **67** (entrada 5). En cuanto a la base, el NaH a alta temperatura fue el que dio mejor

rendimiento de **66**, y hay que señalar que la utilización conjunta de DBU y cloruro de litio a temperatura ambiente condujo exclusivamente al fosfonato **67** con rendimiento cuantitativo (entrada 9). También hay que señalar que, cuando la ciclación se realizó en DMF en presencia de NaH, además de las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas **66** y **67** (entrada 5), se aislaron trazas de los productos de *O*- y *N*-etilación (**68**, **70** y **69**, **71**, Esquema 3).

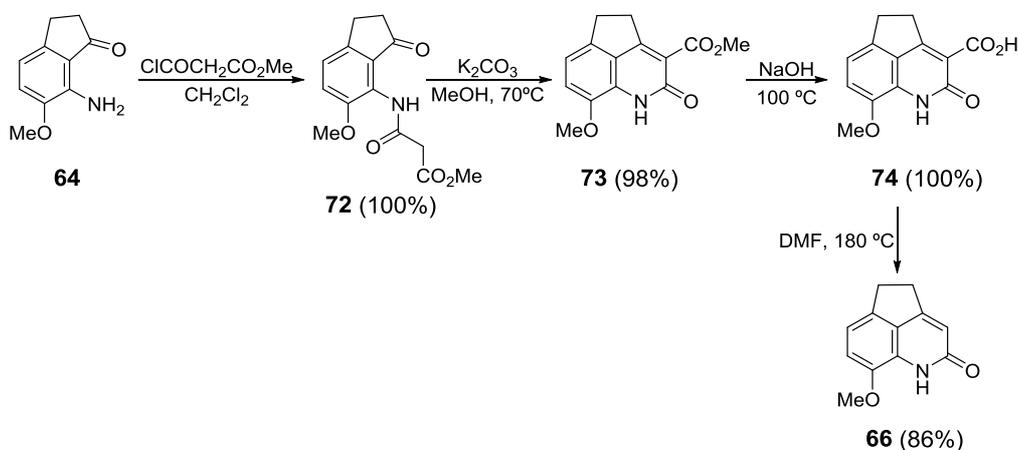
A la vista de las dificultades para la obtención de la dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona **66** como producto mayoritario a partir del fosfonato **65**, se estudió la alternativa para prepararla a partir de la amida del ácido malónico **72**, obtenida con rendimiento cuantitativo mediante acilación de la 7-amino-dihidroindenona **64** con 3-cloro-3-oxopropionato de metilo (Esquema 4). En este caso, la ciclación de la amida **72** por calefacción a reflujo de MeOH en presencia de K₂CO₃ dio lugar exclusivamente a la 3-metoxicarbonil-dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona **63** con un 98 % de rendimiento. La posterior saponificación del éster en **73**, seguida de descarboxilación condujo a **66** con un rendimiento global del 84 % desde **64**.

Tabla 1. Estudio de condiciones de ciclación del fosfonato **65**

Entrada	Base	Disolvente	T (°C)	t	Rendimiento ^a	
					66	67
1	HNa	THF	50	2 h	37 ^b , 11 ^c	67 ^c
2	HNa	THF	25	24 h	2	21
3	HNa	THF	100 (MW)	5 min	40	57
4	HNa	THF	125 (MW)	5 min	34, 26 ^c	66, 63 ^c
5	HNa	DMF	180 (MW)	5 min	40, 40 ^c	60, 41 ^c
6	DIEA	DMF	25	24 h	0	0
7	LiOH	THF	50	30 min	4	88
8	DBU	THF	100 (MW)	1 h	52	34
9	DBU/LiCl	THF	25	24 h	0	100
10	Cs ₂ CO ₃	THF	70	30 min	11	89
11	K ^t BuO	THF	100 MW	5 min	5	95

^a Rendimiento calculado por HPLC. ^b Rendimiento bibliográfico, ^c Rendimiento aislado

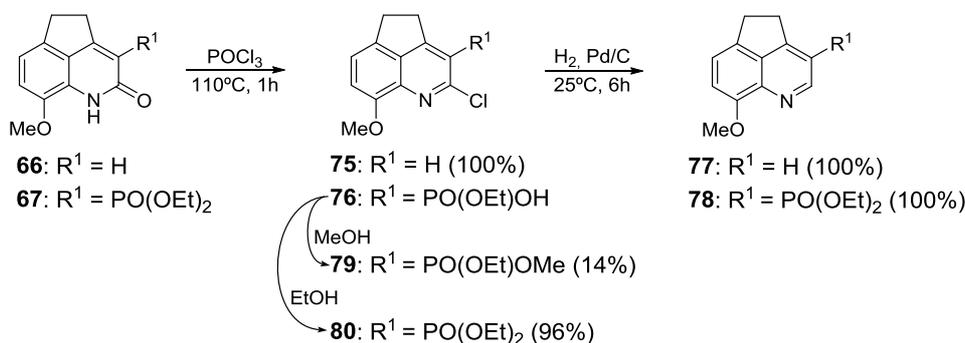
Resultados y Discusión



Esquema 4. Optimización de la síntesis de la dihidroclopenta[de]quinolin-2-ona **66**

Una vez optimizada la síntesis de la dihidroclopenta[de]quinolin-2-ona **66**, como se muestra en el Esquema 5, aplicando la metodología ya descrita¹⁷⁰, tanto a **66** como al fosfonato **67**, se llevó a cabo su aromatización por reacción con POCl_3 , para obtener las correspondientes 2-cloro-dihidroclopenta[de]quinolinas **75** y **80**, seguida de deshalogenación mediante hidrogenación catalizada por $\text{Pd}(\text{C})$ al 10 %, obteniendo con muy buenos rendimientos las dihidroclopenta[de]quinolinas **77** y **78**. Hay que señalar que en el HPLC-MS de la reacción del fosfonato de dietilo **67** con POCl_3 solo se observó un pico correspondiente al monoácido **76** y que, cuando este ácido se intentó purificar por cromatografía en columna con gradiente de MeOH en CH_2Cl_2 , únicamente se aisló un 14 % del correspondiente éster metílico **79**, resultado de esterificación con el MeOH de la cromatografía.

Con el fin evitar la monohidrólisis del diéster etílico **80** y la transesterificación con MeOH en el procesamiento de la reacción con POCl_3 , tras ésta, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se agitó con EtOH durante 16 horas, obteniendo de esta forma el éster dietílico deseado **80** con un 96 % de rendimiento.



Esquema 5. Síntesis de las dihidrociclopenta[de]quinolinas **77** y **78**

Una vez optimizada la síntesis de las 8-metoxiquinolinas **75-80** se llevó a cabo la optimización de la metodología para la preparación de los correspondientes anhídridos, precursores de las quinolimidas deseadas. Inicialmente, se intentó la oxidación con agentes oxidantes moderados, tales como NaOH/H₂O₂¹⁷¹ o NaClO/^tBuO₂H¹⁷². Sin embargo, en todos los casos se recuperó el producto inicial inalterado. A la vista de estos resultados, se planteó llevar a cabo la oxidación con CrO₃^{171, 173}. Tal como se muestra en el Esquema 6, el análisis por HPLC-MS del tratamiento de **77**, **78**, **75** y **80** con 2 equivalentes de CrO₃ en Ac₂O a 110 °C durante 1 hora, indicó, en cada caso, la formación de las dicetonas **81-84** como productos mayoritarios (≈70%) junto con un ≈30% de los anhídridos deseados **85-88**. Sin embargo, cuando la proporción de CrO₃ se incrementó a 8 equivalentes y la oxidación se realizó en mezcla 5:1 de Ac₂O/AcOH, se obtuvieron los anhídridos como únicos productos de reacción y se mejoró su purificación, consistente en evaporación del disolvente a sequedad, seguida de tratamiento del residuo con CH₂Cl₂ a 40 °C durante 10 minutos y, finalmente, filtración de la suspensión sobre Clarcel[®], para eliminar los residuos del CrO₃.

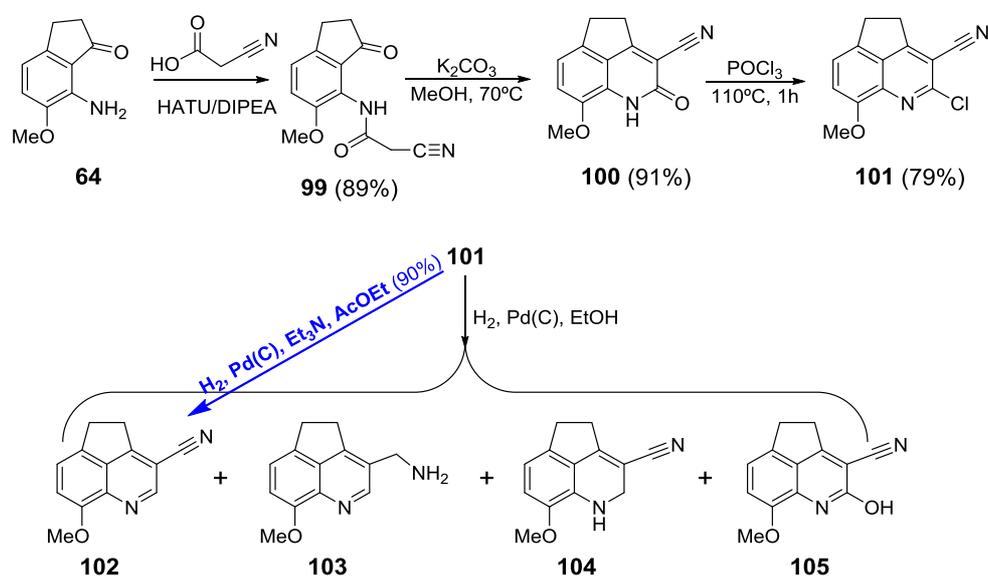
Los anhídridos **85-88** no fueron estables en la gel de sílice de cromatografía, lo que dificultó su purificación cromatográfica. Por ello, se utilizaron sin purificación adicional para la etapa siguiente de síntesis de quinolimidas.

Inicialmente, la síntesis de la quinolimida **90** se intentó aplicando las condiciones previamente descritas para la síntesis de naftalimidias, consistentes en reacción del anhídrido y amina correspondientes en EtOH a reflujo¹⁷⁴. En estas condiciones, la reacción de **85** con 1.1 equivalentes de etanolamina condujo a un 20 % de la quinolimida deseada **90**, rendimiento que no aumentaba al aumentar el tiempo de calefacción. Por ello, se aumentó la proporción de etanolamina a 2 equivalentes y la temperatura de reacción a 120 °C mediante irradiación por microondas. En estas condiciones, el rendimiento de **90** aumentó significativamente al 40 %, pero esta quinolimida se obtenía junto con la correspondiente 9-amino-quinolimida **A**, resultante de la sustitución del grupo OMe por la amina R³-NH₂. A continuación, se determinó que la proporción adecuada de amina para maximizar el rendimiento de la 9-metoxi-quinolimida **90** y minimizar el rendimiento de su respectivo 9-amino derivado **A** era 1.5 equivalentes de hidroxietilamina. Aplicando estas condiciones se sintetizaron las 9-metoxi-quinolimidas **90-98** con los rendimientos indicados en el Esquema 7. La síntesis de las 9-amino-quinolimidas se comentará en el capítulo siguiente (2.1.2).

2.1.1.2. Síntesis de 3-ciano-quinolimidas

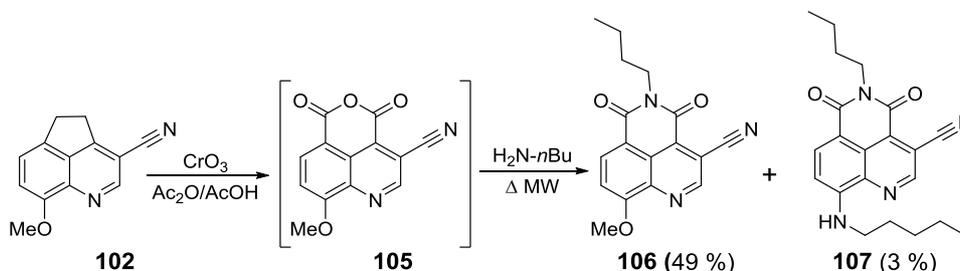
El grupo ciano ha sido utilizado frecuentemente en el diseño de fluoróforos¹⁷⁵⁻¹⁸⁰, debido, por una parte, a que su carácter electro-aceptor potencia la transferencia interna de carga (ICT) y, por otra, a que al ser portador de electrones π , en conjugación con el núcleo aromático del fluoróforo, incrementa el número de electrones π del sistema, disminuyendo la energía del estado excitado y, por lo tanto, induce desplazamientos batocrómicos en la emisión de fluorescencia. Teniendo en cuenta estas características, una vez puesta a punto la metodología de síntesis de quinolimidas **90-98**, se planteó explorar mediante esta metodología la síntesis de análogos portadores de un grupo ciano en posición 3, en lugar del grupo fosfonato presente en **91**, **93**, **95**, **97** ó **98**. Esta exploración suponía la incorporación del grupo ciano desde las primeras etapas de la síntesis, en la acilación de la 7-amino-dihidroindenona **64** con el ácido cianoacético (Esquema 8). La aplicación de este esquema de reacción dio los resultados esperados hasta llegar a la obtención de la de la 2-cloro-dihidropentaciclo[de]quinolina **101** con un rendimiento global del 55 %. Este compuesto es muy insoluble, lo que dificultó su manipulación química posterior. De hecho, su baja solubilidad imposibilitó la obtención

de su espectro de ^{13}C -RMN, incluso en $\text{DMSO}-d_6$ y dificultó su deshalogenación para la obtención de la 3-ciano-dihidrociclopenta[de]quinolina **102**. Inicialmente, la hidrogenación de **101** se intentó en las condiciones habituales, utilizando Pd(C) como catalizador y EtOH como disolvente. Sin embargo, debido a la baja solubilidad de **101**, la conversión era muy baja, obteniendo una mezcla de diversos productos de reducción, en cuyo HPLC-MS se observaron picos cuyas masas podrían corresponder con las de los compuestos **102-105** indicados en el Esquema 8. Por ello, fue necesario realizar un estudio de condiciones de hidrogenación. En primer lugar, se realizó una selección de disolventes para mejorar la solubilidad, seleccionando acetato de etilo, en el que, además, la hidrogenación del grupo ciano para dar **103** estaría menos activada. Por otra parte, dado que en la hidrogenación se liberaría HCl, que activaría esta hidrogenación del grupo ciano, se adicionaron dos equivalentes de Et_3N para captar el HCl que se genera. De esta forma, la 3-ciano-ciclopentaquinolina deseada **102** se obtuvo con un 90%.



Esquema 8. Síntesis de la 3-ciano-dihidrociclopenta[de]quinolina **102**

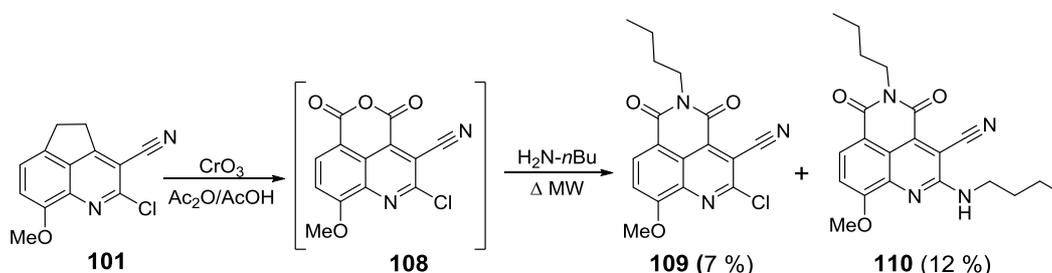
La oxidación de **102**, por tratamiento con CrO_3 a 110°C en mezcla (5:1) de anhídrido acético y ácido acético, condujo al correspondiente anhídrido **105** (Esquema 9), que, al igual que se ha indicado para los anhídridos análogos **85-88**, su inestabilidad imposibilitó su aislamiento y purificación. Por lo cual, el crudo de reacción se utilizó tal cual para la reacción posterior de formación de quinolimidas por reacción con 1.5 equivalentes de butilamina bajo calefacción a 120°C , mediante irradiación de microondas, utilizando EtOH como disolvente. En esta reacción se obtuvo la 9-metoxi-quinolimida deseada **106** en un 49 % de rendimiento, junto con un 3% de la 9-butilamino-quinolimida **107**, en la que el grupo OMe se había sustituido por butilamina mediante una reacción de sustitución nucleófila aromática¹⁸¹.



Esquema 9. Síntesis de las 3-ciano-quinolimidas **106** y **107**

Dado que los halógenos, concretamente el Cl, generalmente, inducen desplazamientos batocrómicos tanto en la $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ como en la $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$, como se había observado en las quinolimidas precedentes **92** y **93** ($\text{R}^2 = \text{Cl}$), se planteó también la preparación y estudio de 2-cloro-3-ciano-quinolimidas. Para ello, tal como se indica en el Esquema 10, se llevó a cabo la oxidación de la 2-cloro-3-ciano-dihidrociclopenta[de]quinolina **101** en las condiciones ya comentadas y la posterior reacción con butilamina. De esta forma se obtuvo la quinolidimida deseada **109**, pero con muy bajo rendimiento (7%), junto con un 12% de la 2-butilamino-3-ciano-quinolimida **110** en la que, además de formarse la imida, había tenido lugar la sustitución del átomo de Cl por butilamina, a través de una sustitución nucleófila aromática¹⁸²⁻¹⁸⁴. Ni modificando

condiciones de oxidación ni de formación de la imida fue posible mejorar los bajos rendimientos de **109** y **110**, posiblemente debido a la alta inestabilidad del anhídrido **108**.

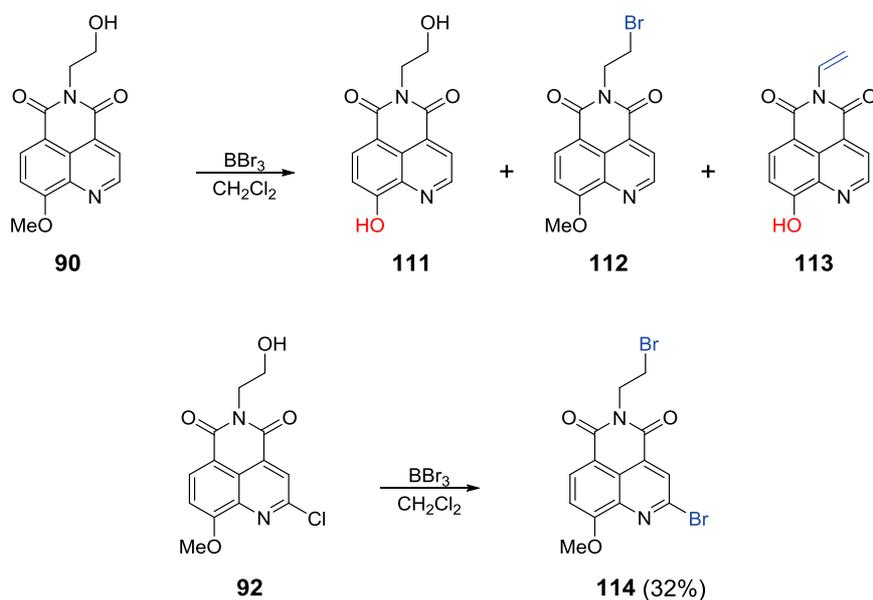


Esquema 10. Síntesis de las 3-ciano-quinolimidias **109** y **110**

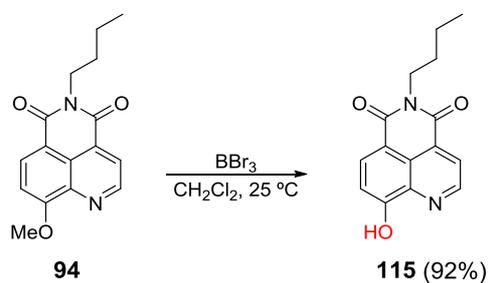
2.1.1.3. Síntesis de 9-hidroxi-quinolimidias análogas de Sox

Con el fin de obtener las quinolimidias análogas de Sox comentadas en los antecedentes inmediatos de fórmula general **A1**, se estudió la desmetilación de las 9-metoxi-quinolimidias **90** y **92**, portadoras de cadena de hidroxietilo en posición 5, mediante tratamiento con BBr_3 en CH_2Cl_2 anhidro (Esquema 11). Sin embargo, cuando este tratamiento se realizó con exceso de BBr_3 a temperatura ambiente la conversión fue muy baja y, en el caso de **90**, el análisis del crudo de reacción indicó la presencia de un 26 % del producto deseado **111**, junto con un 16 % el derivado bromado en la cadena de hidroxietilo **112**. Cuando la reacción se intentó irradiando con microondas a 100 °C, en el crudo de la reacción se identificó además la presencia del producto de β -eliminación **113**. No fue posible el aislamiento de ninguno de los productos de reacción. En el caso de la 2-cloro-quinolimida **92**, a temperatura ambiente, únicamente se obtuvo el derivado dibromado **114**, en el que además de la bromación en la cadena de hidroxietilo se había producido la sustitución del cloro de la posición 2 por bromo.

En vista de las dificultades para la desmetilación selectiva de las quinolimidias portadoras de una cadena de hidroxietilo en posición 5 **90** y **92**, esta reacción se estudió en la 9-metoxi-quinolimida **94**, portadora de una cadena de *n*-butilo. En este caso, el tratamiento de **94** con BBr_3 en CH_2Cl_2 anhidro a temperatura ambiente dio lugar a la 9-hidroxi-quinolina deseada **115** con un 92 % de rendimiento (Esquema 12)



Esquema 11. Estudio de la desmetilación de las 9-metoxi-quinolimidas **90** y **92**



Esquema 12. Síntesis de la 9-hidroxi-quinolimidamide **115**

2.1.1.4. Propiedades fotofísicas

En primer lugar, se estudiaron las propiedades de absorción y emisión de luz de la 9-hidroxi-quinolimidamide **115** en distintos disolventes. Como se muestra en la Figura 20A, el espectro de absorción UV de esta quinolimidamide variaba significativamente con el disolvente, mostrando un único máximo de absorción a 381-383 nm en los disolventes

más apolares como tolueno, CHCl_3 o dioxano. En disolventes más polares, como EtOH, trifluoroetanol, MeOH o DMSO, mostraba dos máximos a 389 y 469-519 nm y en H_2O un único máximo que dependía del pH, a 378 a pH básico, a 422 a pH ácido y a 469 nm a pH neutro.

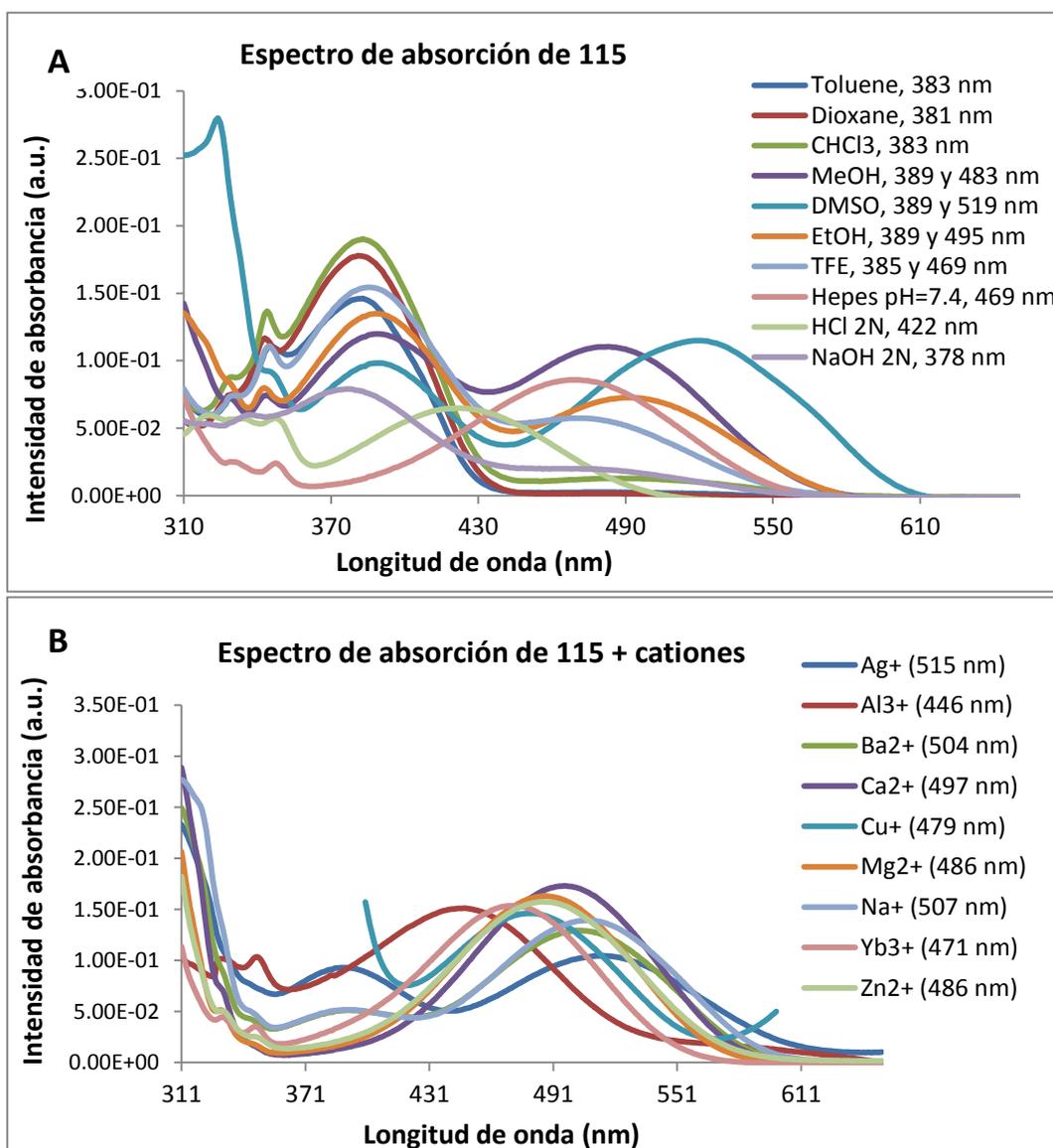
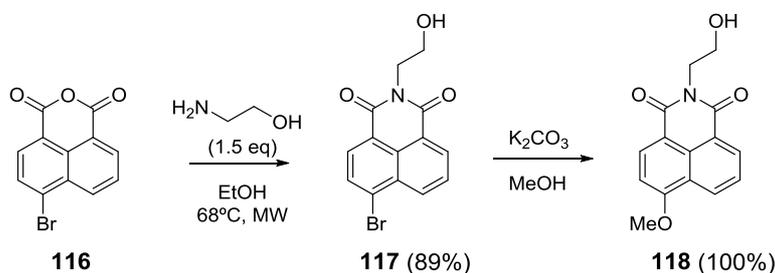


Figura 20. (A) Espectros de absorción UV de una disolución $166 \mu\text{M}$ de **115** en distintos disolventes. (B) Espectros de absorción UV de una disolución $166 \mu\text{M}$ de **115** en DMSO tras la adición de diversos cationes

En ninguno de los disolventes se observó emisión de fluorescencia al excitar en el máximo de mayor λ^{abs} . El espectro de absorción variaba también con la adición de diferentes cationes (Ag^+ , Al^{+3} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Cu^+ , Mg^{+2} , Na^+ , Yb^{3+} y Zn^{2+}), como se muestra en la figura 20B para el espectro UV de **115** en DMSO. En ningún caso se observó aumento de fluorescencia con la adición de cationes. En vista de estos resultados, aunque las 9-hidroxi-quinolimididas análogas de Sox podrían utilizarse como sensores colorimétricos, fueron desestimadas como fluoróforos. Por el contrario, las 9-metoxi-quinolimididas **90-98**, **106**, **107**, **109** y **110** si emitían fluorescencia intensa, mostrando un comportamiento altamente solvatocrómico como se comenta a continuación.

En primer lugar se determinaron las propiedades fotofísicas de las quinolimididas portadoras de una cadena de hidroxietilo en la posición 5 **90-93**, registrando sus espectros de absorción y emisión en disolventes de polaridad creciente y, con el fin de valorar sus propiedades, éstas se compararon con las de la naftalimida análoga **118**, que fue preparada a partir del anhídrido del ácido 4-bromo-1,8-naftálico de origen comercial **116**, aplicando el procedimiento previamente descrito en la bibliografía¹⁸⁵ e indicado en el Esquema 13.

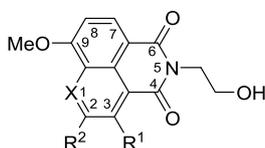


Esquema 13. Síntesis descrita de la 4-metoxi-naftalimida **118**¹⁸⁵

En los espectros de absorción UV se determinaron las longitudes de absorción máxima (λ_{max}^{abs}) y los coeficientes de extinción molar (ϵ), mientras que en los espectros de emisión se determinaron las longitudes máximas de emisión (λ_{max}^{em}) y los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F). Estos valores para **90-93** y **118** en los disolventes más significativos se recogen en la Tabla 2, en la que también se recogen las λ_{max}^{abs} y λ_{max}^{em} calculadas en el vacío, tal como se comenta más abajo en el apartado 2.1.1.5.

Resultados y Discusión

Tabla 2. Propiedades fotofísicas de la 4-metoxi-naftalimida **118** y de las 9-metoxi-quinolimidias análogas **90-93**



Compd ^a	Disolvente	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_F^b
118	Tolueno	362	12251	425	0.64
X = CH	Dioxano	360	12085	425	0.61
R ¹ = H	MeOH	366	12794	442	0.57
R ² = H	DMSO	368	11898	442	0.47
	H ₂ O	377	6770	457	0.61
	Calculado a vacío ^c	346		390	
90	Tolueno	377	7873	455	0.90
X = N	Dioxano	372	8649	460	0.67
R ¹ = H	MeOH	375	6760	490	0.28
R ² = H	DMSO	377	6849	490	0.03
	H ₂ O	381	8776	503	0.04
	Calculado a vacío ^c	365		434	
91	Tolueno	395	4939	484	0.46
X = N	Dioxano	390	4252	487	0.54
R ¹ = PO(OEt) ₂	MeOH	397	5157	514	0.06
R ² = H	DMSO	397	4325	510	0.01
	H ₂ O	403	3752	525	0.01
	Calculado a vacío ^c	382		463	
92	Tolueno	381	7555	467	0.83
X = N	Dioxano	376	7023	470	0.67
R ¹ = H	MeOH	379	7562	500	0.12
R ² = Cl	DMSO	382	4399	504	0.01
	H ₂ O	385	2740	510	0.03
	Calculado a vacío ^c	371		446	
93	Tolueno	401	4476	494	0.52
X = N	Dioxano	404	5280	503	0.31
R ¹ = PO(OEt) ₂	MeOH	411	3997	525	0.007
R ² = Cl	DMSO	395	3725	527	0.0003
	H ₂ O	402	3435	536	0.001
	Calculado a vacío ^c	391		483	

^aMedidos en duplicado a una concentración 12 μ M, excepto **118**, que fue medido a una concentración 7.5 μ M.

^bRendimientos cuánticos calculados con referencia al sulfato de quinina (en 0.1 M de H₂SO₄), excepto **91** y **93** que fueron calculados con referencia a la cumarina 102 (en EtOH). ^cTD-DFT cálculos en vacío.

En la comparación de los datos de UV de las 9-metoxi-quinolimidias **90-93** con los de la naftalimida análoga **118**, se observa que la sustitución del esqueleto de naftalimida por quinolimida produjo un pequeño desplazamiento batocrómico (4-15 nm) en la $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ y, excepto en agua, un 30-35% de disminución en el coeficiente de extinción molar. La introducción del átomo de Cl en posición 2 dio lugar a un pequeño desplazamiento batocrómico en $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (**92 vs 90**), desplazamiento que fue muy significativo (17-22 nm) al introducir un grupo fosfonato en la posición 3 (**91 vs 90** y **93 vs 90**).

Con respecto a la emisión de fluorescencia, los derivados de quinolimida mostraron un mayor comportamiento solvatocrómico que la naftalimida **118**. Así, como se muestra en la Figura 21 y en la Tabla 2, en la quinolimida **90** se observó un desplazamiento de 48 nm hacia el rojo en la $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ y una disminución de 22 veces en el rendimiento cuántico de fluorescencia al pasar de tolueno a H₂O, mientras que en **118** el desplazamiento en la $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ fue de 32 nm y la variación en el rendimiento cuántico fue insignificante. Por otra parte, la introducción de Cl en posición 2 produjo un desplazamiento adicional de 7-12 nm y la introducción del grupo fosfonato en 3 dio lugar a un desplazamiento adicional de 22-29 nm. La introducción de estos grupos electroattractores aumento la sensibilidad de la fluorescencia a la polaridad del disolvente. Por ejemplo, el rendimiento cuántico de **93** disminuyó 520 veces al pasar del tolueno ($\Phi = 0.52$) al H₂O ($\Phi = 0.001$). Los desplazamientos batocrómicos en las $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ de las quinolimidias **90-93** con respecto a la naftalimida **118** se traducen en mayores desplazamientos de Stokes.

Al comparar los datos fotofísicos de las quinolimidias **90-96**, con diferente sustituyente en el nitrógeno imídico (**90 vs 94 y 96; 91 vs 95**), recogidos en las Tablas 2 y 3, no se observa influencia significativa de este sustituyente sobre las propiedades fotofísicas.

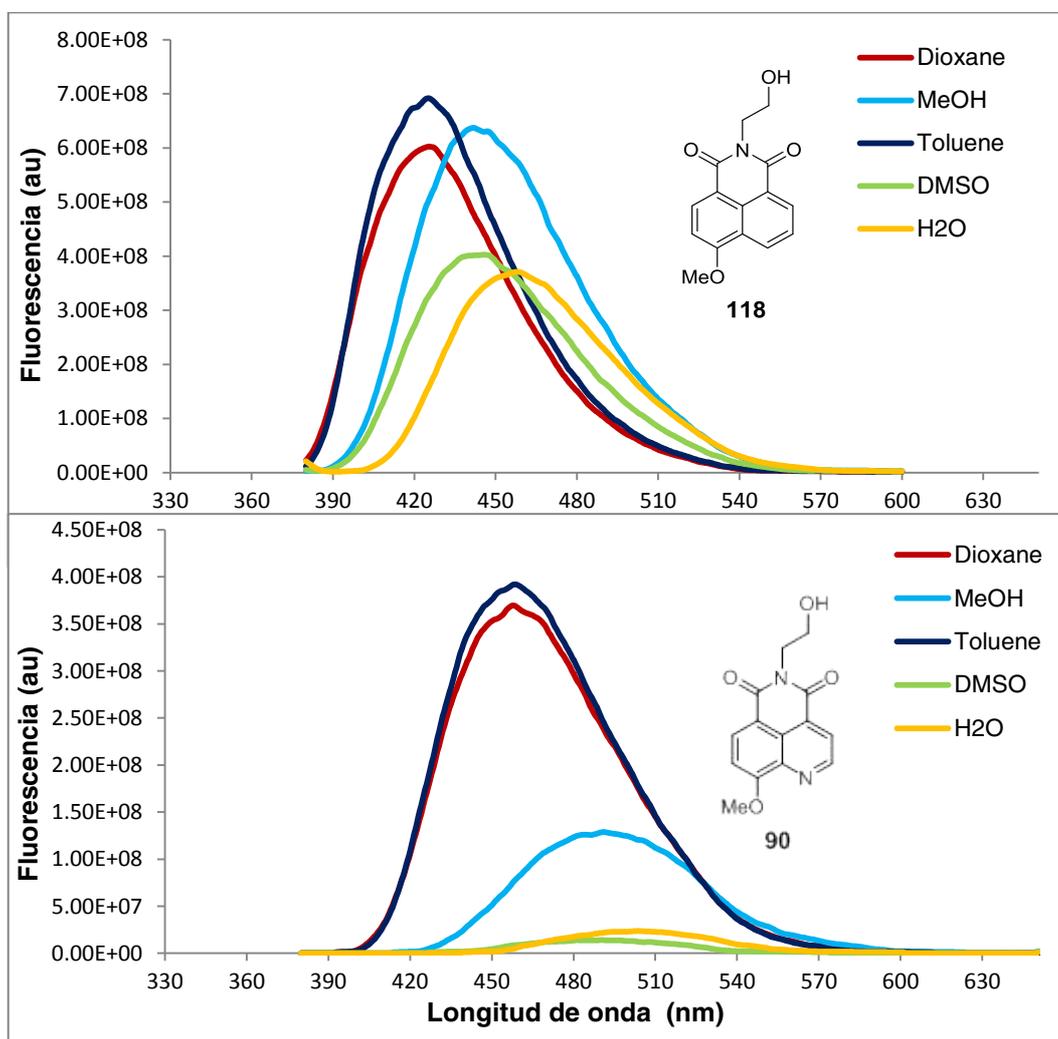
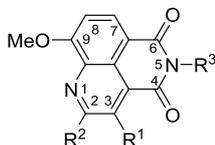


Figura 21. Espectros de emisión de una concentración $7.5 \mu\text{M}$ de la 4-metoxi-naftalimida **118** y de una concentración $12 \mu\text{M}$ de la 9-metoxi-quinolimid **90**

El mayor comportamiento solvatocrómico de las quinolimidas con respecto a la naftalimida análoga **118** podría explicarse debido a una mayor relajación no radiativa de los estados excitados de las quinolimidas en disolventes polares. Esta relajación estaría facilitada por la presencia del nitrógeno en el cromóforo tricíclico de las quinolimidas, que podría participar en interacciones de enlaces de hidrógeno o de solvatación con los disolventes polares.

Tabla 3. Propiedades fotofísicas de las 9-metoxi-quinolimidias **94-96**

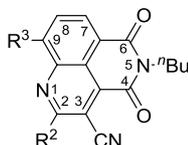


Compd ^a	Disolvente	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_F ^b
94	Tolueno	373	10166	454	0.99
$R^1 = H$	Dioxano	370	10640	461	0.79
$R^2 = H$	MeOH	373	6961	495	0.38
$R^3 = nBu$	DMSO	378	9898	492	0.05
	H ₂ O	379	2889	510	0.10
95	Tolueno	393	4618	475	0.98
$R^1 = PO(OEt)_2$	Dioxano	387	5814	485	0.62
$R^2 = H$	MeOH	396	4981	515	0.06
$R^3 = nBu$	DMSO	396	4924	516	0.01
	H ₂ O	406	3830	518	0.02
96	Tolueno	374	5089	455	0.71
$R^1 = H$	Dioxano	370	5125	461	0.59
$R^2 = H$	MeOH	372	4778	490	0.28
$R^3 = (CH_2)_2NHBoc$	H ₂ O	379	2897	500	0.13

^aMedidos en duplicado a una concentración 12 μM . ^bRendimientos cuánticos calculados con referencia a la cumarina 102 (en EtOH).

Las 3-ciano-quinolimidias **106-110** no fueron solubles en H₂O por lo que sus propiedades fotofísicas fueron determinadas en tolueno, dioxano, MeOH y DMSO y se muestran en la Tabla 4. Al comparar los datos de la 3-cianoquinolimida **106** con los de **94**, se observa que, como era de esperar, la introducción del grupo ciano en posición 3 induce un significativo desplazamiento batocrómico en todos los disolventes tanto en la $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (≈ 30 nm) como en la emisión (la emisión pasa del azul al amarillo ≈ 35 -46 nm), aunque también con una importante disminución en los coeficientes de extinción molar. Se mantiene el importante comportamiento solvatocrómico, con un desplazamiento de 62 nm en la $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ al pasar del tolueno al MeOH y una disminución en 55 veces en el rendimiento cuántico. La disminución de la emisión al aumentar la polaridad del disolvente fue tan grande que en DMSO no se observó fluorescencia.

Tabla 4. Propiedades fotofísicas de las 3-ciano-quinolimidias **106-110**



Compd ^a	Disolvente	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_F^b
106	Tolueno	400	3413	489	0.983
	R ² = H Dioxano	397	4127	501	0.665
	R ³ = OMe MeOH	402	3500	541	0.018
	DMSO	402	4522	No emisión	
107	Tolueno	489	1701	No emisión	
	R ² = H Dioxano	500	1971	No emisión	
	R ³ = NH ⁿ Bu MeOH	521	1406	No emisión	
	DMSO	522	1339	No emisión	
109	Tolueno	408	2236	500	0.670
	R ² = Cl Dioxano	402	3121	506	0.290
	R ³ = OMe MeOH	408	2300	530	0.034
	DMSO	412	2505	463	0.030
110	Tolueno	383, 472	2990	528	0.695
	R ² = NH ⁿ Bu Dioxano	368, 474	2542	539	0.635
	R ³ = OMe MeOH	380, 487	2500	577	0.055
	DMSO	383, 490	2731	518, 561	0.122

^aMedidos en duplicado a una concentración 12 μM . ^bRendimientos cuánticos calculados con referencia a la cumarina 153 (en EtOH).

Al comparar los datos de **106** con los del análogo portador de un grupo PO(OEt)₂ en lugar del grupo ciano **95**, se observa que los efectos batocrómicos y solvatocrómicos de este grupo son incluso mayores que los observados para el grupo fosfonato, seguramente debido a que el grupo ciano aporta su carácter π , además de su efecto electroattractor como el fosfonato. La sustitución del grupo OMe de **106** por el grupo NH-*n*Bu en la quinolimida **107** indujo un gran desplazamiento batocrómico de 89-120 nm en la $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$, motivado por el aumento en el carácter dador de electrones que supone esta sustitución, aunque los coeficientes de extinción molar disminuyeron significativamente, no observándose emisión, posiblemente, por efecto quenching entre los grupos ciano y NH-*n*Bu¹⁸⁰. La presencia del átomo electroattractor Cl en la posición 2 de la cianoquinolimida **109**, al igual que ya se ha comentado para **90-93**, produjo un pequeño

desplazamiento batocrómico (6-8 nm), no significativo, tanto en la $\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ como en la $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$. Sin embargo, la sustitución de este átomo de Cl por el grupo electrodonador NH-*n*Bu en **110**, indujo efectos similares a los producidos por la introducción de este sustituyente en la posición 9 de **107**, aunque no fueron tan acusados y no se llegó a perder la fluorescencia por completo. De hecho, en disolventes apolares (tolueno y dioxano) **107** mantuvo unos buenos rendimientos cuánticos de fluorescencia >0.6 en la zona del naranja en disolventes apolares. Hay que señalar que, esta quinolimida mostró dos máximos de absorción en todos los disolventes y en DMSO dos máximos de emisión. Esto indicaría la existencia de dos estados excitados de energías muy próximas. El buen comportamiento solvatoocrómico en disolventes no polares de las cianoquinolimidas **106** y **110**, en rangos de emisión en amarillo y naranja, respectivamente, les convierte en sondas de potencial interés para el estudio de interacciones proteína-proteína, aunque su aplicabilidad estaría dificultada por los bajos rendimientos de su síntesis.

En la figura 22 se muestran de forma gráfica las $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ y los rendimientos cuánticos de las quinolimidas aquí descritas en comparación con una naftalimida análoga **118**.

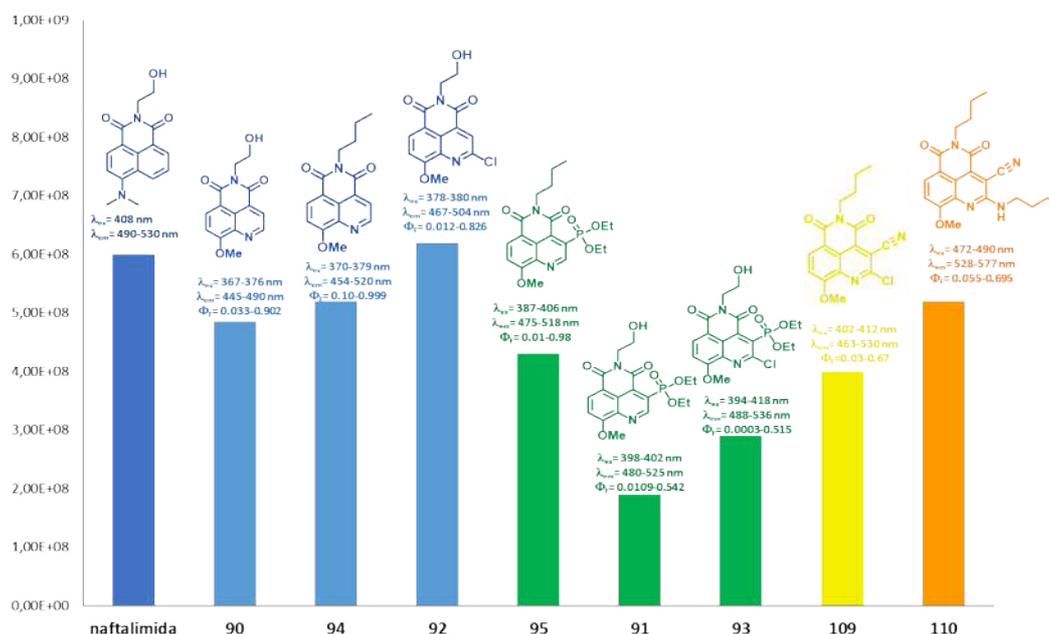


Figura 22. Gráfico comparativo de las propiedades fotofísicas ($\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ y Φ) quinolimidas y naftalimidias. Añadir alguna cianoquinolimida y poner la naftalimida de su color

Dado que una de las características que debe reunir un buen fluoróforo para su aplicación en biosensores es una alta fotoestabilidad, se estudió la fotoestabilidad de la quinolimida **90** en comparación con la naftalimida análoga **118**. Hay que señalar que las naftalimidias, en general, se han descrito como fluoróforos altamente fotoestables. Para estudiar la fotoestabilidad, disoluciones 12 μM de **90** y **118** en dioxano fueron irradiadas a sus respectivos máximos de absorción [$\lambda_{\text{exc}}(\mathbf{90}) = 372$ y $\lambda_{\text{exc}}(\mathbf{118}) = 360$ nm) durante 1 hora, registrando durante este tiempo la intensidad de emisión de fluorescencia a la $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (460 nm para **90** y 425 nm para **118**).

Como se muestra en la Figura 23, durante el tiempo de observación no se registraron oscilaciones en la emisión. Este resultado muestra la alta fotoestabilidad de la quinolimida **90**, similar a la de la naftalimida **118**.

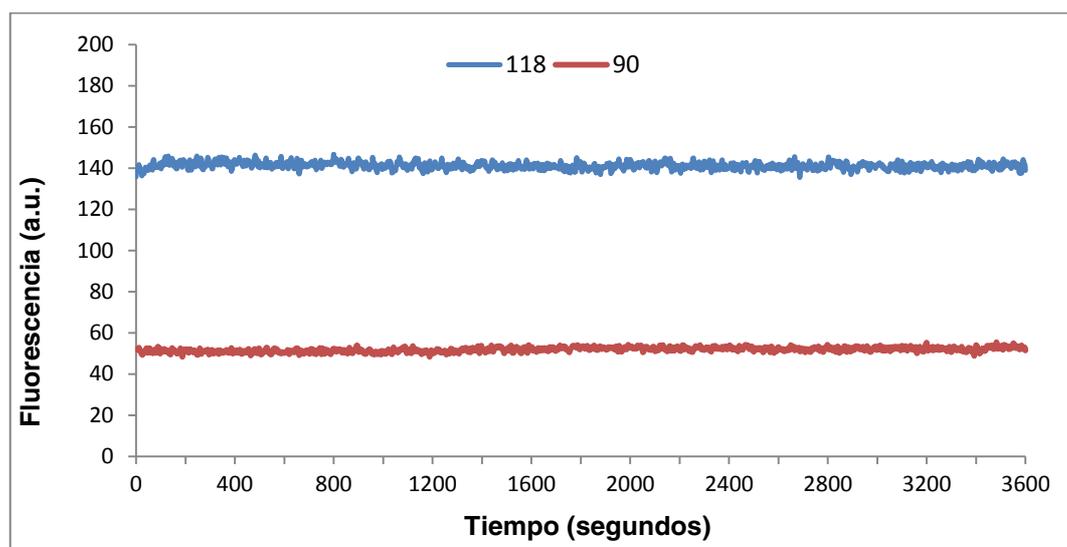


Figura 23. Variación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo de excitación

2.1.1.5. Propiedades fotofísicas. Sensibilidad al pH

Debido a la presencia de un átomo de nitrógeno protonable en el anillo quinolimida, las propiedades fotofísicas de estos fluoróforos podrían ser afectadas por el pH del medio de observación y, por lo tanto, tener aplicación como sensores de pH. A este

respecto, hay que señalar la importancia del pH en diversos procesos celulares, tales como la proliferación celular, la apoptosis, el transporte de iones, la endocitosis o la contracción celular. En condiciones fisiológicas el pH varía desde 1.0 en el jugo gástrico a 8.1 en la secreción pancreática, pasando por 4.5 en los lisosomas, 5.5 en la piel, 6.0 en la orina, 7.2 en el citosol, 7.365 en la sangre y 7.5 en el fluido cerebroespinal y la matriz mitocondrial¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Los valores anormales de pH en células y tejidos, tienen una gran influencia sobre sus funciones normales y las diversas actividades del cuerpo, lo que hace que estén asociados con enfermedades graves, tales como el cáncer y el Alzheimer. En consecuencia, el desarrollo de sensores fluorescentes que permitan detectar cambios de pH en el interior de las células, es un objetivo de vital importancia. En la actualidad la mayoría de los sensores fluorescentes de pH se basan en la protonación reversible de aminas alifáticas unidas a un fluoróforo o en la protonación de *N*-heterociclos. En el primer caso, las aminas alifáticas son potentes dadores de electrones, por lo que quenchean la fluorescencia mediante transferencia fotoinducida de electrones (PET). La protonación de estos grupos amino bloquea la transferencia de electrones y, por lo tanto el PET, provocando un fuerte incremento de fluorescencia. Se han descrito diversos sensores de pH de este tipo, entre ellos los derivados de naftalimida **119-120**¹⁸⁹⁻¹⁹¹, indicados en la Figura 24.

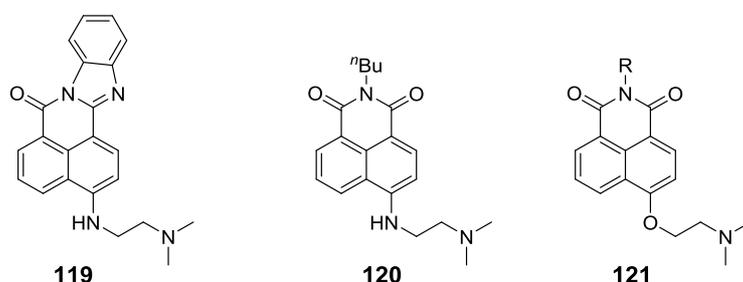


Figura 24. Aminas terciarias derivadas de naftalimida sensores de pH

En cuanto a los *N*-heterociclos protonables, éstos se protonan generando el correspondiente catión, dando lugar a cambios en la fluorescencia, como en los derivados de quinolina **122**¹⁹² y **123**¹⁹³ mostrados en la Figura 25. En este grupo se podrían encontrar las 9-metoxi-quinolimidias aquí descritas. Con el fin de explorar esta posibilidad, se estudió la variación de las propiedades fotofísicas de las quinolimidias **90-95** y de la naftalimida **118** al variar el pH.

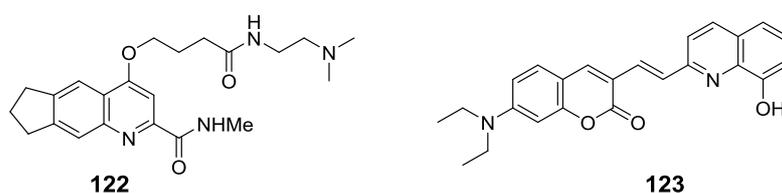


Figura 25. Derivados de quinolina sensores de pH

Debido a la baja fluorescencia de las quinolimidas **90-95** en H₂O, el estudio fue realizado en mezcla (1:1) de H₂O/CH₃CN, a una concentración fija de 12 μM, mediante la adición de cantidades crecientes de HCl (0.1 mM-2 M) o NaOH (0,1 mM-2 M). Como se muestra en la Figura 26, en el caso de la naftalimida de referencia **118** la fluorescencia no se vio afectada por el pH ácido pero a pH básico disminuyó gradualmente desde pH 8.5 hasta un mínimo a pH 13.2. Esta disminución podría deberse a la desprotonación del grupo hidroxilo de la cadena lateral de hidroxietilo¹⁹⁴. Sin embargo, en **90**, como ejemplo de las quinolimidas análogas **90-93**, la fluorescencia disminuyó en medio ácido desde pH 3.5 a un mínimo a pH 1.0, probablemente debido al quenching de la fluorescencia por protonación del anillo de quinolimida, mientras que a pH básico el comportamiento fue similar al de la naftalimida **118**. Las *N*-butil-quinolimidas **94** y **95** mostraron un comportamiento similar en pH ácido al de los análogos con hidroxietilo **90-93**. Sin embargo, a pH básico no se observó disminución de la fluorescencia hasta valores de pH superiores a 12.2. No obstante, en ningún caso, los cambios en el pH no afectaron a las λ_{\max}^{em} . Estos resultados indican que las quinolimidas podrían utilizarse como sensores de cambios de pH en el intervalo 2-3.5.

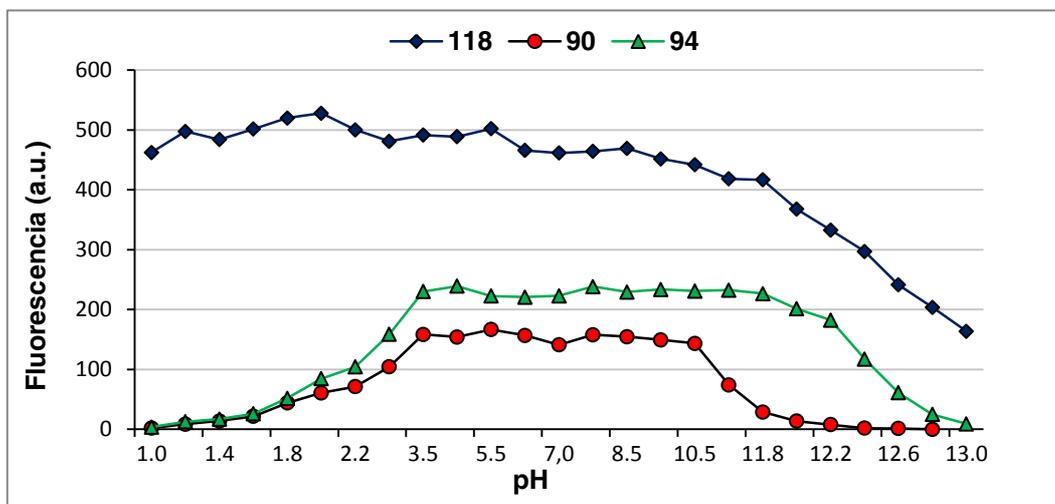


Figura 26. Influencia del pH sobre la emisión de fluorescencia de la naftalimida **118** y las quinolimidias **90** y **94**. λ_{max}^{em} determinada a una concentración $12 \mu M$ en mezcla (1:1) H_2O/CH_3CN

2.1.1.6. Cálculos TD-DFT de las propiedades fotofísicas

Teniendo en cuenta la influencia de la estructura electrónica y de la geometría de las moléculas sobre sus propiedades fotofísicas, con el fin de estudiar la influencia de la presencia del átomo de nitrógeno en posición 1 de las quinolimidias sobre sus propiedades fotofísicas, se realizó un estudio teórico de modelización de estas propiedades para las quinolimidias **90-93** y la naftalimida **118**, mediante cálculos TD-DFT a nivel computacional PBE0/6-31+G(d,p)^{195, 196}, con el programa Gaussian-09¹⁹⁷.

En primer lugar, para todas las estructuras en estudio, se optimizó la geometría del estado fundamental (S_0) y del primer estado excitado singlete (S_1). La comparación de los parámetros geométricos obtenidos para las quinolimidias **90-93** con los obtenidos para **118** indicó un comportamiento similar, con variaciones alternadas en signo en las distancias de enlace de la estructura tricíclica producidas por la excitación, tal como se muestra, a modo de ejemplo, en la Figura 27 para la quinolimida **90**. Señalar que estas variaciones fueron ligeramente mayores en la parte del anillo de imida que en la parte del biciclo de quinolina.

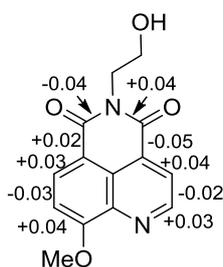


Figura 27. Diferencias en las distancias de enlace entre los estados energéticos S_1 y S_0 en la quinolimida **90**

Los espectros de absorción UV-visible y de emisión de fluorescencia fueron simulados para cada molécula mediante cálculos estándar de respuesta lineal vertical en vacío^{198, 199}. El nivel computacional utilizado suministró una descripción adecuada de los espectros UV y de fluorescencia. La 1^a banda de absorción corresponde a la transición HOMO→LUMO de los orbitales frontera del estado S_0 , mientras que la 1^a banda del espectro de emisión corresponde a la transición LUMO→HOMO del primer estado excitado (S_1), que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores energéticos calculados para los orbitales HOMO y LUMO de S_0 y S_1 para la naftalimida **118** y las quinolimidas **90-93**

Compd	S_0			S_1		
	HOMO	LUMO	LUMO-HOMO	HOMO	LUMO	LUMO-HOMO
118	-0.2460	-0.0933	0.1527	-0.2382	-0.1007	0.13749
90	-0.2542	-0.1057	0.1485	-0.2449	-0.1154	0.12952
91	-0.2558	-0.1124	0.1434	-0.2475	-0.1238	0.12367
92	-0.2591	-0.1125	0.1466	-0.2499	-0.1229	0.12699
93	-0.2561	-0.1149	0.1413	-0.2490	-0.1291	0.11994

A la vista de los resultados de los cálculos, se observa que las diferencias estructurales afectan a las energías de ambos orbitales frontera HOMO y LUMO en el estado fundamental y en el excitado, aunque el orbital LUMO está más afectado, sobre todo en el estado excitado (S_1). La sustitución del esqueleto de naftalimida por el de

quinolimida (**118** vs **90**) da lugar a una disminución de 2.7 % en el salto energético HOMO→LUMO en el estado fundamental y de 5.8 % en el LUMO→HOMO desde el estado S_1 . La introducción de un grupo fosfonato en posición 3 3 (**91** vs **90** y **93** vs **92**) produce una disminución adicional de 3.5 y 4.5 %, respectivamente, mientras que la introducción de Cl en posición 2 produce una disminución adicional de 1.3 y 2 % (**92** vs **90** and **93** vs **91**). El efecto de ambos sustituyentes (**93** vs **90**) es aditivo. Estas disminuciones en los saltos energéticos LUMO-HOMO son responsables de los desplazamientos de las respectivas $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ y $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ hacia el color rojo.

Los valores calculados en el vacío para estas longitudes de onda, recogidas en la Tabla 2, presentan una excelente correlación lineal con los valores experimentales obtenidos en tolueno (Figura 28, $R^2 = 0.99$ and 0.99 , respectivamente).

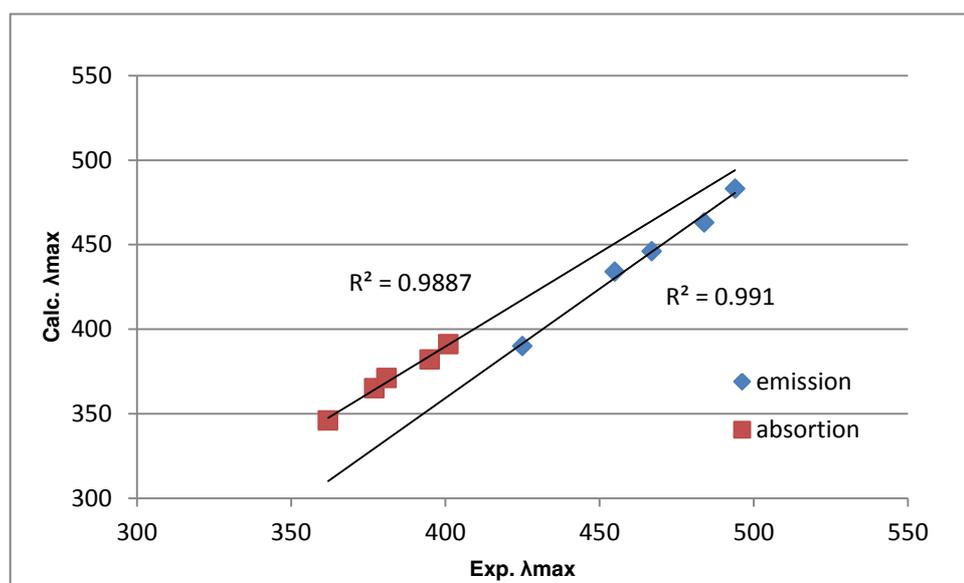


Figura 28. Correlación lineal entre $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ and $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ calculadas en el vacío y los valores experimentales en tolueno

2.1.1.7. Solubilidad en H_2O

Dada la importancia de la solubilidad en agua para la aplicación biológica de fluoróforos, la solubilidad cinética de la quinolimida **90** se determinó a pH 7.4/DMSO(1%)

en comparación con la de la naftalimida **118**, aplicando para ello la metodología descrita²⁰⁰⁻²⁰². La solubilidad de **118** fue $610 \pm 10 \mu\text{M}$, mientras que la de la quinolimida **90** fue $2000 \pm 10 \mu\text{M}$, es decir 3.2 veces mayor.

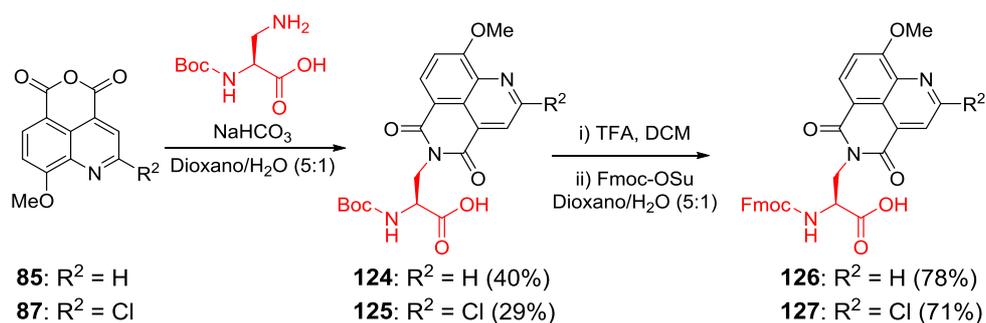
2.1.1.8. Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas

Teniendo en cuenta, por una parte, que la aplicabilidad de fluoróforos en biosensores requiere la ausencia de citotoxicidad y, por otra, el precedente bibliográfico sobre actividad antitumoral de 2-aril-quinolimidias¹⁶⁷, mencionado en los antecedentes de esta tesis, todas las 9-metoxi-quinolimidias descritas en esta Memoria fueron incluidas en los cribados HTS en líneas celulares de cáncer humano de la compañía Pharma Mar, S. A. En este cribado, se determinó la citotoxicidad en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (A549), de colón (HT29), de mama (MDA-MD-231) y de páncreas (PSN1), utilizando doxorrubicina como control positivo y siguiendo los protocolos del National Cancer Institute (NCI) de USA^{203, 204}. Ninguna de las quinolimidias mostró citotoxicidad a la máxima concentración ensayada $10 \mu\text{M}$. Aunque estos resultados no se pueden extrapolar a células normales, sí que son indicativos de baja toxicidad, ya que, en general, las células cancerosas, al tener un crecimiento y proliferación más rápidos que las células normales, suelen ser más sensibles a citotoxicidad.

2.1.1.9. Síntesis de reactivos para el marcaje fluorescente de péptidos y proteínas

El estudio de la actividad proteómica y de las interacciones proteína-proteína mediante biosensores fluorescentes, generalmente, requiere el marcaje fluorescente de péptidos o proteínas con el fluoróforo apropiado. Este marcaje requiere la preparación de reactivos adecuados para el marcaje en condiciones de reacción suaves, compatibles con el medio fisiológico de estudio. Dependiendo de la aplicación, el marcaje se realiza preparando análogos fluorescentes de aminoácidos para su posterior incorporarlos en la secuencia peptídica de interés, mediante síntesis peptídica, o utilizando derivados del fluoróforo reactivos a los nucleófilos presentes en los péptidos y proteínas, como son los grupos amino de los aminoácidos básicos y el grupo tiol de la cisteína.

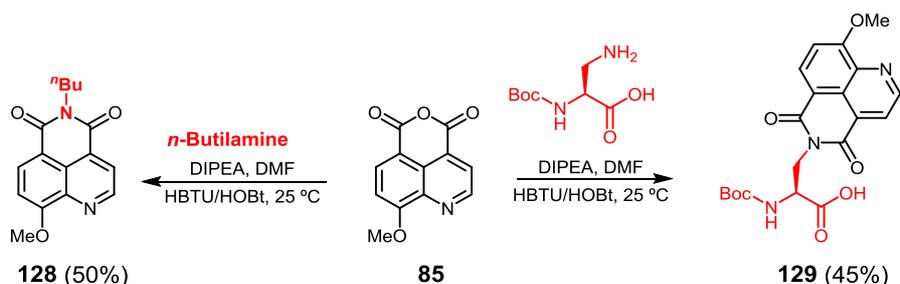
En vista de las buenas propiedades fotofísicas de las 9-metoxi-quinolimidias y en particular su buen comportamiento solvatocrómico, adecuado para su utilización como herramientas para estudios de interacción proteína-proteína, se planteó la preparación de reactivos adecuados para el marcaje peptídico. En primer lugar, se planteó la preparación de aminoácidos portadores de 9-metoxi-quinolimidias apropiados para la síntesis peptídica en fase sólida. Para ello, se adaptó la metodología descrita para la preparación de aminoácidos derivados de 4-dimetilamino-naftalimida (4-DMN)²⁰⁵, que implicaba la síntesis en medio básico de la imida derivada de L-3-amino-alanina, utilizando mezcla (5:1) dioxano/H₂O como disolvente. El medio básico era incompatible con la presencia de la protección Fmoc en el grupo α-amino. Por lo cual, la síntesis de la imida se realizó con la protección Boc y, en etapas posteriores, se eliminó esta protección y se introdujo el grupo Fmoc apropiado para la síntesis de péptidos en fase sólida. De esta forma, tal como se muestra en el Esquema 14, se obtuvieron los Fmoc-aminoácidos **126** y **127** a partir de los correspondientes anhídridos **85** y **87**.



Esquema 14. Síntesis de los Fmoc-aminoácidos derivados de quinolimida **126** y **127**

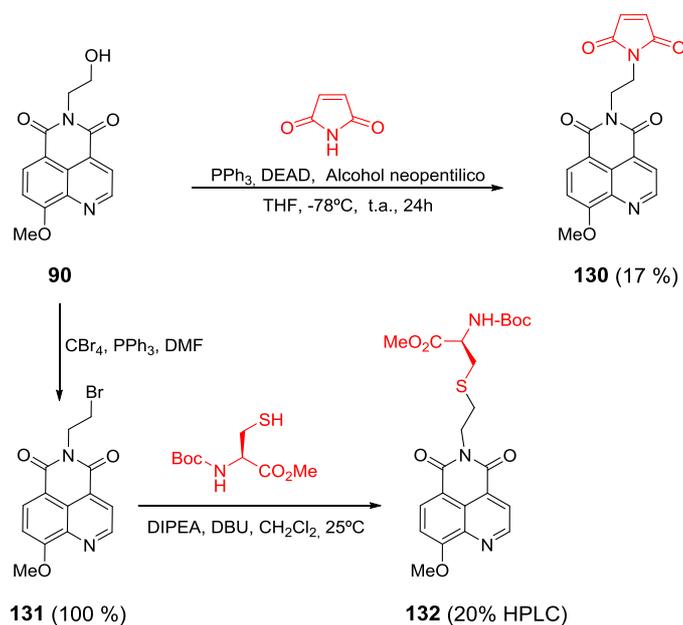
En cuanto a los reactivos para el marcaje de péptidos o proteínas, en primer lugar, se estudió la posibilidad de utilizar los anhídridos derivados del ácido quinolin-4,5-dicarboxílico, previamente sintetizados, como reactivos de marcaje en condiciones suaves. Para ello, se estudiaron las reacciones del anhídrido **85** con *n*-butilamina y con Boc-L-3-amino-alanina a temperatura ambiente, utilizando HBTU/HOBt como reactivos de acoplamiento²⁰⁶ (Esquema 15).

Las reacciones se siguieron por HPLC durante 24 horas, al cabo de las cuales, se determinó $\approx 50\%$ de conversión en ambos casos, porcentaje que no aumentó al aumentar el tiempo de reacción. Dado que estas reacciones se realizaron a pequeña escala analítica, las quinolimidas **128** y **129** no fueron aisladas.



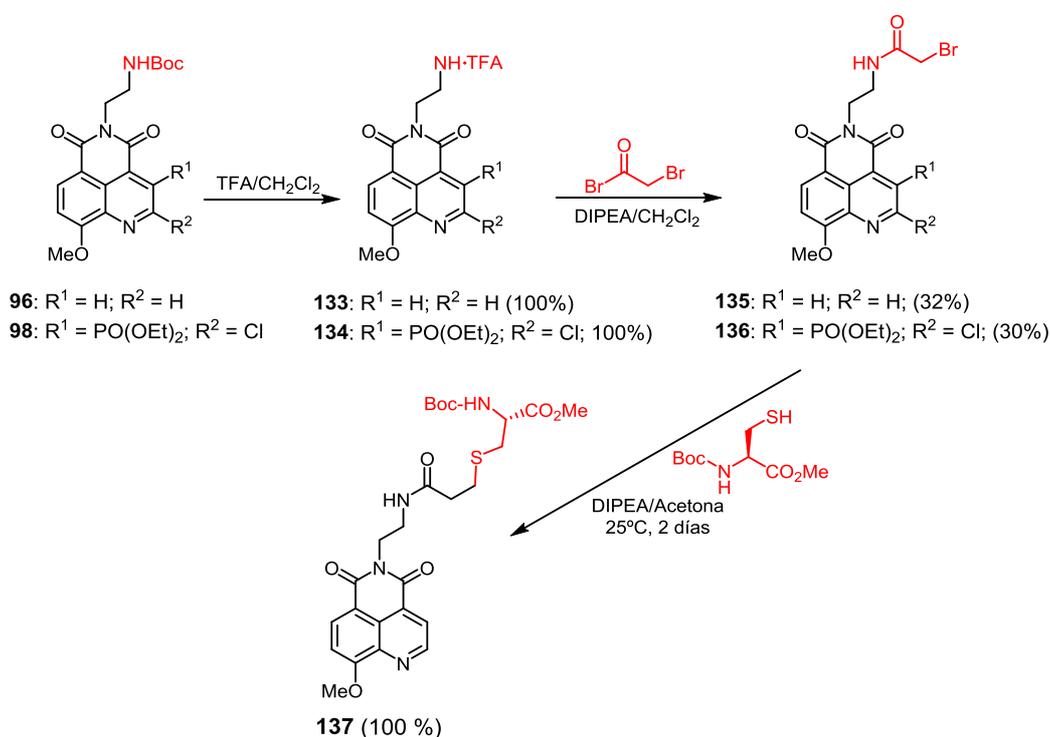
Esquema 15. Estudio de la aplicación del anhídrido **85** como reactivo de marcaje fluorescente

Para el marcaje de péptidos en residuos de cisteína, se estudió la preparación de tres tipos diferentes de reactivos de marcaje, las maleimidas, los bromuros y las bromometil acetamidas, aplicando las metodologías desarrolladas por el grupo de Barbara Imperiali para la preparación de derivados de 4-DMN¹⁰¹. En el primer caso, se estudió la preparación de la maleimida derivada de la 5-hidroxi-etil-quinolimida **90**, por reacción de Mitsunobu con maleimida en presencia de PPh₃, azodicarboxilato de dietilo y alcohol neopentílico (Esquema 16). La maleimida deseada **130** se obtuvo con un rendimiento del 17 %, inferior a los rendimientos descritos (22-24 %). Este bajo rendimiento dificultaba su posterior utilización. Como alternativa, se estudió la preparación y utilización del derivado bromado **131**, que fue obtenido cuantitativamente por bromación de **90** con tetrabromuro de carbono²⁰⁷. Sin embargo, en un estudio de reactividad, utilizando el éster metílico de cisteína como modelo sencillo de péptido, el derivado bromado **131** no reaccionó con *N*-Boc-Cys-OMe en presencia de DIPEA. Cuando, además de DIPEA, se adicionó DBU, en el análisis de HPLC de la mezcla, se detectó un 20 % del producto de acoplamiento **132**. A la vista de estos resultados, como última alternativa se estudió la preparación de bromometil acetamidas.



Esquema 16. Preparación de la maleimida **130** y del bromuro **131** y estudio de su reactividad con *N*-Boc-Cys-OMe

Para la preparación de bromometil acetamidas se utilizaron las 9-metoxiquinolimidas portadoras de la cadena *N*-Boc-aminoetilo en posición 5 **96** y **98**. La primera como prototipo para el estudio de condiciones de reacción y la segunda por ser la que presentaba mejores propiedades fotofísicas para su aplicación en biosensores (mayores $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ y $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ y comportamiento más solvatocrómico). Como se muestra en el Esquema 17, tras la eliminación del grupo protector Boc, por tratamiento con TFA en CH_2Cl_2 , la reacción a temperatura ambiente con bromuro del ácido bromoacético en presencia de DIPEA, como captador del BrH que se genera, se obtuvieron las correspondientes bromometil acetamidas **135** y **136** con rendimientos moderados a bajos. Finalmente, para estudiar la reactividad frente a tioles, se estudió la reactividad de la bromometil acetamida **135** con *N*-Boc-Cys-OMe en acetona a temperatura ambiente y en presencia de DIPEA. En estas condiciones se obtuvo el correspondiente tioéter **137** con rendimiento cuantitativo. Esto indicaba que, aunque había que optimizar los rendimientos en la preparación de las bromometil acetamidas, estos reactivos podrían ser adecuados para el marcaje fluorescente de péptidos con quinolimidas.



Esquema 17. Síntesis de bromometil acetamidas y estudio de su reactividad con N-Boc-Cys-OMe

2.1.1.10. 9-Metoxi-quinolimidias en sensores de quinasas dependientes de ciclinas

Las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) son serina/treonina quinasas inactivas en su forma monomérica, cuya activación requiere su asociación con una familia de proteínas regulatorias, denominadas ciclinas, formando complejos heterodimericos funcionales^{208, 209}. Estas quinasas juegan un papel central en la regulación y progresión del ciclo celular, la transcripción y otros procesos biológicos, tales como la diferenciación neuronal, el metabolismo y la reparación de daños en el ADN²¹⁰. Las ciclinas dotan de especificidad a las CDKs y regulan su actividad, generalmente mediante proteólisis. La actividad de las CDKs también está regulada por fosforilación y por proteínas inhibitoras. La hiperactividad constitutiva o por desregulación de estas quinasas, debido a amplificación, sobreexpresión o mutación de la CDK o de la ciclina reguladora, contribuye a la proliferación de células cancerosas y a la desregulación de diversos procesos biológicos^{209, 211, 212}. El conocimiento estructural y de los mecanismos

de regulación de diversas CDKs ha avanzado significativamente en los últimos años. Sin embargo, para algunos heterodímeros ciclina-CDK, como la interacción CDK5/p25, el conocimiento de sus mecanismos de regulación y de sus implicaciones fisiológicas todavía es escaso. En estos casos los biosensores de fluorescencia pueden aportar luz y constituyen herramientas esenciales para su estudio.

La CDK5 se expresa ubicuamente, pero principalmente en neuronas post-mitóticas, donde es activada por los activadores neuronales específicos p35/p25 y p39^{209, 213}. Esta quinasa ejerce sus funciones principalmente en el sistema nervioso central, donde promueve la extensión de neuritas, la migración neuronal, la formación de sinapsis durante el desarrollo cerebral, la plasticidad sináptica, la guía axonal, el desarrollo y diferenciación neuronal y participa en la regulación de la autofagia²⁰⁹.

La activación de CDK5 tiene lugar tras la ruptura proteolítica de las proteínas p35 o p39 a p25, dependiente de calpaina y estimulada por Ca^{2+} , siendo p25 la proteína responsable de su completa activación^{214, 215}. p25 no comparte similitud de secuencia con las ciclinas, pero adopta un plegamiento similar y se une a CDK5 en una interfaz muy similar a la de interacción de las CDKs con ciclinas y de forma similar a la unión de CDK2 con ciclina A²¹⁶ (Figura 29).

La hiperactividad de CDK5 está asociada al inicio y desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas, induciendo muerte neuronal^{209, 217-219}. Diversos estudios han mostrado la implicación de la hiperactivación de CDK5 por p25 en la enfermedad de Alzheimer, en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y en la enfermedad de Parkinson. De hecho, CDK5 contribuye a la fosforilación de la proteína Tau y aumenta la producción de péptido amiloide A β en pacientes de Alzheimer²¹⁹⁻²²¹. CDK5 también participa en la hiperfosforilación de la alfa-sinucleína y de la parkina, contribuyendo, por lo tanto, a la generación de cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson^{222, 223} y de inclusiones similares a los cuerpos de Lewy, que contribuyen a la pérdida neuronal en la ELA²²⁴. Recientemente, se ha descrito también la implicación de CDK5 en la muerte neuronal durante la isquemia cerebral²²⁵. Además, numerosos estudios indican que CDK5 es una diana relevante en diversos tipos de cánceres^{209, 226}. En particular, estudios recientes sugieren que la expresión e hiperactividad de esta quinasa están implicadas en el desarrollo y grado de agresividad de glioblastomas y neuroblastomas^{227, 228}.

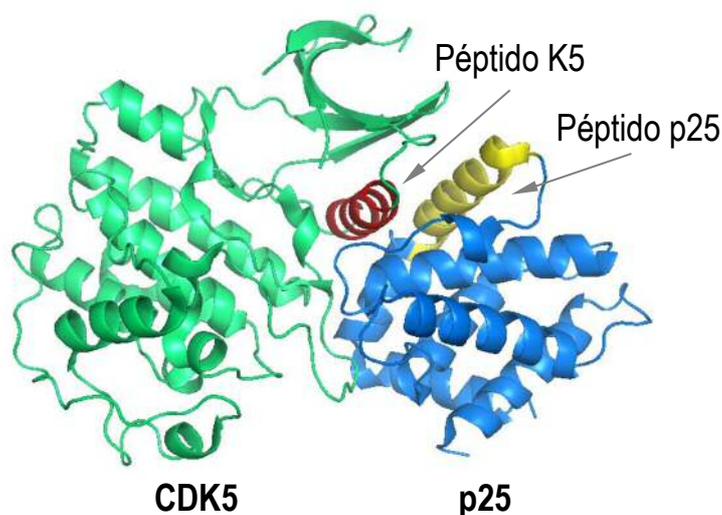


Figura 29. Estructura de la interacción CDK5/p25²¹⁶

La alta implicación de CDK5 y su interacción con p25 en las mencionadas patologías indican que esta interacción podría constituir un buen marcador del estado patológico. De ahí el interés del desarrollo de biosensores para la interacción CDK5/p25 y, particularmente, del desarrollo de sondas fluorescentes para su detección. Sin embargo, en nuestro conocimiento, previamente al inicio del trabajo aquí descrito, no existían biosensores de fluorescencia para dicha interacción. Teniendo en cuenta las buenas características como fluoróforos solvatocrómicos de las 9-metoxi-quinolimidias descritas en este capítulo, se planteó la utilización de la bromometil acetamida **136**, derivada de la quinolimida más solvatocrómica (**93**), como herramienta para el diseño de sensores fluorescentes de la interacción CDK5/p25. Este estudio fue realizado en colaboración con el grupo que dirige la Dra. May C. Morris en el Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) de la Universidad de Montpellier en Francia.

Dado que la interacción de CDK5 con p25 se produce a través de la hélice C de CDK5 con una hélice α de p25²¹⁶ (Figura 29), se utilizaron péptidos derivados de estas hélices para explorar la utilidad de la bromometil acetamida **136** para el estudio de su interacción, tanto *in vitro* como *in cellulo*. Para ello, un péptido derivado de la hélice C de CDK5, denominado péptido K5 (GVPSSALREICLLK), portador de un único residuo de

cisteína, fue marcado mediante reacción con la bromometil acetamida **136** en tampón PBS a -4 °C (Figura 30).

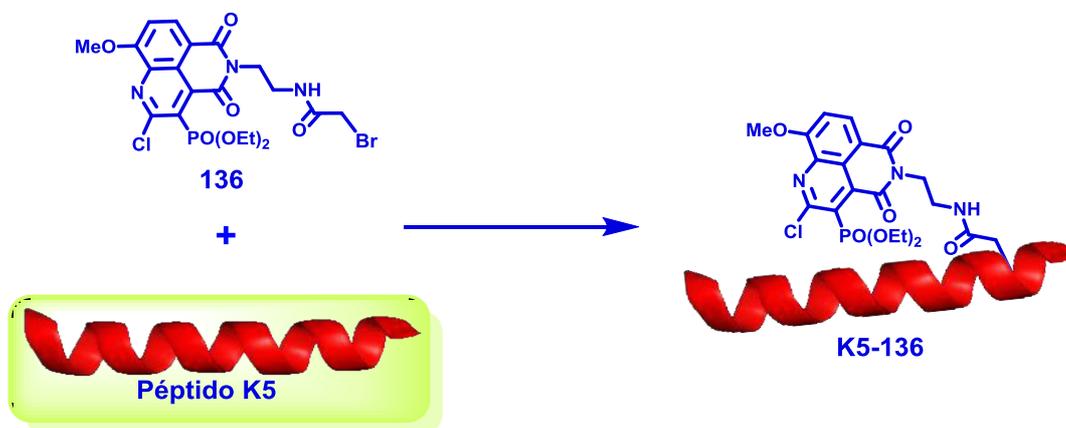


Figura 30. Marcaje fluorescente del péptido K5 de CDK5 con la bromometil acetamida **136**

2.1.1.10.1. Estudio *in vitro* de la Interacción CDK5/p25

Tal como se muestra en la Figura 31, para el estudio *in vitro* de la interacción CDK5/p25 se registraron los espectros de fluorescencia de una disolución 5 μM del péptido K5 marcado con la bromoacetamida **136**, tras la adición de cantidades crecientes de una disolución de un péptido derivado de la hélice α de interacción de p25, denominado péptido p25 (KEAFWDRCLSVINLM). En la saturación de la valoración, la fluorescencia aumentó 21.8 veces y se calculó una constante de disociación entre los dos péptidos de $K_d = 355.0 \pm 57.2 \mu\text{M}$ (Figura 31A). Además, la interacción entre los dos péptidos produjo un desplazamiento ipsocrómico del máximo de fluorescencia de 541 a 450 nm. El mismo experimento, realizando la valoración del péptido **K5-136** con un péptido irrelevante, derivado de ubiquitina (VSSDTIDNVKSKIQDKEGC), como péptido control, no produjo efecto sobre la emisión de fluorescencia (Figura 31B).

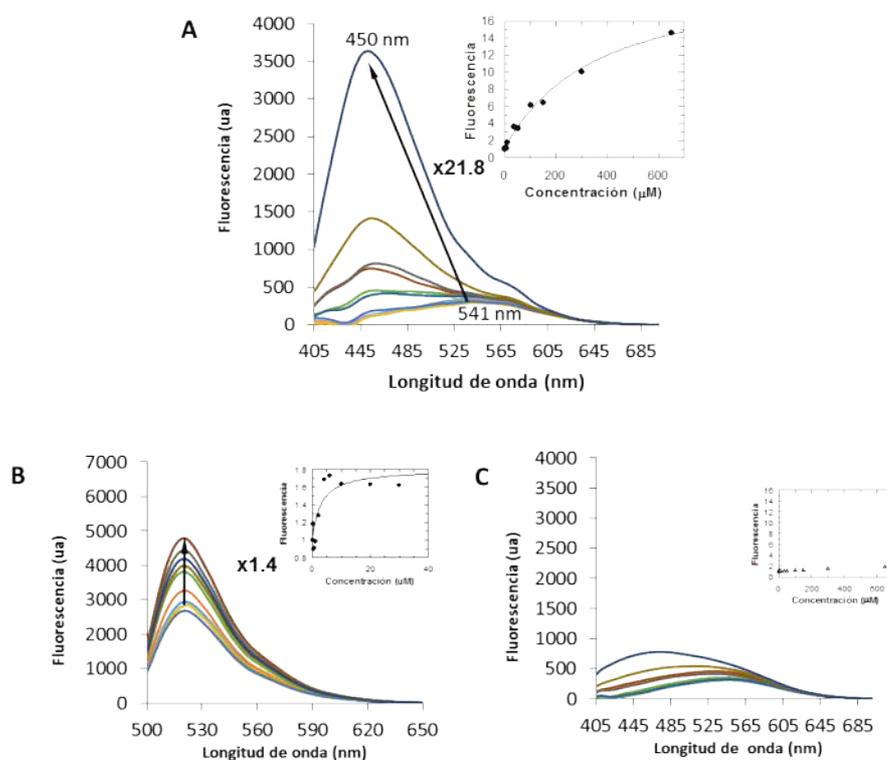


Figura 31. (A) Valoración de una concentración 5 μM del péptido **K5-136** con el péptido p25 ($\lambda_{exc} = 390 \text{ nm}$). En el inserto, cálculo de la constante de disociación. (B) Valoración de una concentración 5 μM del péptido **K5-136** con un péptido irrelevante (Ctrl) (C) Valoración de una concentración 200 nM del péptido K5 marcado con FITC con el péptido p25 ($\lambda_{ex}= 495\text{nm}$). En el inserto, cálculo de la constante de disociación.

Como comparación, la valoración del péptido K5 marcado con fluoresceína (FITC) solo produjo un aumento de 1.4 veces en la intensidad de la fluorescencia, sin observar desplazamientos en el máximo de fluorescencia (Figura 31C). Estos resultados muestran que la 2-cloro-3-dietilfosfonil-9-metoxi-quinolimida de **136** constituye una sonda fluorescente verde altamente sensible para monitorizar la interacción entre péptidos y con alto potencial como sensor de interacciones proteína-proteína.

2.1.1.10.2. Estudio *in cellulo* de la Interacción CDK5/p25

Por último, se estudió la utilidad del péptido marcado **K5-136** como sonda fluorescente para la localización *in cellulo* de la proteína p25 en células de glioblastoma U87. Como era de esperar, este péptido, por sí solo, no penetró en las células. Por ello, en su extremo N-terminal se le ancló el péptido Pep1 (KETWWETWWTEKK), que facilita la penetración celular de péptidos^{229, 230}. De esta forma, el péptido marcado (**Pep1-K5-136**) penetró fácilmente en las células y su interacción con p25 endógena se visualizó en el citoplasma mediante la emisión de fluorescencia verde, observando en el canal de observación de la proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 32A). Por otra parte, mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando un anticuerpo de p25, marcado con el fluoróforo alexa647, en la mezcla de las imágenes de la fluorescencia de **Pep1-K5-136** y la del anticuerpo p25-alexa647, se observó completa co-localización de la fluorescencia de **Pep1-K5-136** con la del anticuerpo, comprobándose que la unión era específica entre **Pep1-K5-136** y la p25 endógena.

En las células no tratadas con **Pep1-K5-136** (Figura 32B) no se observó fluorescencia en el canal GFP. Las células tratadas con **Pep1-K5-136** presentaron una fluorescencia relativa 4 veces superior a la de las células tratadas con el anticuerpo p25-alexa647 (Figura 32 C). Estos resultados demostraron la utilidad de las 9-metoxiquinolimidias como sondas fluorescentes para la visualización *in cellulo* de interacciones proteína-proteína.

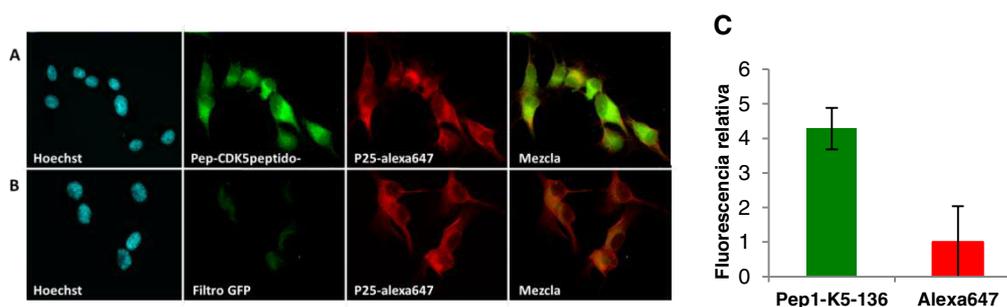


Figura 32. Co-localización de **Pep1-K5-136** con p25. (A) Células tratadas con **Pep1-K5-136** y con anticuerpo p25-alexa647, observadas a través del filtro de la proteína verde fluorescente (GFP) y a través del de alexa647. (B) Células tratadas solo con el anticuerpo p25-alexa647. (c) Histograma de representación de la fluorescencia relativa de **pet1-K5-136** en el canal GFP con respecto a la de p25-alexa647

2.1.1.11. Conclusiones

Las 4,5-quinolimidas descritas en este capítulo, diseñadas como estructuras quiméricas entre naftalimida y quinolina, en comparación con naftalimidias análogas, fluoróforos bien conocidos, muestran un comportamiento solvatocrómico superior y desplazamientos batocrómicos significativos en sus máximos de absorción y de emisión que, al igual que sus rendimientos cuánticos de fluorescencia, son variables dependientes de los sustituyentes sobre el esqueleto de quinolimida. Además, la fluorescencia de estos nuevos fluoróforos es sensible al pH, presentan grandes desplazamientos de Stokes, son fotoestables y no citotóxicos en células cancerosas, y su solubilidad en agua es 3.2 veces superior a la de naftalimidias análogas. Teniendo en cuenta estas buenas propiedades fotofísicas, se han preparado aminoácidos portadores del esqueleto de quinolimida adecuadamente protegidos para su incorporación en síntesis de péptidos y diversos reactivos para el marcaje fluorescente de péptidos y proteínas. Considerando los rendimientos de síntesis de estos reactivos y su reactividad frente H-Cys-OMe, modelo sencillo de una cisteína peptídica, las correspondientes bromometil acetamidias son las que han presentado mejor comportamiento como reactivos de marcaje. Una de estas bromometil acetamidias ha sido utilizada para el marcaje fluorescente de un péptido derivado de CDK5, integrante de la hélice α C de la interfaz de su interacción con su proteína reguladora p25. Estudios *in vitro* e *in cellulo* con el péptido marcado **K5-136**, han demostrado su utilidad como herramienta para monitorizar la interacción de CDK5 con p25 y para visualizar la localización de esta proteína en células vivas. Estos resultados muestran el alto potencial de las quinolimidas en biosensores de interacciones proteína-proteína y en aplicaciones de visualización celular.

2.1.2. Derivados de 9-aminoquinolimididas

En este subcapítulo se comentan los estudios para optimizar las propiedades fotofísicas de quinolimididas mediante la introducción en la posición 9 de grupos amino, mejores electrodonadores que el grupo OMe. Estos estudios incluyen la síntesis de 9-aminoquinolimididas (Figura 33, **B**), su caracterización fotofísica y espectroscópica (UV/Visible, fluorescencia, RMN y difracción de rayos X), cálculos estructurales, su aplicación al estudio *in vitro* de la agregación β -amiloide, la síntesis de reactivos para marcaje fluorescente y su aplicación en el estudio *in vitro* e *in cellulo* de la interacción de la quinasa CDK5 con su regulador p25.

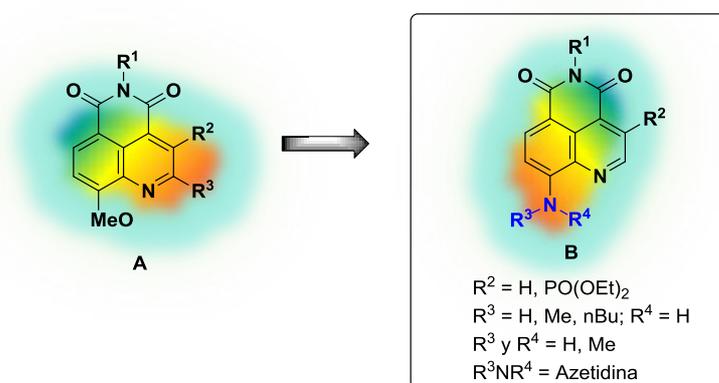


Figura 33. Diseño de 9-aminoquinolimididas **B** a partir de 9-metoxiquinolimididas **A**

Entre los grupos amino, se ha dado preferencia al grupo amino no sustituido (NH_2), al *N,N*-dimetilamino y al anillo de azetidina. Para ello, se ha tenido en cuenta que la intensa fluorescencia de color verde de 4-amino-1,8-naftalimididas es la base de múltiples

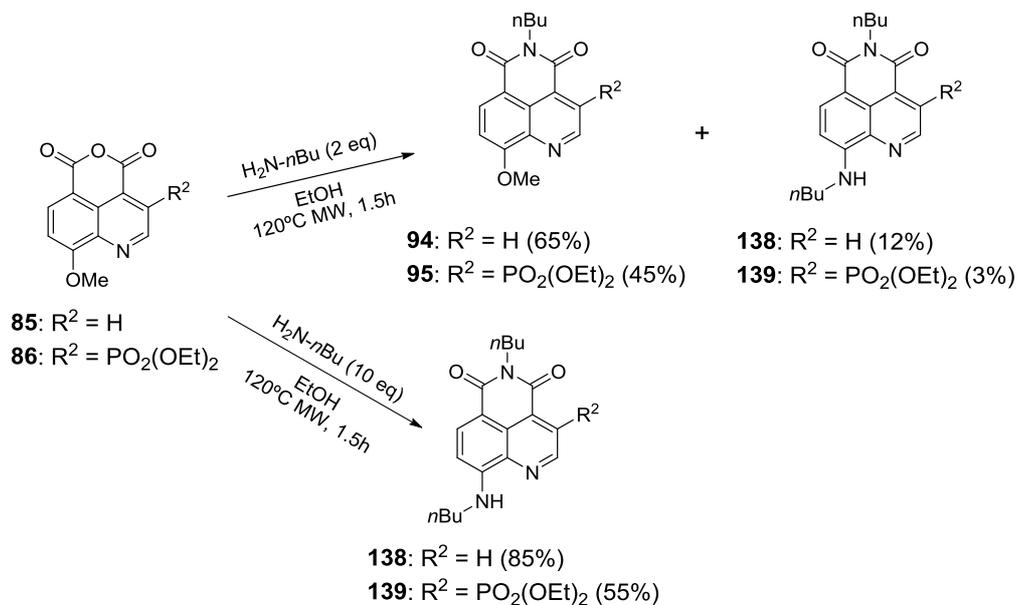
sondas ratiométricas y de diversos sensores de reactividad de enzimas²³¹⁻²³⁷, mientras que el grupo dimetilamino es uno de los más frecuentemente utilizados como grupos dadores de electrones en diversos tipos de fluoróforos²³⁸. Por otra parte, estudios recientes han mostrado que la sustitución del grupo *N,N*-dimetilamino por el anillo de azetidina en diversos fluoróforos mejora significativamente el brillo y la fotoestabilidad²³⁸.

2.1.2.1. Síntesis

Como se ha comentado en el apartado anterior relativo a la síntesis de 9-metoxiquinolimidias (2.1.1.1), en la reacción del correspondiente anhídrido con aminas, además de la esperada 9-metoxiquinolimida, se obtenían trazas de los respectivos 9-amino derivados, resultado de la sustitución nucleófila aromática¹⁸¹ del grupo OMe por la amina. Concretamente, como se muestra en el Esquema 18, la reacción de los anhídridos **85** o **86** con 2 equivalentes de *n*-butilamina, bajo irradiación de microondas, conducía a la respectiva 9-metoxiquinolimida **94** o **95**, con rendimientos moderados, junto con un 12 % o un 3% de la correspondiente 9-butilamino-quinolimida **138** y **139**, respectivamente.

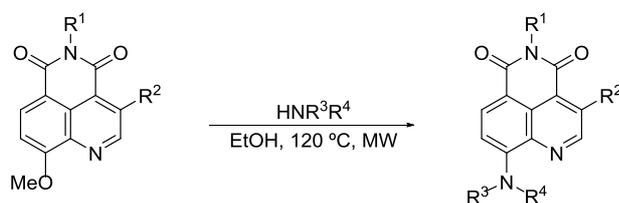
Sin embargo, cuando la reacción se realizaba con 10 equivalentes de la amina, las 9-butilamino-quinolimidas se aislaban como únicos productos de reacción con rendimientos del 85 % y 55 %, respectivamente. Estos buenos resultados se mantenían cuando se utilizaba un exceso molar de 5 equivalentes de amina.

Una vez optimizadas las condiciones de síntesis de las 5-butil-9-butilamino-quinolimidas **138** y **139**, mediante reacción del correspondiente metoxi-anhídrido con dos moléculas de *n*-butilamina, con el fin de poder obtener quinolimidas con distinta funcionalización en la posición 5 y en el grupo amino de la posición 9, se estudió la sustitución del grupo metoxilo de 9-metoxi-quinolimidas por aminas de interés. Como se muestra en el Esquema 19, la reacción de las 5-*n*-butil-9-metoxiquinolimidias **94** y **95** con disolución saturada de amoníaco, metilamina o dimetilamina en EtOH, o con 5 equivalentes de azetidina en EtOH, mediante calefacción a 120 °C por irradiación de microondas, dio lugar a las 5-*n*-butil-9-amino-quinolimidas deseadas **138-144** con rendimientos de moderados a buenos.



Esquema 18. Optimización de la síntesis de 9-amino-quinolimidias **138** y **139**

Tal como se comenta en el siguiente apartado, entre estas 5-butil-9-amino-quinolimidias, las portadoras del grupo metilamino o del anillo de azetidina presentaban mejores propiedades fotofísicas. Por ello, aplicando el mismo procedimiento de síntesis, se prepararon las 5-Boc-aminoetil-quinolimidias análogas **145-147**, a partir de **96** y **97**, como intermedios para la posterior preparación de los correspondientes reactivos para el marcaje de péptidos, las respectivas bromometil-acetamidas.



- 94:** R¹ = nBu; R² = H
95: R¹ = nBu; R² = PO(OEt)₂
96: R¹ = (CH₂)₂NHBoc; R² = H
97: R¹ = (CH₂)₂NHBoc; R² = PO(OEt)₂

138 - 147

Esquema 19. Síntesis de 9-amino-quinolimidaz **138-147** por sustitución del grupo 9-metoxilo

Compd.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Rend. (%)
138	nBu	H	nBu	H	85
139	nBu	PO(OEt) ₂	nBu	H	55
140	nBu	H	H	H	50
141	nBu	H	Me	H	82
142	nBu	H	Me	Me	50
143	nBu	H	-(CH ₂) ₃ -		45
144	nBu	PO(OEt) ₂	-(CH ₂) ₃ -		45
145	(CH ₂) ₂ NHBoc	H	Me	H	58
146	(CH ₂) ₂ NHBoc	H	-(CH ₂) ₃ -		40
147	(CH ₂) ₂ NHBoc	PO(OEt) ₂	-(CH ₂) ₃ -		38

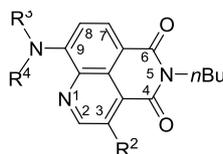
2.1.2.2. Propiedades fotofísicas

Al igual que en el caso de las 9-metoxiquinolimidaz ya comentadas, las propiedades fotofísicas de las 9-aminoquinolimidaz **138-144** se determinaron en los espectros de absorción y emisión realizados en disolventes de polaridad creciente, los resultados se muestran en la Tabla 6 en comparación con los de la 9-metoxiquinolimidaz análoga **94**. Las longitudes de onda de absorción máxima y los coeficientes de extinción molar se determinaron en los espectros de absorción UV/visible, mientras que, las longitudes de onda de emisión máxima y los rendimientos cuánticos fueron determinados en los espectros de fluorescencia de estado estacionario. Los resultados de la tabla 6 indican que la sustitución del grupo 9-metoxilo por un grupo amino induce desplazamientos

Resultados y Discusión

batocrómicos de 60 a 142 nm tanto en las $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ como en las $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (desplazamiento del azul al rojo)

Tabla 6. Propiedades fotofísicas de las 9-amino-quinolimidias **138-144** comparadas con las de la 9-metoxi-quinolimida análoga **94**



138-144

Compd ^a	Disolvente	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_F^b	Brillo
 94	Tolueno	373	10166	454	0.99	10064
	Dioxano	370	10640	461	0.79	8405
	DMSO	378	9898	492	0.05	495
	MeOH	373	6961	495	0.38	2654
	H ₂ O	379	2889	510	0.10	289
138 R ² = H R ³ = nBu R ⁴ = H	Ciclohexano	460	6950	516	0.316	2196
	Tolueno	478	8170	539	0.198	1117
	Dioxano	474	8550	552	0,075	641
	DMSO	493	8260	592	0.013	104
	MeOH	486	7910	590	0.003	18
H ₂ O	472	7180	585	7.8 E ⁻⁴	5.6	
140 R ² = H R ³ = H R ⁴ = H	Ciclohexano	431	11485	502	0.555	6374
	Tolueno	437	10068	524	0.447	4500
	Dioxano	444	10569	530	0.125	1321
	DMSO	465	11577	580	0.016	185
	MeOH	457	11908	570	0.004	48
H ₂ O	457	14880	596	1.19 E ⁻⁵	0.28	
141 R ² = H R ³ = Me R ⁴ = H	Ciclohexano	449	9155	510	0.27	2472
	Tolueno	457	9120	535	0.18	1642
	Dioxano	458	9200	555	0.050	460
	DMSO	475	8345	585	0.012	100
	MeOH	470	11110	586	0.002	22
H ₂ O	483	10949	610	1.3E ⁻⁵	0.14	
142 R ² = H R ³ = Me R ⁴ = Me	Ciclohexano	452	2241	511	0.18	403
	Tolueno	466	1832	539	0.20	366
	Dioxano	460	2440	540	0.061	149
	DMSO	478	2702	560	0.044	119
	MeOH	471	2473	567	0.003	6
H ₂ O	485	5910	597	1.3E ⁻⁴	0.76	

Tabla 6. (Continuación)

Compd ^a	Disolvente	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_F^b	Brillo
143 R ² = H R ³ , R ⁴ = -(CH ₂) ₃ -	Ciclohexano	466	15005	562	0.989	1484
	Tolueno	478	13894	547	0.455	6322
	Dioxano	472	15547	561	0.195	3032
	DMSO	489	14390	580	0.016	230
	MeOH	488	14271	597	0.023	328
139 R ² = PO(OEt) ₂ R ³ = <i>n</i> Bu R ⁴ = H	Ciclohexano	490	8590	551	0.128	1100
	Tolueno	503, 543	9510	583	0.110	1046
	Dioxano	495, 535	6520	598	0.0044	28
	DMSO	512, 583	6570	643	7E ⁻⁴	4.5
	MeOH	512, 582	7420	635	5E ⁻⁴	3.7
144 R ² = PO(OEt) ₂ R ³ , R ⁴ = -(CH ₂) ₃ -	Ciclohexano	494	3205	551	0.316	411
	Tolueno	510	2990	598	0,025	75
	Dioxano	504	3134	598	0,0044	14
	DMSO	520, 555	2584	643	0,048	124
	MeOH	526	2500	590	0.003	1

^aMedidos en duplicado a una concentración 12 μM . ^bRendimientos cuánticos calculados utilizando como referencia la cumarina 153 (en EtOH), excepto para **94**, que fueron calculados utilizando sulfato de quinina (en 0.1 M H₂SO₄).

Además, las 9-amino-quinolimidias **138-144** mostraron mayor comportamiento solvatocrómico que **94**. Así, las $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ se desplazan 12-34 nm hacia el rojo al pasar de ciclohexano a H₂O (en **94** este desplazamiento fue solo 9 nm), las $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ se desplazan 64-100 nm (en **94** este desplazamiento fue 56 nm) y los rendimientos cuánticos de fluorescencia y el brillo sufren importantes disminuciones (disminución ≥ 99 % en el 9-azetidiniil derivado **143**).

La introducción de sustituyentes en el grupo 9-amino (NH₂) de **140** desplaza los máximos, tanto de absorción como de emisión, hacia el rojo y afecta significativamente tanto a los coeficientes de extinción molar (ϵ) como al rendimiento cuántico (Φ_F) y, por lo tanto, al brillo de la emisión ($\epsilon \times \Phi_F$).

Hay que señalar que el grupo dimetilamino, a pesar de ser el grupo dador de electrones más frecuente en diversos fluoróforos, en la quinolimida **142** mostró el peor comportamiento entre todas las 9-amino-quinolimidias preparadas, debido,

principalmente, a sus bajos coeficientes de extinción y bajos rendimientos cuánticos. De forma similar a lo descrito para derivados de naftalimidias⁴⁶, el grupo NH₂ y la azetidina fueron los sustituyentes que dieron lugar a las mejores propiedades fotofísicas. Particularmente, hay que destacar la importante mejora conseguida con el anillo de azetidina en **143**, tanto en los coeficientes de extinción molar como en los rendimientos cuánticos, requiriendo menor energía de excitación y emisión, al ser el fluoróforo que presenta mayores $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ y $\lambda_{\max}^{\text{em}}$. Por ejemplo, en ciclohexano, el coeficiente de extinción de **143** fue un 116 % mayor que el del análogo portador de 9-butilamino **138** y su rendimiento cuántico fue un 210% mayor. Por lo que la emisión de **143** fue un 575% más brillante que la de **138**.

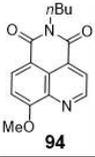
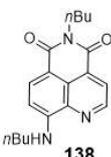
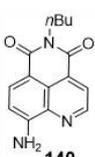
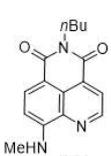
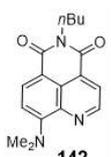
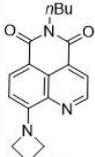
En cuanto a la influencia de la presencia del grupo PO(OEt)₂ en posición 2 en **139** y **144**, se observó la misma tendencia que en los análogos derivados de 9-metoxiquinolimidias, comentados en el subcapítulo anterior. Este grupo induce desplazamientos batocrómicos en las $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ y las $\lambda_{\max}^{\text{em}}$, pero estos desplazamientos van acompañados de una disminución importante en los rendimientos cuánticos. La quinolimida **139** mostró absorción dual en todos los disolventes, a excepción del ciclohexano y el derivado portador de azetidina **144** mostró absorción dual en DMSO. Esta absorción dual indicaría la existencia de dos estados excitados de diferente energía.

La sensibilidad de la fluorescencia de la serie de 9-amino-quinolimidias al pH se estudió en la 9-butil-quinolimida **138** en mezcla (1:9) H₂O/CH₃CN, no observando variaciones significativas de la fluorescencia al variar el pH en el rango 1-13.

Las técnicas de fluorescencia resuelta en el tiempo suministran información adicional a la obtenida en las determinaciones en estado estacionario, como por ejemplo permiten determinar los tiempos de vida de la fluorescencia (τ)⁹. Esta información es muy útil en el desarrollo de biosensores. Por ello, en el Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada se determinaron los tiempos de vida de fluorescencia de las 9-aminoquinolimidias **138** y **140-143** en distintos disolventes en comparación con los de la 9-metoxiquinolimida **94**. Estos datos se recogen en la Tabla 7, junto con los valores de las constantes de desactivación radiativa (K_r) y no radiativa (K_{nr}), calculados aplicando las relaciones $K_r = \Phi_F/\tau$ y $1/\tau = K_r + K_{nr}$ ⁹.

Resultados y Discusión

Tabla 7. Tiempos de vida y constantes de desactivación de las 9-amino-quinolimidas **138**, **140-143** y de la 9-metoxi-quinolimida análoga **94**

Compd ^a	Disolvente	τ (ns)	$K_r \cdot 10^{-7} \cdot s^{-1}$	$K_{nr} \cdot 10^{-7} \cdot s^{-1}$
 94	Tolueno	10.43	9.5	0.096
	Dioxano	10.97	7.2	1.9
	DMSO	1.30	3.8	73.1
	MeOH	12.10	3.1	5.1
	H ₂ O	5.64	1.8	16.0
 138	Ciclohexano	6.93	4.6	9.9
	Tolueno	6.68	3.0	12.0
	Dioxano	4.59	1.6	20.2
	DMSO	1.31 ^b	1.0	75.3
	MeOH	0.58 ^b	0.5	171.9
	H ₂ O	0.18 ^c	0.4	555.1
 140	Ciclohexano	8.60	6.5	5.1
	Tolueno	6.57	6.8	8.4
	Dioxano	4.51	2.8	19.4
	DMSO	0.87 ^b	1.8	113.1
	MeOH	0.40 ^b	1.0	249.0
	H ₂ O	0.13 ^c	0.009	769.2
 141	Ciclohexano	6.09	4.4	12.0
	Tolueno	6.54	2.8	12.5
	Dioxano	2.45 ^b	2.0	38.8
	DMSO	1.25 ^b	1.0	79.0
	MeOH	0.52 ^b	0.4	191.9
	H ₂ O	0.04 ^c	0.03	250.0
 142	Ciclohexano	2.00 ^b	9.0	41
	Tolueno	4.17 ^b	4.8	19.2
	Dioxano	2.46 ^b	2.5	38.2
	DMSO	1.28 ^b	3.4	64.7
	MeOH	0.61 ^b	0.5	163.4
	H ₂ O	0.09 ^c	0.14	111.1
 143	Ciclohexano	12.58	7.9	0.087
	Tolueno	10.88	4.2	5.0
	Dioxano	8.88	2.2	9.1
	DMSO	2.35	0.7	41.9
	MeOH	0.92	2.5	106.2
	H ₂ O	0.14 ^c	0.1	714.2

^aMedidos a una concentración 20 μ M. ^bTiempo de vida de fluorescencia promedio (τ) de decaimiento biexponencial. ^cTiempo de vida promedio de decaimiento triexponencial.

En general, los datos muestran gran paralelismo entre los tiempos de vida y los rendimientos cuánticos, que, en ambos casos, disminuyen significativamente al aumentar la polaridad del disolvente. En este sentido, sorprende el comportamiento anómalo de la 9-metoxiquinolimida **94**, que mostró el mayor tiempo de vida en MeOH (12.10 ns) y un valor intermedio (5.64 ns) en H₂O, lo que indicaría algún tipo de interacción específica, como por ejemplo de tipo enlace de hidrógeno, en los disolventes próticos MeOH y H₂O, que dificultase la desactivación no radiativa. Esta anomalía se observó también en el rendimiento cuántico en MeOH, que aumentó en relación a los observados en DMSO y H₂O.

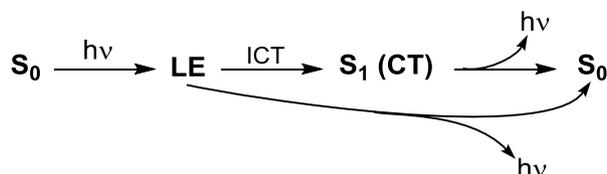
Entre las 9-aminoquinolimidias, la 9-azetidiniolimidia **143** fue la que mostró mayor diferencia en el tiempo de vida al aumentar la polaridad del disolvente (pasa de 12.58 ns en ciclohexano a 0.14 ns en H₂O, 99% de disminución). La disminución en los tiempos de vida va acompañada de disminución en la constante de desactivación radiativa (K_r) y un gran aumento en la constante de desactivación no radiativa (K_{nr}). Así, por ejemplo, en **143**, al pasar de ciclohexano a H₂O, la K_r sufre una disminución del 99% y la K_{nr} aumenta más de 8000 veces. Hay que señalar que en las 9-amino-quinolimidias **138** y **140-142** la fluorescencia presenta caída biexponencial o triexponencial en disolventes polares y el derivado dimetilamino **142** incluso en disolventes no polares, indicando que la emisión se produce desde dos o más estados excitados diferentes. Sin embargo, en el caso del derivado de azetidina **143**, la caída de fluorescencia fue monoexponencial en todos los disolventes excepto en H₂O.

Las buenas características electrodonadoras de los grupos amino son responsables de su frecuente presencia en diversos fluoróforos, en los que se ha observado una influencia importante de los sustituyentes en dicho grupo amino sobre las propiedades fotofísicas. Esta influencia ha sido objeto de estudio en diversos fluoróforos²³⁸, tales como 4-aminobenzonitrilos²³⁹⁻²⁴¹, 4-amino-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazoles²⁴², 4-amino-naftalimidias²⁴³⁻²⁴⁶, 4-amino-benciliden-imidazolonas²⁴⁷ y 1-aminoindoles^{248, 249}. Se admite que la excitación conduce inicialmente a un estado excitado singlete con geometría similar a la del estado fundamental (S_0), denominado estado localmente excitado (LE), que no corresponde a un mínimo de energía.

Este estado LE suele relajarse muy rápido por conversión interna al primer estado singlete excitado (S_1), en el que puede haber cambios en la geometría para minimizar la

energía y, en el caso de fluoróforos portadores de grupos dadores y aceptores de electrones, facilitar la transferencia intramolecular de carga (ICT).

Dependiendo de la diferencia energética entre los estados excitados LE y S_1 , la relajación al estado fundamental S_0 mediante emisión de luz puede tener lugar desde uno u otro de estos estados excitados o desde ambos (Esquema 20), en este caso el fluoróforo mostrará emisión dual. La emisión desde el estado LE es de mayor energía y, por lo tanto, se produce a menor $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ que la desde el S_1 (CT). Por otra parte, cuanto mayor sea la diferencia de energía entre la excitación y la emisión, mayor será el desplazamiento de Stokes



Esquema 20. Esquema simplificado de la excitación y relajación de un fluoróforo

En fluoróforos portadores de grupos electrodonadores amino, los sustituyentes sobre este grupo determinan, dependiendo de su efecto inductivo y volumen estérico, que la emisión se produzca principalmente desde el estado LE o desde el CT. Se han propuesto diferentes modelos de emisión ICT para explicar el diferente comportamiento de estos fluoróforos^{239, 241, 246, 248-250}. Por una parte, el modelo TICT, en el que en el primer estado excitado LE se produce una transferencia de carga del grupo donador al aceptor dando lugar a un diradical que, para minimizar la repulsión de Coulomb, se estabiliza mediante una rotación de 90° alrededor del enlace entre el grupo amino y el anillo aromático. Esta rotación da lugar a que los orbitales π del dador y del aceptor se sitúen desacoplados y ortogonales, dificultando la emisión desde el estado TICT al estado fundamental (S_0) y la relajación tiene lugar fundamentalmente por interacción no radiativa con el disolvente. Los fluoróforos que siguen este modelo, muestran grandes desplazamientos de Stokes y bajos rendimientos cuánticos, que disminuyen al aumentar la polaridad del disolvente. Por otra parte, el modelo PICT, en el que dador y aceptor no son coplanares en el estado fundamental y, tras la excitación, esta estructura no

representa un mínimo de energía, estabilizándose mediante un giro a una estructura plana (PICT), que facilita la transferencia de carga, la relajación desde este estado al S_0 por emisión de fluorescencia sí está permitida. Estos fluoróforos presentan grandes desplazamientos de Stokes y altos rendimientos cuánticos. No todos los fluoróforos se ajustan a estos dos modelos, pues, además de la participación de la rotación del enlace del grupo amino al anillo aromático, hay que tener en cuenta la inversión del átomo de nitrógeno y en el caso de aminas cíclicas, la movilidad conformacional del anillo^{242, 244}.

Teniendo en cuenta la importante influencia de variaciones estructurales sobre la fluorescencia, se realizaron diversos estudios estructurales sobre las 9-aminoquinolimidias **138** y **140-143** mediante RMN dinámica, análisis de difracción de rayos X y cálculos TD-DFT, que se comentan a continuación.

2.1.2.3. RMN dinámica

En el espectro ^1H -RMN de la 9-azetidil-quinolimida **143** en CDCl_3 a temperatura ambiente, los protones 2- y 4-H del anillo de azetidina aparecían como una única señal ancha a 4.55 ppm, mientras que, los protones 3-H aparecían como un quintuplete resuelto a 2.49 ppm. En el correspondiente espectro ^{13}C -RMN, los carbonos C_2 y C_4 de la azetidina no aparecían. Estos datos sugerían un intercambio de protones y carbonos, motivado por inversión en el N de la azetidina o por giro alrededor del enlace $\text{C}_9\text{-N}^{251}$, que podría influenciar el comportamiento fotofísico de **143**.

Por ello, se estudió dicho intercambio mediante RMN-dinámica, registrando el espectro ^1H -RMN a diferentes temperaturas en el intervalo 217-329 °K (Figura 34). A 217 °K los protones 2- y 4-H aparecían como dos tripletes ($J = 7.5$ Hz) a 4.32 y 4.97 ppm, respectivamente, y coalescían a 273 °K (T_c). Si el intercambio se debiese a la inversión del nitrógeno, ambos protones 2-H o 4-H deberían ser diferentes (uno axial y el otro ecuatorial), con constante de acoplamiento geminal (> 11 Hz) y pequeña diferencia de desplazamiento químico entre ellos. Sin embargo, en el caso de giro alrededor del enlace $\text{C}_9\text{-N}$, los protones 2-H deberían aparecer diferentes de los 4-H, debido a la asimetría del anillo de quinolimida. La irradiación del doblete a 6.46 ppm, correspondiente al protón 8-H del anillo de quinolimida, produjo un pequeño efecto NOE sobre el triplete a 4.32 ppm, permitiendo de esta forma la asignación de la orientación de

los protones 2- y 4-H en los dos rotámeros que se intercambian. Con el programa gnmr²⁵² se calculó la entalpia y la energía libre del intercambio de los dos rotámeros como 46.56 y 52.28 kJ.mol⁻¹, respectivamente, valores del mismo orden que los descritos para otros derivados de azetidina similares²⁵¹. El conjunto de resultados indicó que el lento intercambio nuclear es debido a rotación interna alrededor del enlace azetidina-quinolimida y no a la inversión en el nitrógeno, que debe ser muy rápida para poder ser observada en la escala de tiempos de la RMN. Hay que señalar que en el análogo portador del grupo dimetilamino **142** no se observó intercambio en los espectros de RMN en el intervalo de 217-329 °K.

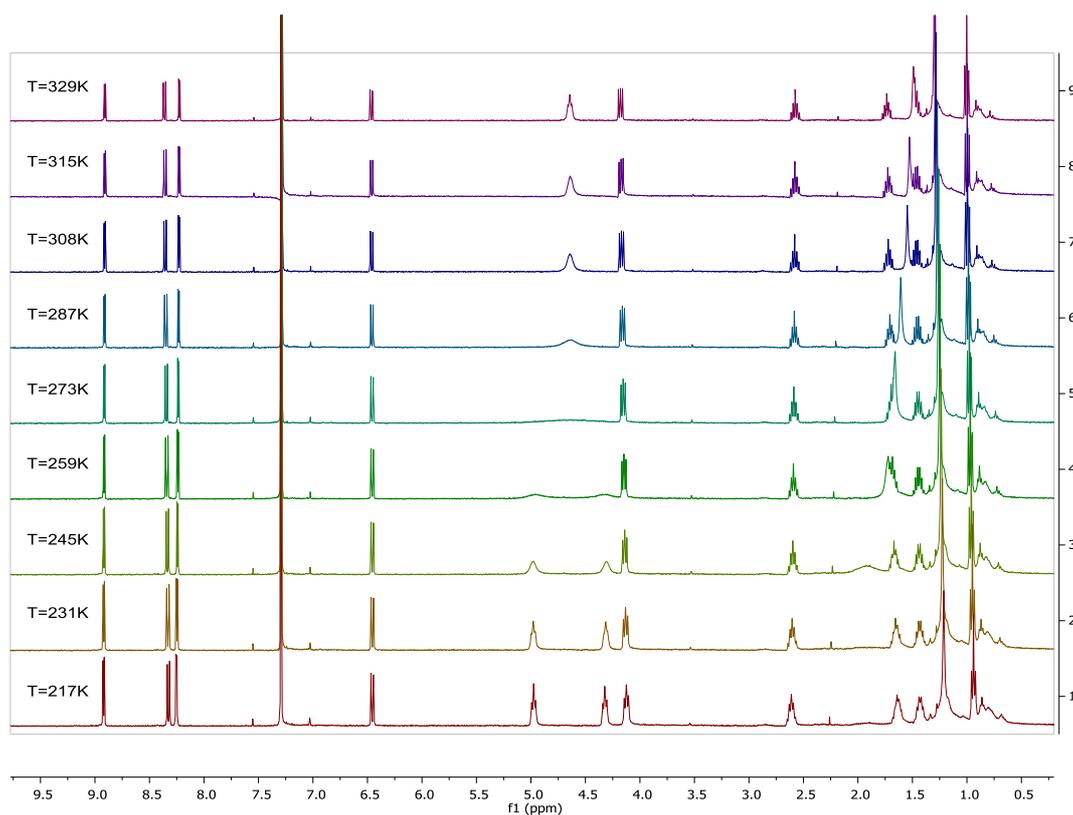


Figura 34. Espectro ¹H-RMN de la 9-azetidini-quinolimida **143** en función de la temperatura

2.1.2.4. Análisis de difracción de rayos X

Se intentó la cristalización de todas las amino-quinolimidias preparadas para determinar sus coordenadas estructurales mediante análisis de difracción de rayos X. Se obtuvieron buenos cristales para todos los fluoróforos, excepto para el derivado de azetidina **143**. En la figura 35 se muestran las estructuras obtenidas para las quinolimidias **138** y **140-142** y en la Tabla 8 se resumen sus parámetros moleculares más significativos obtenidos en el análisis de rayos X, realizado en el Instituto Rocasolano del CSIC, bajo la dirección de la Dra. Lourdes Infantes.

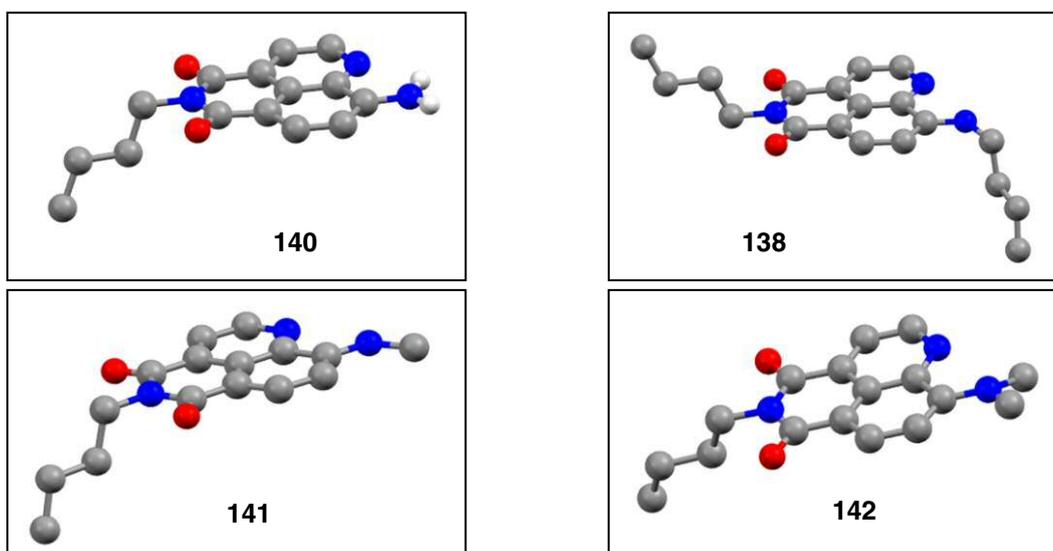


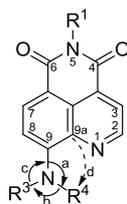
Figura 35. Estructuras de rayos X para las 9-amino-quinolimidias **138** y **140-142**. No se muestran los átomos de hidrógeno, excepto los del grupo NH_2 de **140**

En el espectro de la 9-amino-quinolimidia **140** en su celdilla unidad se observó una única estructura molecular, a la que se denominó A, mientras que en las celdillas de los análogos con el grupo amino monosustituido **138** y **141**, se identificaron dos estructuras A y B, que se diferencian en un enlace de hidrógeno observado en la estructura B entre el NH de una molécula y el grupo $\text{C}_6=\text{O}$ de la estructura A. Este enlace de hidrógeno produce una pequeña distorsión en el ángulo diedro $\text{C}_{9a}\text{-C}_9\text{-N-R}^4$ (d, 7-13°). En el caso del derivado portador del grupo dimetilamino **142**, en su celdilla se observaron dos estructuras independientes, A y B, que corresponden a distintos ángulos de giro del

Resultados y Discusión

grupo dimetilamino con respecto al plano del anillo de quinolimida. En la figura 35 solo se muestra en cada caso la estructura identificada como A. En todos los compuestos tanto las longitudes de enlace (1.341-1.369 Å) como la suma de los ángulos de enlace del N ($\approx 360^\circ$) fueron indicativos de nitrógeno trigonal y de carácter parcial de doble enlace, con restricción de giro alrededor del enlace C₉-N. El ángulo diedro entre el plano del grupo amino y el plano de la quinolimida (d, C_{9a}-C₉-N-R⁴ $\approx 0^\circ$) indicó su coplanaridad, excepto para el derivado de dimetilamino **142**, donde este grupo está girado (7° en la estructura A y 30° en la estructura B). Este compuesto mostró la mayor longitud de enlace C₉-N y, por lo tanto, menor carácter de doble enlace.

Tabla 8. Parámetros estructurales de las 9-amino-quinolimidias **138** y **140-142**, obtenidos en el análisis de rayos X



	140	138	141	141	142	142	
R³	H	<i>n</i> Bu	Me	Me	Me	Me	
R⁴	H	H	H	H	Me	Me	
Conformación	A	A	B	A	B	A	B
C ₉ -N longitud de enlace (Å) ^a	1.348 (2)	1.342 (5)	1.341 (6)	1.351 (7)	1.347 (7)	1.362 (3)	1.369 (3)
C ₉ -N ángulos de enlace (grados) ^a							
a	119.5 (17)	125.1 (4)	124.3 (4)	124.3 (5)	124.2 (5)	119.9 (2)	119.2 (2)
b	126.0 (2)	124.0 (3)	127.0 (4)	122.0 (4)	116.0 (4)	111.1 (2)	113.5 (2)
c	114.0 (14)	111.0 (3)	108.0 (4)	114.0 (4)	119.0 (4)	128.8 (2)	124.8 (2)
a + b + c	359.5 (22)	360.1 (6)	359.3 (7)	360.3 (7)	359.2 (7)	359.8 (3)	357.8 (3)
Angulo diedro (d) (grados)	1.0	0.1	7.1	2.2	13.5	7.0	30.4

^aError de medida entre paréntesis

2.1.2.5. Cálculos TD-DFT

Dada la dificultad de obtener buenos cristales del azetidiniol derivado **143** para su análisis de rayos X, con el fin de ayudar a explicar su comportamiento fotofísico, en comparación con el de las 9-aminoquinolimidias **138** y **140-142**, se realizaron cálculos TD-DFT, a nivel computacional PBE0/6-31, utilizando el programa Gaussian-09, bajo la dirección del Prof. Ibon Alkorta del IQM. En primer lugar, se optimizó la geometría del estado fundamental (GS) y del primer estado excitado (ES) para todos los fluoróforos y los parámetros más significativos se recogen en la Tabla 9.

Los cálculos identificaron dos estructuras de mínima energía en el estado fundamental para las quinolimidias **138**, **141** y **142**, muy similares a las estructuras A y B identificadas en el análisis de rayos X y que en la Tabla 8 se han indicado también como A y B. Sin embargo, en las 9-amino- y 9-azetidiniol-quinolimidias **140** y **143** solo se identificó un único mínimo. Al comparar los resultados con los datos de rayos X, en general, hay una buena correlación. Hay que resaltar que para el azetidiniol derivado **143** se obtuvo la menor longitud de enlace C₉-N, por lo tanto sería el que tiene un mayor carácter π y daría mejor transferencia de carga (ITC), lo que explicaría su mejor fluorescencia (mayores $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$, $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ y Φ_F). Por el contrario, tanto los datos de difracción de rayos X como los cálculos TD-DFT indican que el derivado portador de dimetilamino **142** posee la mayor longitud de enlace C₉-N y la menor coplanaridad con el anillo de quinolimida, que podría ser la causa de su peor comportamiento fotofísico.

En todos los compuestos se identificaron dos estados de energía de transición para la rotación del grupo amino alrededor del enlace C₉-N. En cada caso, la energía del menor estado de transición fue considerada su barrera de rotación. La entalpía de esta rotación calculada para el derivado de azetidina **143** fue 48.5 kJ.mol⁻¹, que es una buena aproximación a la calculada mediante RMN-dinámica (46.56 kJ.mol⁻¹).

Los cálculos no indican cambios significativos en la geometría de los estados excitados con respecto a los estados fundamentales, únicamente destacar un pequeño acortamiento en la longitud del enlace C₉-N en el estado excitado de **138**, **140** y **141**, mientras que, en el derivado dimetilamino **142** la excitación produce una pequeña elongación. Se calcularon también los momentos dipolares en el estado fundamental y en el estado excitado. Como era de esperar para fluoróforos ICT, la excitación produce

significativos incrementos en los momentos dipolares, siendo estos mayores, tanto en el estado fundamental como en el estado excitado, para el 9-azetidínil derivado **143**.

Tabla 9. Parámetros moleculares calculados para las quinolimidas **138** y **140-143**

Compd	Estado de energía	ΔH^a (kJmol ⁻¹)	Longitud C ₉ -N (Å)	9-N Ángulos (°)				Ángulo diedro (d)	μ^b (D)
				a	b	c	a+b+c		
138 (A)	GS	63.3	1.346	124.9	120.0	115.1	360.0	0.2	5.9
	ES		1.336	127.4	120.9	111.7	360.0	0.2	10.2
138 (B)	GS	74.7	1.355	114.4	114.9	130.7	360.0	-1.1	
	ES		1.347	114.5	114.3	131.2	360.0	-0.3	
140	GS	48.3	1.349	121.7	120.2	118.0	359.9	-1.5	4.7
	ES		1.333	123.1	121.6	115.3	360.0	-0.1	8.2
141 (A)	GS	62.7	1.347	124.4	120.7	115.0	360.0	0.0	5.6
	ES		1.337	126.8	121.6	111.7	360.0	-0.1	9.2
141 (B)	GS	75.4	1.356	114.2	115.7	130.0	360.0	-0.2	
	ES		1.347	114.3	115.1	130.6	360.0	-0.1	
142 (A)	GS	22.5	1.372	118.6	112.6	123.0	354.2	42.1	4.8
	ES		1.376	120.8	115.3	122.1	358.2	38.0	9.6
142 (B)	GS	32.7	1.364	119.6	114.7	124.3	358.5	-31.0	
	ES		1.376	120.7	115.2	122.3	358.2	-38.0	
143	GS	48.5	1.343	129.3	94.2	135.8	359.3	0.4	6.5
	ES		1.340	130.4	94.3	135.4	360.0	-0.3	10.5

^aEntalpía de la rotación del grupo amino. ^bMomento dipolar (debye)

A la vista de los datos conjuntos de rayos X y de los cálculos, el mejor comportamiento fotofísico de esta 9-azetidínil-quinolímida podría explicarse como consecuencia de su menor longitud del enlace C₉-N y coplanaridad del anillo de azetidina con el de quinolímida y, por lo tanto, mayor carácter de enlace π , que facilitaría el proceso de ICT. Por el contrario, en el dimetilamino derivado **142**, su mayor longitud de enlace C₉-N y el giro del plano del grupo dimetilamino con respecto al anillo de quinolímida, dificultarían el proceso ICT y podrían ser la causa de su peor fluorescencia.

2.1.2.6. Citotoxicidad en líneas celulares de cánceres humanos

Al igual que se ha comentado en el subcapítulo anterior para los derivados de 9-metoxi-quinolimidias, las 9-amino-quinolimidias **138-147** fueron incluidas en los cribados HTS en líneas celulares de cáncer humano de la compañía Pharma Mar, S. A. Se determinó la citotoxicidad en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (A549), de colón (HT29), de mama (MDA-MD-231) y de páncreas (PSN1), utilizando doxorrubicina como control positivo y siguiendo los protocolos del National Cancer Institute (NCI) de USA^{203, 204}. Ninguna de las quinolimidias **138-147** mostró citotoxicidad a la máxima concentración ensayada de 10 μ M.

2.1.2.7. Estudio de la agregación del péptido β -amiloide

Aunque la etiología de la enfermedad de Alzheimer no está completamente establecida, la investigación clínica apoya la hipótesis de que la cascada de la agregación β -amiloide ($A\beta$) (monómeros \rightarrow oligómeros \rightarrow fibrillas \rightarrow placas $A\beta$) juega un papel principal y que transcurre un largo periodo de tiempo desde la aparición de las primeras placas $A\beta$ hasta la aparición de la sintomatología de la enfermedad²⁵³⁻²⁵⁶. Por ello, la formación de estas placas $A\beta$ ha atraído mucha atención como biomarcador para el diagnóstico temprano de la enfermedad y su tratamiento²⁵⁷⁻²⁶⁰. Las placas $A\beta$ se forman por la agregación de los péptidos $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$, que son productos de la degradación de una proteína precursora (APP), generados por la acción de β - y γ -secretasas^{253, 255}. Hay evidencias crecientes que sugieren que los oligómeros $A\beta$ son la forma neurotóxica responsable de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, que finalmente conduce a los desórdenes de comportamiento y cognitivos. Teniendo en cuenta la importancia de la agregación y acumulación $A\beta$ en el diagnóstico de esta enfermedad, la última década ha visto un gran progreso en el desarrollo de sondas para la detección no-invasiva de esta agregación, basadas principalmente en técnicas de tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía computerizada de emisión de un fotón (SPECT) e imagen de resonancia magnética (MRI)^{261, 262}. Sin embargo, problemas de baja sensibilidad de las sondas de MRI, alto coste, poca disponibilidad y corta vida de los isótopos en las sondas de PET y la radiactividad de las sondas SPECT han restringido su uso clínico^{257, 258}. Por ello, son necesarias técnicas alternativas más

baratas y fácilmente aplicables como las de fluorescencia, en particular la imagen de fluorescencia en el infrarrojo cercano.

Hasta ahora, se han descrito numerosas sondas fluorescentes de la agregación A β , pero la mayoría solo se pueden utilizar *in vitro*, siendo muy limitado el n $^{\circ}$ de sondas que permiten su uso *in vivo*^{257, 258}, por lo que la investigación en este campo es de alto interés. Por ello, teniendo en cuenta las buenas propiedades fotofísicas de la 9-azetidilquinolimida **143**, decidimos explorar su aplicación como sensor de la agregación A β , en colaboración con el grupo de Fotoquímica y Fotobiología de la Universidad de Granada, bajo la dirección del Dr. Ángel Orte Gutiérrez. En primer lugar, se observó espectroscópicamente la interacción de **143** con A β_{42} en disolución durante el proceso de agregación. Como se observa en la Figura 36A, al aumentar el tiempo de incubación conjunta hasta 20 h, la fluorescencia de **143** se incrementó 11 veces y el máximo de emisión se desplazó de 630 nm (emisión en H $_2$ O) a 567 nm (similar a la emisión en dioxano). Esta evolución en el espectro de emisión indica cambios en la hidrofobicidad del entorno del fluoróforo con la agregación de A β_{42} .

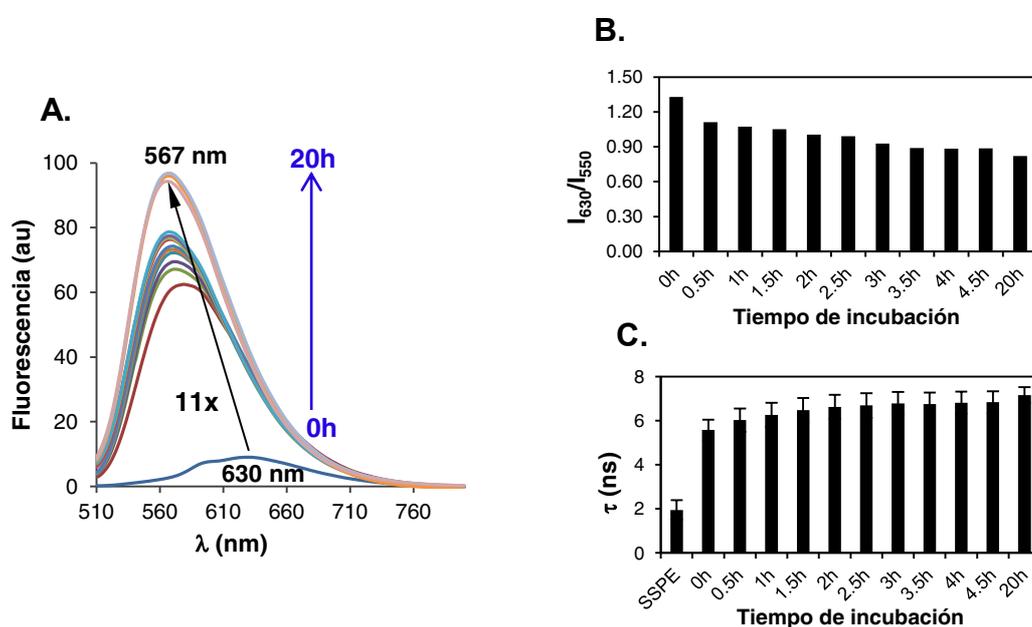


Figura 36. Interacción de **143** (2 μ M) con A β_{42} (100 μ M) en disolución. (A) Espectros de emisión ($\lambda_{ex} = 490$ nm) a diferentes tiempos de incubación. (B) I_{630}/I_{550} a diferentes tiempos de incubación. (C) Tiempo de vida de fluorescencia de **143** a diferentes tiempos de incubación.

Para visualizar el desplazamiento hipsocrómico hacia el color azul con el tiempo de incubación, se representó la relación de intensidades I_{630}/I_{550} frente al tiempo (Figura 36B). I_{630} representa el número de fotones emitidos en una anchura de banda 630 ± 30 nm e I_{550} representa los emitidos en una anchura de banda de 550 ± 20 nm. La relación I_{630}/I_{550} claramente muestra una significativa disminución con el tiempo de incubación. La medida en paralelo de los tiempos de vida de fluorescencia (τ) mostró un aumento de 1.5 ns al pasar de 0 a 20 h de incubación (Figura 36C).

Estos resultados nos llevaron a aplicar una aproximación de imagen multidimensional para directamente visualizar los agregados pre-amiloides. Utilizando microscopía de imagen de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) de doble color se aprovecha el largo tiempo de vida del fluoróforo en entornos hidrófobos para visualizar la formación de agregados hidrófobos tempranos. La observación a través de un doble canal de emisión (Figura 37) permite seguir los cambios en la hidrofobicidad de los agregados mediante imagen ratiométrica en las dos regiones espectrales de 550 y 630 nm. Esta técnica permite obtener imágenes de microscopía de los dos canales de observación y su integración, así como el análisis de las imágenes en función de los tiempos de vida de emisión.

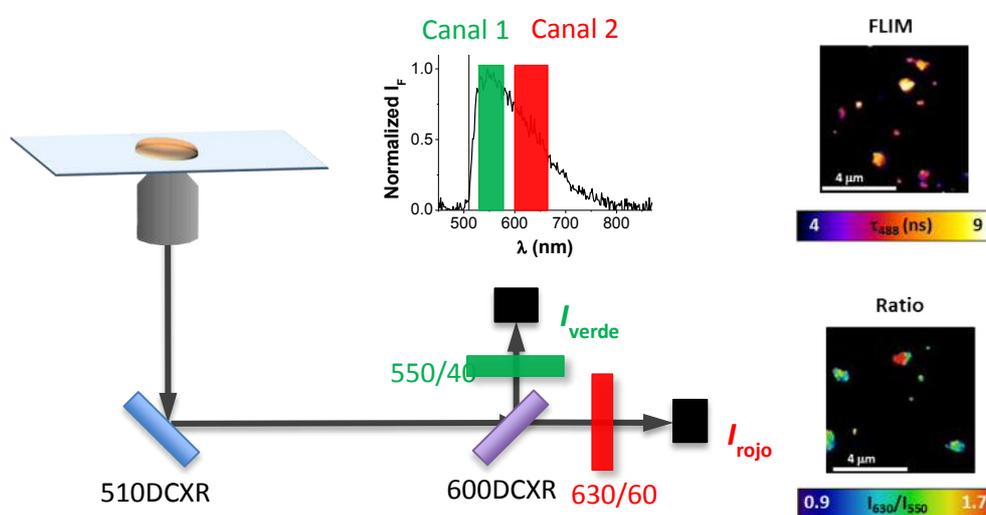


Figura 37. Esquema de la instrumentación para imagen de FLIM e imagen ratiométrica de los dos canales diferentes de detección (verde a 550/40 y rojo a 630/60).

En la Figura 38 se muestran las imágenes de los agregados con el fluoróforo obtenidas a distintos tiempos de incubación.

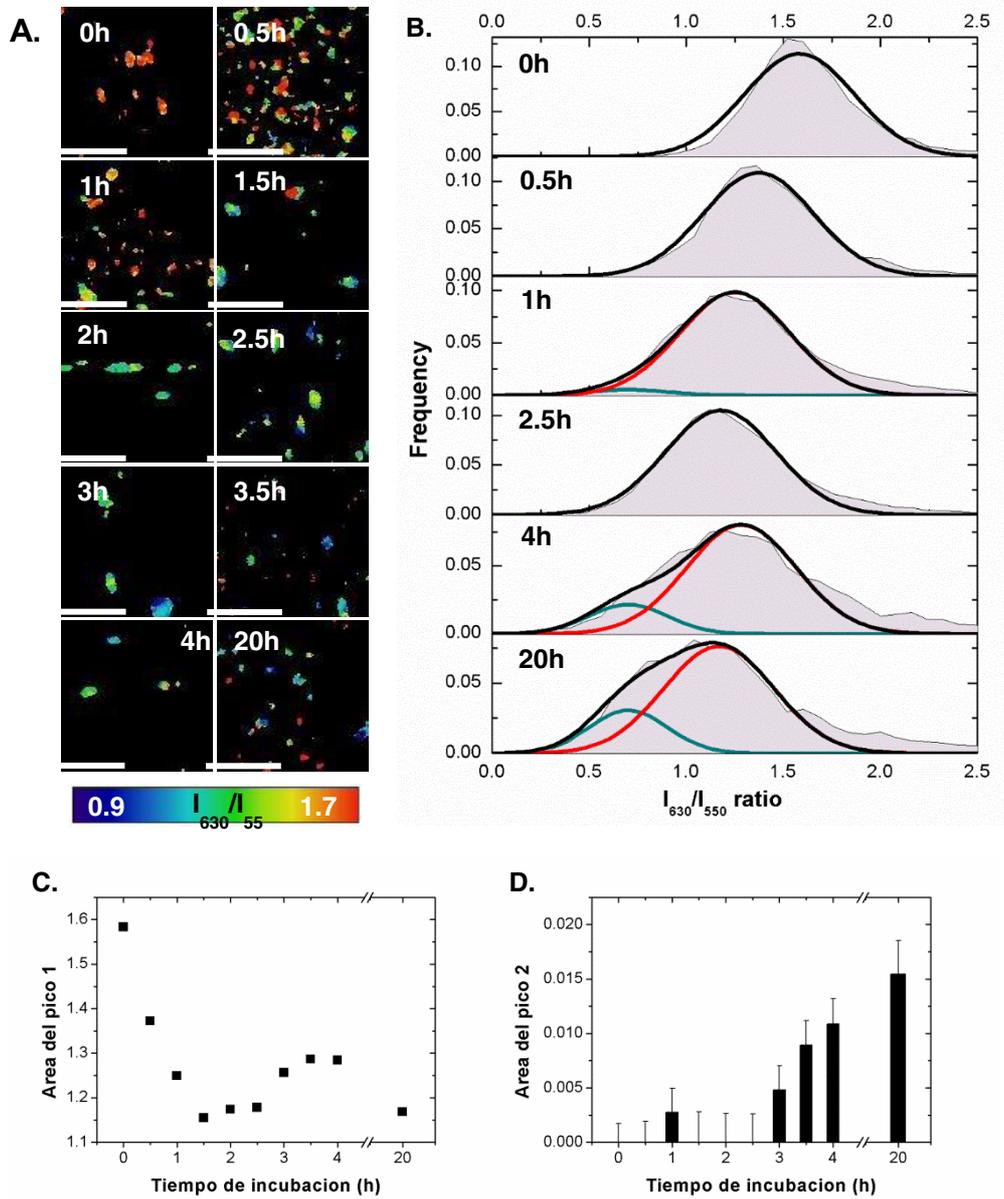


Figura 38. Análisis ratiométrico mediante FLIM de la interacción de **143** con $A\beta_{42}$. (A) Imágenes representativas de la relación I_{630}/I_{550} en una escala de pseudocolores. Las barras horizontales de escala representan $4\mu\text{m}$. (B) Histogramas de frecuencia de valores de I_{630}/I_{550} de agregados de $A\beta_{42}$ (media de, al menos, 10 imágenes diferentes). (C) y (D) centro del pico Gaussiano de alta frecuencia (C) y áreas del pico Gaussiano de baja frecuencia (D) obtenidos en los ajustes de los histogramas de I_{630}/I_{550} en (B).

Las imágenes de la relación I_{630}/I_{550} (Figura 38A) claramente muestran agregados desde el comienzo de la incubación, de acuerdo con un estado de coalescencia inmediatamente en cuanto el péptido se pone en condiciones de agregación. Sin embargo, las imágenes muestran un valor I_{630}/I_{550} próximo a 1.6, con una distribución espectral centrada alrededor de 630 nm. Según aumenta el tiempo de incubación, las imágenes de I_{630}/I_{550} muestran un desplazamiento hacia valores más bajos, con un mínimo a las 2.5 h de incubación. La Figura 38B muestra los histogramas de frecuencia de los valores de I_{630}/I_{550} calculados a partir de los pixels de las imágenes de los agregados de A β ₄₂. Estas distribuciones fueron ajustadas globalmente a la suma de dos funciones Gaussianas, con un pico de alta frecuencia (color rojo), y centro ajustable independiente, y un pico de baja frecuencia (color verde).

El pico de alta frecuencia se desplaza hacia valores de I_{630}/I_{550} menores con el tiempo de incubación, tiene un mínimo a 1.5 h y una ligera subida hasta las 3.5 h para volver a caer después (Figura 38C). Es interesante que el pico de baja frecuencia, centrado a un valor de I_{630}/I_{550} de 0.7, crece después de 3 h de incubación (Figura 38D), aumentando su peso relativo con el tiempo de incubación. Estos datos confirman el potencial del desplazamiento espectral de **143** como herramienta para seguir la agregación A β en experimentos de microscopia de fluorescencia, incluso para revelar la presencia de poblaciones heterogéneas de diferentes tipos de agregados.

La microscopia FLIM permitió también obtener información ortogonal a través del análisis de los valores de tiempos de vida de fluorescencia (τ) de **143** en las imágenes de los agregados A β (Figura 39). Sin embargo, la distribución de tiempos de vida no mostró una tendencia muy significativa a lo largo del periodo de incubación. Las distribuciones de tiempo de vida estuvieron centradas entre 4.5 y 5.9 ns, desplazándose el centro del pico ligeramente hacia tiempos de vida más cortos al aumentar el tiempo de incubación. Este resultado evidencia la heterogeneidad de los entornos en los cuales **143** se puede insertar e interactuar con los agregados A β . Tanto el análisis de la distribución de I_{630}/I_{550} como de la distribución de τ indican que, en términos de hidrofobicidad, el entorno del fluoróforo al interactuar con los agregados es similar a cuando se encuentra disuelto en dioxano.

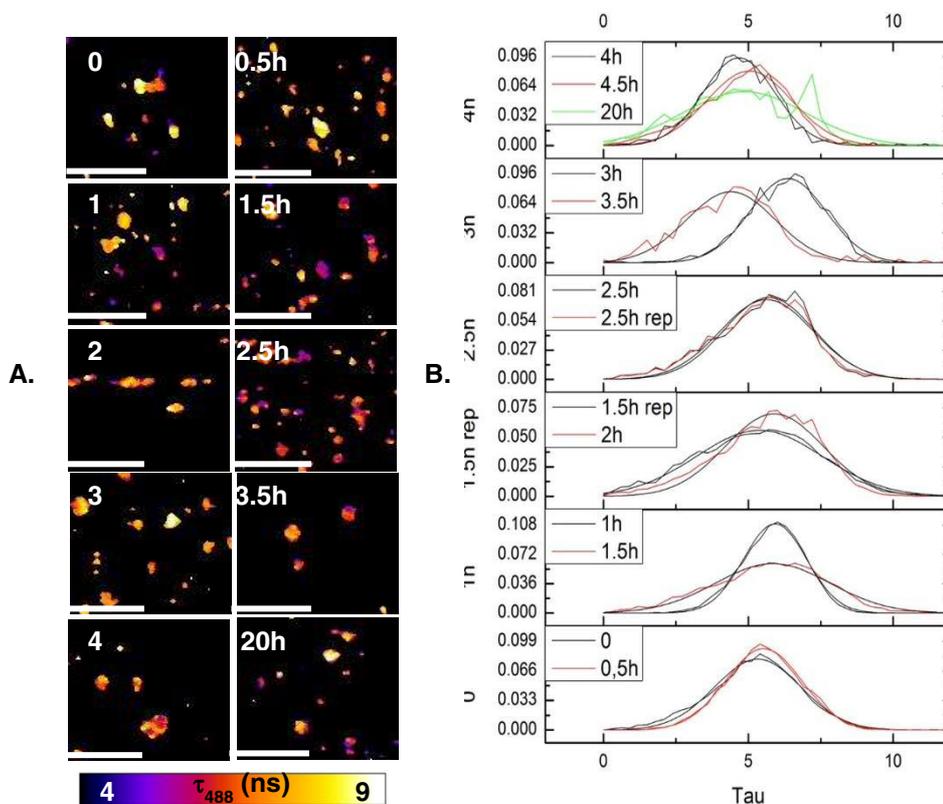


Figura 39. (A) Imágenes FLIM representativas de agregados A β después de distintos tiempos de incubación (λ_{ex} =488 nm). Las barras de escala representan 4 μ m. (B) Histogramas de τ (ns) en agregados (media de 10 imágenes diferentes).

Con el fin de correlacionar las imágenes de FLIM a distintos tiempos de incubación con **143** con la estructura de los agregados, se registraron las imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) de los agregados a los mismos tiempos que las respectivas imágenes de FLIM. Como se muestra en Figura 40, hasta las 2 h de incubación se observaron pequeños agregados sin estructura definida y, a partir de ese tiempo, se empezó a observar la formación de fibrillas, que a las 20 h son las estructuras mayoritarias, y los pequeños agregados van desapareciendo. Estos resultados se correlacionan bien con las imágenes FLIM e histogramas de relaciones I_{630}/I_{550} , en las

que también se observaron cambios significativos a partir de las 2 h de incubación. El conjunto de resultados muestran el potencial de la 9-azetidínil-quinolímida **143** para el seguimiento y estudio del proceso de agregación β -amiloide.

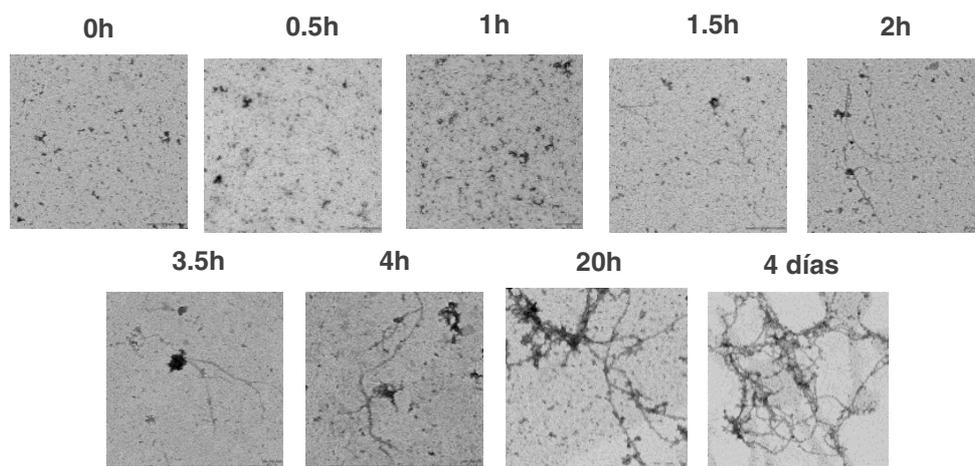
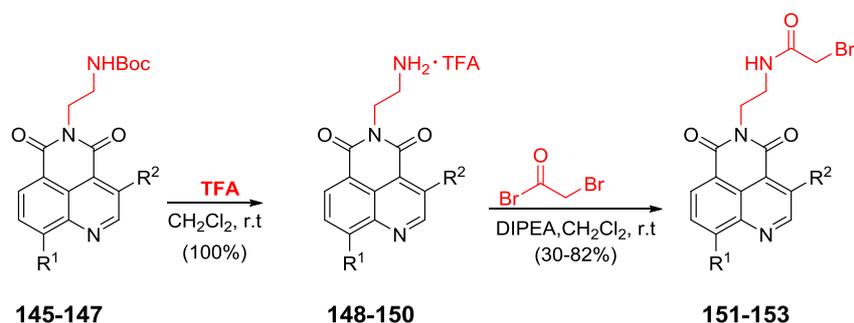


Figura 40. Imágenes TEM de la agregación de $A\beta_{42}$ a distintos tiempos de incubación.

2.1.2.8. Síntesis de bromometil-acetamidas derivadas de 9-amino-quinolímidas como reactivos de marcaje fluorescente de péptidos

Aplicando el procedimiento ya comentado en el apartado 2.1.1.9 para la síntesis de bromometil-acetamidas a partir de 5-[2-(Boc)-aminoetil-quinolímidas a los correspondientes derivados de las 9-amino-quinolímidas **145-147**, tal como se indica en el Esquema 21 se prepararon las bromometil-acetamidas **151-153** con rendimientos de moderados a buenos, por eliminación del grupo protector Boc, seguida de reacción con el bromuro del ácido bromoacético.



- 145, 148, 151:** R¹ = NHMe; R² = H
146, 149, 152: R¹ = Azetidina; R² = H
147, 150, 153: R¹ = Azetidina; R² = PO(OEt)₂

Esquema 21. Síntesis de las bromometil-acetamidas **151-153** derivadas de 9-amino-quinolimidias

2.1.2.9. Sensores *in vitro* de la interacción CDK5/p25

A la vista de la importante mejora en las propiedades fotofísicas de las 9-amino-quinolimidias, en particular los derivados portadores del anillo de azetidina, con respecto a las 9-metoxi-quinolimidias análogas (mayores $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ y $\lambda_{\max}^{\text{em}}$, mayor solvatocromismo), de forma similar a como se ha comentado en el subcapítulo anterior para las 9-metoxi-quinolimidias, se estudió la utilización de las 9-metilamino- y 9-azetidini-quinolimidias **145** y **146**, respectivamente, en sensores de la interacción CDK5/p25.

Para ello, el péptido derivado de la hélice C de CDK5 (K5, GVPSSALREICLLK), portador de un único residuo de cisteína, fue marcado mediante reacción con las bromometil acetamidas **151** y **152** en tampón PBS a -4 °C (Figura 41).

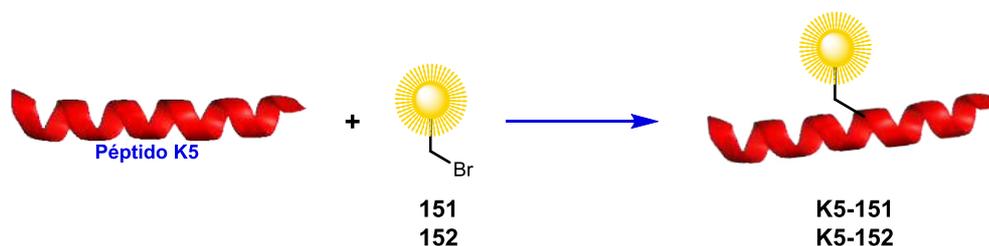


Figura 41. Marcaje fluorescente del péptido **K5** con las bromometil-acetamidas **151** y **152**

A continuación, se registraron los espectros de fluorescencia de concentraciones 5 μM de cada uno de los péptidos marcados **K5-151** y **K5-152** y tras la adicción de cantidades crecientes de una disolución del péptido derivado de la hélice α de interacción de p25 (péptido p25, KEAFWDRCLSVINLM). En ausencia de este péptido, la emisión de los péptidos **K5-151** (Figura 42A) y **K5-152** (Figura 42C) fue muy baja y fue aumentando al aumentar la concentración del péptido p25. Al añadir el péptido p25 a **K5-151** y **K5-152** se produjo un desplazamiento hipsocrómico de 38 y 37 nm (del rojo al naranja) y en la saturación el aumento en la intensidad de la fluorescencia fue 22 y 20 veces, respectivamente, indicativo de la interacción. La constante de disociación calculada para el péptido **K5-151** fue 416.0 ± 83.1 y para el **K5-152** 49.2 ± 15.4 μM . Sin embargo, en la valoración de estos péptidos con un péptido irrelevante para la interacción CDK5/p25, derivado de ubiquitina (VSSDTIDNVKSKIQDKEGC), como péptido control, (Figura 42 B y D) no se produjo aumento de fluorescencia, lo que demostraba que la unión de los péptidos es selectiva para la interacción CDK5/p25. Estos resultados muestran la utilidad de **K5-151** y **K5-152** como herramientas para el estudio *in vitro* de CDK5, en particular el derivado de azetidina **K5-152**, por su mayor luminosidad y sus mayores longitudes de onda de excitación y emisión. Con respecto al marcaje del mismo péptido **K5** con la bromometil-acetamida **136**, comentado en el subcapítulo anterior, el péptido marcado con la 9-azetidil-quinolimida **K5-152** desplazó la excitación y la emisión aproximadamente 100 nm hacia el rojo, con emisión significativamente más brillante. Estos datos son muy importantes para visualizaciones *in celulo*, pues la menor energía de excitación produciría menos daños celulares y la emisión se produciría en una zona de menos interferencias con la emisión celular de fondo.

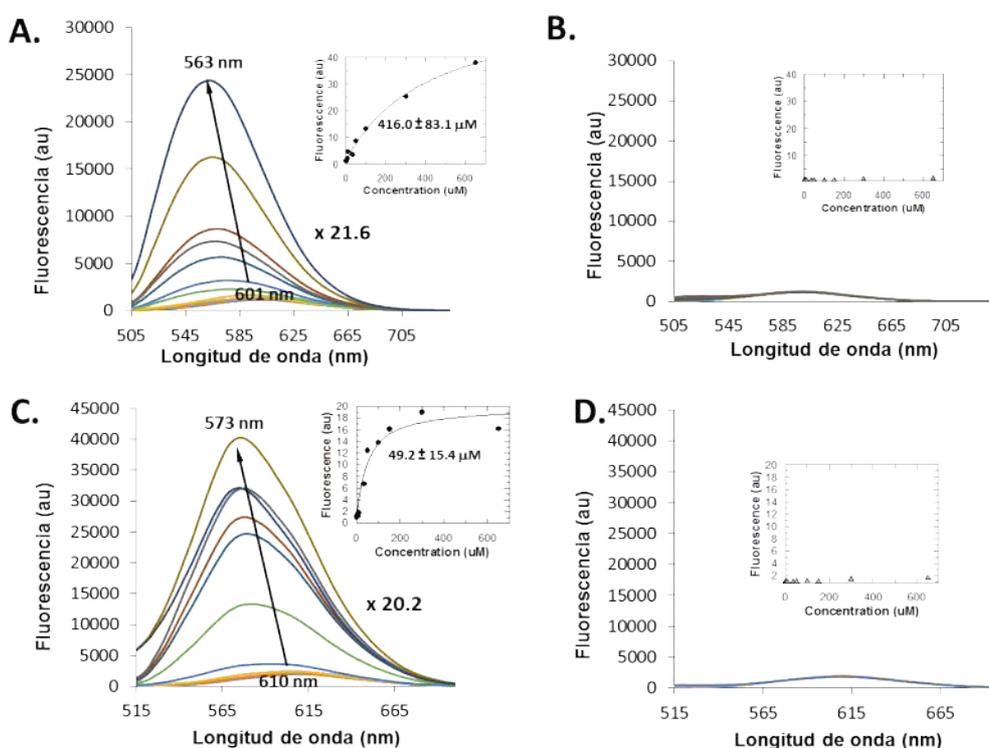


Figura 42. Estudio *in vitro* de la interacción CDK5/p25. (A) Valoración de una concentración 5 μM del péptido **K5-151** con el péptido p25 ($\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$). En el inserto, cálculo de la constante de disociación. (B) Valoración de una concentración 5 μM del péptido **K5-151** con un péptido irrelevante (Ctrl). (C) Valoración de una concentración 5 μM del péptido **K5-152** con el péptido p25 ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$). En el inserto, cálculo de la constante de disociación. (D) Valoración de una concentración 5 μM del péptido **K5-152** con un péptido irrelevante (Ctrl).

2.1.2.10. Visualización *in cellulo* de la interacción CDK5/p25

Por último, al igual que se ha comentado en el subcapítulo anterior para el péptido marcado con la 9-metoxiquinolimida **K5-136**, se estudió la utilidad del péptido marcado con la 9-azetidínil-quinolimida **K5-152** como sonda fluorescente para la localización *in cellulo* de la proteína p25 en células de glioblastoma U87. Como era de esperar, tampoco el péptido **K5-152**, por sí solo, penetró en las células. Por ello, se le ancló en su extremo *N*-terminal el péptido Pep1 (KETWWETWWTEKK), para facilitar su penetración celular. De esta forma, el péptido marcado (**Pep1-K5-152**) penetró fácilmente en las

células y su interacción con p25 endógena se visualizó mediante la emisión de fluorescencia, visualizando en el canal verde de la GFP (Figura 43 A2). Mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando un anticuerpo de p25, marcado con el fluoróforo Alexa647 (Figura 43 A3), se localizó p25 y, al superponer las imágenes A2 y A3, se observó la co-localización de la fluorescencia de **Pep1-K5-152** con la del anticuerpo, comprobándose que la unión era específica entre el péptido **Pep1-K5-152** y la p25 endógena.

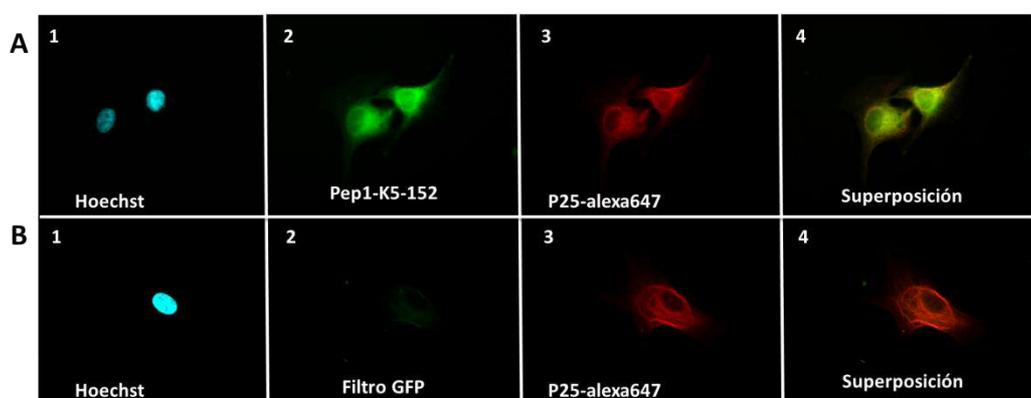


Figura 43 Co-localización de **Pep1-K5-152** con p25. (A) Células tratadas con **Pep1-K5-152** y el anticuerpo p25-alexia64; (1) Visualización con el colorante del núcleo Hoechst; (2) Visualización con el filtro GFP; (3) Visualización con el filtro alexia647; (4) superposición de (2) + (3.) (B) Células tratadas solo con anticuerpo p25-alexia647.

Como se muestra en el histograma de la figura 44, en el que se comparan la intensidad relativa de la fluorescencia emitida por el péptido **Pep1-K5-152**, observada con el filtro GFP, con la emitida por el péptido **Pep1-K5-136**, la intensidad emitida por el péptido marcado con la 9-azetidínil-quinolímida **152** fue, aproximadamente, un 60 % superior a la emitida por la 9-metoxi-quinolímida **136**.

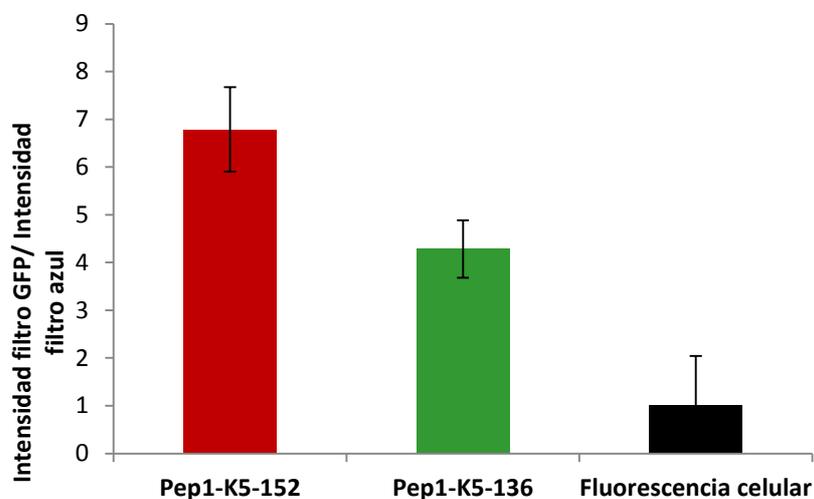


Figura 44. Intensidad relativa de la fluorescencia emitida por **Pep1-K5-152** y por **Pep1-K5-136**

2.1.2.11. Conclusiones

Con el fin de mejorar las propiedades fotofísicas de las 9-metoxi-quinolimidias descritas en el subcapítulo anterior, se han sintetizado análogos en los que se ha incrementado la transferencia de carga intramolecular (ITC) mediante la sustitución del grupo 9-metoxilo por diversos grupos amino, que poseen mayor carácter electrodonador. De esta forma, se ha conseguido mejorar significativamente las propiedades fotofísicas, con desplazamientos batocrómicos de 60-142 nm en las $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ y $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ y mejoras en el comportamiento solvatocrómico y fluorogénico al aumentar la lipofilia del medio. Entre los grupos amino investigados, el anillo de azetidina es que ha presentado mejor comportamiento. Los estudios de RMN, difracción de rayos X y cálculos TD-DFT indican que este mejor comportamiento podría deberse a que, entre los 9-amino derivados estudiados, la 9-azetidil-quinolimida **143** presenta menor distancia de enlace entre el grupo amino y el anillo de quinolimida y mayor coplanaridad entre este anillo y el grupo amino, indicativos de un mayor carácter de enlace π , lo que facilitaría el proceso ITC.

Teniendo en cuenta las buenas propiedades fotofísicas de las 9-amino-quinolimidias, se han preparado bromometil acetamidas derivadas de los mejores fluoróforos, que han

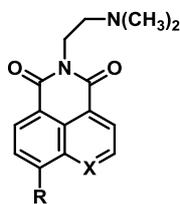
demostrado utilidad para el marcaje fluorescente de péptidos derivados de la secuencia peptídica de CDK5.

Ninguna de las 9-amino-quinolimidias preparadas mostró citotoxicidad en líneas celulares de cánceres humanos. Por lo tanto, es previsible que su potencial aplicación en biosensores no estaría limitada por problemas de citotoxicidad.

La 9-azetidínil-quinolimida **143** ha demostrado ser una buena sonda de fluorescencia tanto para el estudio del proceso de la agregación β -amiloide como para monitorizar la interacción de CDK5 con su proteína reguladora p25 *in vitro* e *in cellulo*. Estos resultados muestran el alto potencial de esta quinolimida como herramienta para el estudio de diferentes interacciones proteína-proteína, tanto *in vitro* como en visualizaciones celulares.

2.1.3. Fluoróforos PET derivados de naftalimida y quinolimida

En este capítulo se describen los resultados de la síntesis, estudio de propiedades fotofísicas y aplicación de derivados de quinolimidias y naftalimidias, de fórmula general **A** (Figura 40), portadores de una cadena de 2-(dimetilamino)etilo, capaz de bloquear la emisión de fluorescencia del anillo aromático mediante transferencia fotoinducida de electrones (PET) desde el par de electrones libre del grupo dimetilamino a la imida.



A: X = CH, N

Figura 40. Estructura general de naftalimidias y quinolimidias PET

Como se ha indicado en la Introducción (1.1.3), la mayoría de los sensores fluorescentes de pH y de cationes funcionan mediante un mecanismo PET²⁶³⁻²⁶⁵, es decir, su estructura está constituida por la unión de tres módulos: un fluoróforo, responsable de las transiciones fotónicas de la excitación y la emisión, un receptor, responsable de la complejación o reconocimiento del analito, y un espaciador de unión del receptor al fluoróforo. Como se ha mostrado en la Figura 4 de la Introducción, en ausencia del analito, la energía del último orbital ocupado HOMO del receptor es mayor que la del HOMO del fluoróforo. La excitación induce la transferencia de un electrón

desde el último orbital ocupado HOMO del fluoróforo a su primer orbital desocupado LUMO y esta transferencia provoca, a su vez, la transferencia de un electrón desde el orbital HOMO del receptor al HOMO del fluoróforo, impidiendo la vuelta del electrón del orbital excitado LUMO mediante emisión de fluorescencia. La unión del analito al receptor estabiliza su orbital HOMO e impide la transferencia electrónica PET, por lo que, tras la excitación, la relajación sí tiene lugar mediante emisión de luz.

Entre los sensores derivados de naftalimididas son numerosos los ejemplos basados en un efecto PET^{82, 89, 266}, tales como los sensores de pH **22a**⁸⁶ y **22b**⁸⁷, el sensor de Zn²⁺ **23**⁸⁸, el sensor de pH y aniones **25**⁹¹, los sensores de ADN **27a-c**^{92, 93}, o el sensor de formaldehído **33**^{109, 110}, ya comentados en la Introducción (1.1.6). Recientemente se ha descrito la 2-aminoetil-naftalimida **154** (Figura 41) como sensor *in cellulo* de Cr³⁺, Fe³⁺ y Hg²⁺ mediante un mecanismo PET²⁶⁷. Por otra parte, estudios con los sensores de pH **22a** y **22b** y sus isómeros posicionales **22c** y **22d**, respectivamente, han puesto de manifiesto que, cuando en la molécula hay sustituyentes dadores de electrones por transferencia de carga (ICT) y por PET, el efecto PET es unidireccional y solo se observa cuando va en la misma dirección que la transferencia de carga ICT, en caso contrario, tiene preferencia la ICT y no se observa PET^{86, 87} (Figura 41).

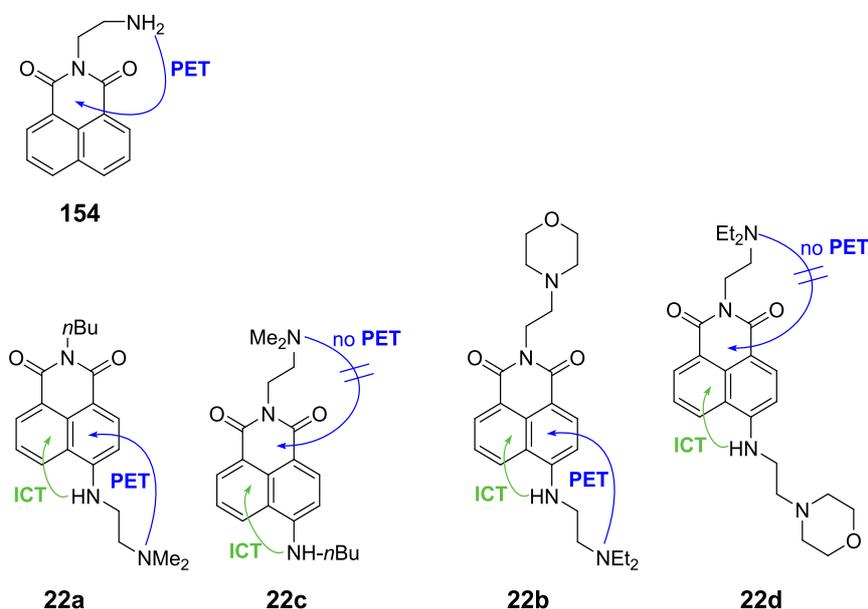
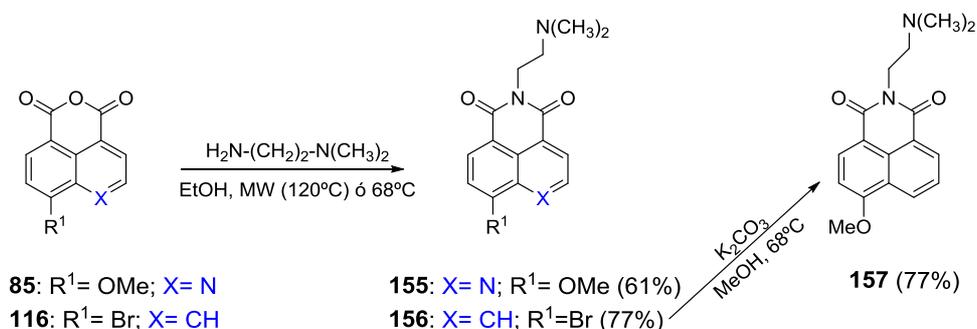


Figura 41. Ejemplos de naftalimididas fluorescentes con mecanismo PET

2.1.3.1. Síntesis

En primer lugar, tal como se indica en el esquema 22, se sintetizaron la 5-[2-(dimetilamino)etil]-9-metoxi-quinolimida **155** y, a efectos comparativos, la correspondiente naftalimida análoga **157**²⁶⁸. La quinolimida **155** se obtuvo con un 61% de rendimiento, a partir del correspondiente anhídrido **85**, aplicando el procedimiento general de síntesis de quinolimidias comentado en el apartado (2.1.1.1), mientras que, la naftalimida análoga **157** se obtuvo con un 59%, a partir del anhídrido comercial **116**, en un proceso de dos etapas, de forma similar a como se ha comentado en el apartado (2.1.1.4) para la síntesis de la 2-[2-(hidroxi)etil]-naftalimida análoga **118**.



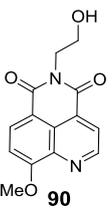
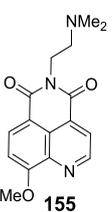
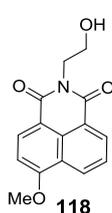
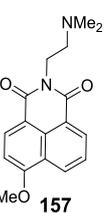
Esquema 22. Síntesis de 2-(dimetilamino)etil-quinolimidias y –naftalimidias

2.1.3.2. Propiedades fotofísicas

Se determinaron las propiedades fotofísicas de absorción y emisión en diferentes disolventes de la quinolimida **155** y la naftalimida **157**, que se recogen en la Tabla 14, junto con las de los correspondientes análogos portadores de la cadena 2-(hidroxi)etilo en lugar de 2-(dimetilamino)etilo **90** y **118**, cuya síntesis se ha comentado en los apartados (2.1.1.1) y (2.1.1.4), respectivamente.

Resultados y Discusión

Tabla 14. Propiedades fotofísicas de la 2-(dimetilamino)etil-quinolimida **155** y la 2-(dimetilamino)etil-naftalimida **157**, en comparación con las 2-(hidroxi)etil- análogas **90** y **118**

Compd ^a	Disolvente	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_F^b	Brillo
 90	CHCl ₃	378	8900	457	0.68	6052
	Dioxano	372	8600	460	0.67	5762
	Acetona	371	8170	468	0.56	4575
	EtOH	375	7221	485	0.36	2596
	F ₃ C-CH ₂ OH	379	7870	488	0.29	2282
	MeOH	375	6760	490	0.27	1825
	H ₂ O ^c	381	8220	500	0.16	1315
 155	CHCl ₃	377	3100	457	0.12	372
	Dioxano	367	2800	457	0.17	476
	Acetona	370	4900	467	0.04	196
	EtOH	375	3300	475	0.09	297
	F ₃ C-CH ₂ OH	380	2900	495	0.63	1827
	MeOH	376	3700	493	0.23	851
	H ₂ O ^c	381	3200	505	0.26	831
 118	CHCl ₃	360	14540	428	0.57	8288
	Dioxano	359	12080	426	0.60	7248
	Acetona	357	13610	434	0.43	5852
	EtOH	364	12120	439	0,60	7272
	F ₃ C-CH ₂ OH	373	11950	449	0.32	3827
	MeOH	366	12790	442	0.57	7290
	H ₂ O ^c	375	9650	458	0.30	2895
 157	CHCl ₃	366	8100	428	0.20	1620
	Dioxano	358	6700	425	0.22	1474
	Acetona	359	9700	433	0.14	1358
	EtOH	366	7100	434	0,25	1775
	F ₃ C-CH ₂ OH	371	10100	450	0.63	6363
	MeOH	367	8300	444	0.50	4150
	H ₂ O ^c	376	7200	460	0.63	4536

^aMedidos en duplicado a una concentración 12 μ M. ^bRendimientos cuánticos calculados con referencia al sulfato de quinina (en 0.1 M de H₂SO₄). ^cDisolución en H₂O con 10% de MeOH.

Cuando se comparan los datos de $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ y $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ de los compuestos portadores de una cadena de 2-(dimetilamino)etilo **155** y **157** con los análogos portadores de una cadena de 2-(hidroxi)etilo **90** y **118**, no se observan diferencias significativas, con desplazamientos batocrómicos del mismo orden al aumentar la polaridad del disolvente (30-48 nm en $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ al pasar de CHCl_3 a H_2O , Figura 42a). Además, la comparación de los datos de las quinolimidas **90** y **155** con los de las naftalimidias análogas **118** y **157**, respectivamente, muestra desplazamientos batocrómicos similares de 5-12 nm en las $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ y de 30-50 nm en las $\lambda_{\max}^{\text{em}}$. Sin embargo, en los rendimientos cuánticos de fluorescencia y, por lo tanto, en el brillo de la emisión se observan diferencias importantes. Mientras que, tal como se muestra en la Figura 42b, en los compuestos portadores de la cadena 2-(hidroxi)etilo **90** y **118** se observa el comportamiento solvatocrómico usual de disminución de Φ_F y del brillo al aumentar la polaridad del disolvente, en los compuestos portadores de la cadena de 2-(dimetilamino)etilo **155** y **157**, aumentan al aumentar la polaridad del disolvente y, especialmente, al aumentar la acidez del disolvente, como es el caso del trifluoroetanol. En la Figura 43 se muestra el incremento de fluorescencia al pasar de acetonitrilo a H_2O en la 2-(dimetilamino)etil-quinolimida **155** (la intensidad aumenta 14 veces) y la correspondiente -naftalimida **157** (la intensidad aumenta 22 veces).

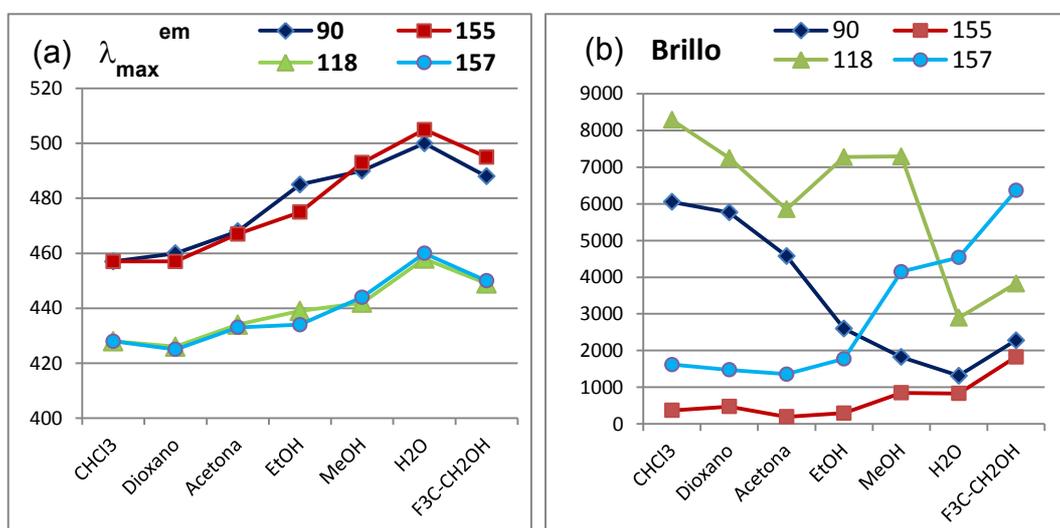


Figura 42. (a) Variación de la $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ con el disolvente. (b) Variación de del brillo de la emisión con el disolvente

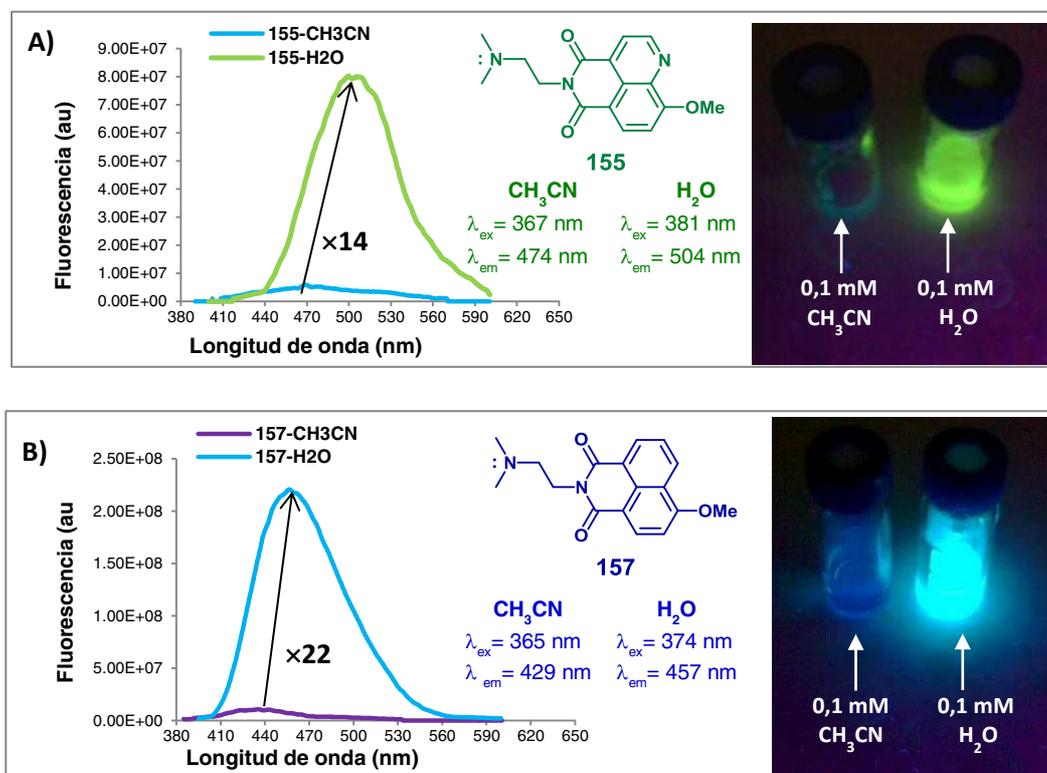


Figura 43. Espectros de emisión e imágenes de **155** y **157** en CH₃CN y H₂O. A) **155**. B) **157**

Teniendo en cuenta la importante influencia de los disolventes en las propiedades fotofísicas de los fluoróforos, se han propuesto diversas fórmulas para analizar la influencia de las diferentes características de los disolventes sobre las propiedades fotofísicas, fundamentalmente, sobre las frecuencias de absorción y emisión ($\tilde{\nu}$, cm⁻¹). Estas fórmulas relacionan estas frecuencias experimentales con las características de polaridad, acidez y basicidad del disolvente, parametrizadas en distintas escalas^{269, 270}. La más reciente y más completa de estas estimaciones lineales es la propuesta por J. Catalán, basada en cuatro escalas empíricas de efectos independientes y complementarios de disolventes: dipolaridad (parametrizada como SdP), polarizabilidad (parametrizada como SP), acidez (dador de enlaces de hidrógeno, parametrizada como SA) y basicidad (aceptor de enlaces de hidrógeno, parametrizada como SB)¹⁷. La

ecuación multilínea que calcula los efectos de un disolvente sobre una determinada propiedad fotofísica medible de un fluoróforo se expresa como: $[y = y_0 + a_{SA}SA + b_{SB}SB + c_{SP}SP + d_{SdP}SdP]$, donde y_0 denota el valor de la propiedad fisicoquímica en fase gaseosa y a_{SA} , b_{SB} , c_{SP} , d_{SdP} son los coeficientes de regresión que reflejan la dependencia de la propiedad y con los respectivos mecanismos de interacción soluto-disolvente y SA, SB, SP, SdP son los valores parametrizados de dichos mecanismos para los distintos disolventes.

A la vista de la significativa variación de las propiedades fotofísicas de **90**, **118**, **155** y **157** con el disolvente, se estudió esta dependencia, aplicando la ecuación multilínea de Catalán. Para ello, se determinaron las frecuencias de absorción y emisión y los rendimientos cuánticos en 10 disolventes de diversa dipolaridad, polarizabilidad, acidez y basicidad (CHCl₃, CH₂Cl₂, 1,4-dioxano, THF, acetona, isopropanol, EtOH, MeOH, H₂O y trifluoroetanol). Los resultados se analizaron mediante la función estimación directa del programa Excell. Como se muestra en la Tabla 11, se obtuvieron buenos coeficientes de correlación lineal ($r > 0.9$) para las frecuencias de absorción y de emisión de los cuatro fluoróforos. El análisis de los coeficientes de regresión obtenidos muestra una contribución grande y de valor negativo de a_{SA} (coeficiente de acidez) con errores standard inferiores al 25% (resultados resaltados en amarillo en la Tabla 11), mientras que los errores para los otros tres coeficientes fueron superiores al 30%. El valor negativo de a_{SA} (disminución en la frecuencia $\tilde{\nu}$) explicaría los desplazamientos batocrómicos observados en la $\tilde{\nu}_{abs}$ y $\tilde{\nu}_{em}$. Por otra parte, el comportamiento de los rendimientos cuánticos Φ_F fue más diverso. En la 5-(2-hidroxietil)-quinolimida **90** y en la 2-[2-(dimetilamino)etil]-naftalimida **157**, el análisis muestra un claro efecto de la acidez del disolvente a_{SA} , aunque de signo contrario. En **90** este coeficiente es de signo negativo, que explicaría la disminución del rendimiento cuántico al aumentar la acidez del disolvente, mientras que en la naftalimida **157** es positivo, de acuerdo con el aumento de Φ_F al aumentar la acidez del disolvente. En la 5-[2-(dimetilamino)etil]-quinolimida **155**, aunque se obtuvo un buen coeficiente de correlación $r = 0.9344$, con contribuciones preferentes de c_{SP} y d_{SdP} , los valores obtenidos no son congruentes, pues da un valor $y_0 \approx 2$ (por definición Φ_F no debería ser mayor de 1).

En cuanto al análisis de la naftalimida **118**, de acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 42b, no se observa buena correlación lineal de Φ_F con los parámetros tabulados para los disolventes. Los resultados resaltados en la Tabla 11 se confirmaron

al realizar las regresiones lineales dejando fuera sucesivamente una de las variables X de de la estimación directa (SA, SB, SP o SdP).

Tabla 11. Coeficientes de regresión de la ecuación de Catalán para la influencia del disolvente sobre propiedades fisicoquímicas de **90**, **118**, **155** y **157**, estimados mediante regresión multilíneal [$y = y_0 + a_{SA}SA + b_{SB}SB + c_{SP}SP + d_{SdP}SdP$].

Compd	y	y_0	a_{SA}	b_{SB}	c_{SP}	d_{SdP}	r
90	$\tilde{\nu}_{abs}$ (cm ⁻¹)	29068±735	-875±192	162±145	-2986±833	-290±206	0.9526
	$\tilde{\nu}_{em}$ (cm ⁻¹)	22415±618	-1473±161	-1169±122	65±702	-587±173	0.9968
	Φ_F	1.009±0.210	-0.479±0.048	-0.275±0.054	-0.225±0.233	-0.165±0.075	0.9920
118	$\tilde{\nu}_{abs}$ (cm ⁻¹)	30136±1532	-1532±400	-100±302	-2937±1738	-259±430	0.9296
	$\tilde{\nu}_{em}$ (cm ⁻¹)	22895±495	-736±129	22±98	1035±562	-568±139	0.9948
	Φ_F	1.038±1.053	-0.099±0.240	-0.082±0.270	-0.513±1.168	-0.245±0.378	0.3905
155	$\tilde{\nu}_{abs}$ (cm ⁻¹)	31877±1147	-1439±299	-96±226	-5848±1302	-1095±322	0.9501
	$\tilde{\nu}_{em}$ (cm ⁻¹)	23376±1892	-1761±493	-853±373	-1191±2147	-845±531	0.9696
	Φ_F	1.986±0.556	0.082±0.114	-0.497±0.129	-1.917±0.556	-0.435±0.180	0.9344
157	$\tilde{\nu}_{abs}$ (cm ⁻¹)	29770±1063	-990±232	13±257	-2462±1225	-549±359	0.9591
	$\tilde{\nu}_{em}$ (cm ⁻¹)	24306±955	-1225±208	12±231	-628±1101	-741±323	0.9847
	Φ_F	0.550±0.487	0.468±0.106	-0.031±0.118	-0.387±0.561	-0.142±0.164	0.9654

La eliminación de la variable de acidez SA es la que más afectó en la bajada de los coeficientes de correlación (r), tanto cuando se realizó la estimación lineal con tres variables, como cuando se realizó solo con dos. Asimismo, cuando se realizó el análisis de regresión lineal simple con una única variable X, la variable de acidez SA fue la que dio un mejor ajuste, con valores de r más próximos a 0.9.

Con el fin de ayudar a elucidar el mecanismo que regula el diferente comportamiento fluorescente de la 5-[2-(dimetilamino)etil]-quinolimida **155** y la 2-[2-(dimetilamino)etil]-naftalimida **157**, en comparación con los 2-hidroxietil- análogos **90** y

118, respectivamente, se han realizado cálculos TD-DFT, estudios de RMN y de difracción de rayos X.

2.1.3.3. Cálculos TD-DFT

Estos cálculos fueron realizados en el Instituto de Química Médica por el Prof. Ibon Alkorta con el paquete de cálculo Gaussian-09¹⁹⁷, a nivel computacional PBE0/6-31+G(d,p)^{271, 272}. En primer lugar, se optimizó la geometría del estado fundamental (S_0) en el vacío y en disolventes de menor a mayor polaridad (ciclohexano, acetona y agua) para todas las estructuras en estudio. En cada caso, con el fin de explorar el perfil conformacional de la cadena de hidroxietilo o dimetilaminoetilo, se tomaron como puntos de partida 9 conformaciones, correspondientes a giros de 120° alrededor de los enlaces C1'-C2' y C2'-O/N. Las rotaciones alrededor del enlace N(imida)-C1' no fueron consideradas, pues solo serían posibles dos conformaciones enantioméricas. Para los cálculos en disolvente se utilizó el modelo de disolvente continuo PCM y los correspondientes parámetros para ciclohexano, acetona y agua²⁷³. En todos los casos se realizaron cálculos de frecuencia para confirmar que las geometrías obtenidas correspondían a mínimos de energía. Tanto para la 5-(2-hidroxietil]-quinolimida **90** como para la 2-(2-hidroxietil]-naftalimida **118** se obtuvieron tres conformaciones de mínima energía, dos con la cadena de hidroxietilo plegada, con un enlace de hidrógeno, hacia el grupo carbonilo en C₆ de la quinolimida o C₃ de naftalimida, con pequeñas diferencias entre ellos en la distancia de este enlace de hidrógeno y en el ángulo de enlace del grupo hidróxilo.

La de mayor longitud de enlace es la conformación de mínima energía en fase gaseosa, mientras que la de enlace de hidrógeno más corto es la de mínima energía en disolución (esta conformación para la quinolimida **90** se muestra en la Figura 44A). En la tercera conformación la cadena de hidroxietilo se pliega con un enlace de hidrógeno hacia el C₄ de la quinolimida o el C₁ de la naftalimida (Figura 44B para **90**).

En el caso de la 5-[2-(dimetilamino)etil]-quinolimida **155** y la 2-[2-(dimetilamino)etil]-naftalimida **157**, se obtuvieron cuatro conformaciones de mínima energía. En ambos

casos, tanto en fase gaseosa como en disolución, las dos conformaciones más estables, con pequeñas diferencias (≤ 0.1 kJ/mol), corresponden, en cada uno de los confórmers, a disposiciones plegadas de la cadena de 2-(dimetilamino)etilo sobre el anillo de imida, encima de cada uno de los respectivos grupos carbonilo, con el par de electrones libre del nitrógeno apuntando hacia dicho grupo carbonilo (en la Figura 44C se muestra el confórmer más estable para **155**, en esta estructura la distancia entre el N del dimetilamino y el C₄ es 3.38 Å).

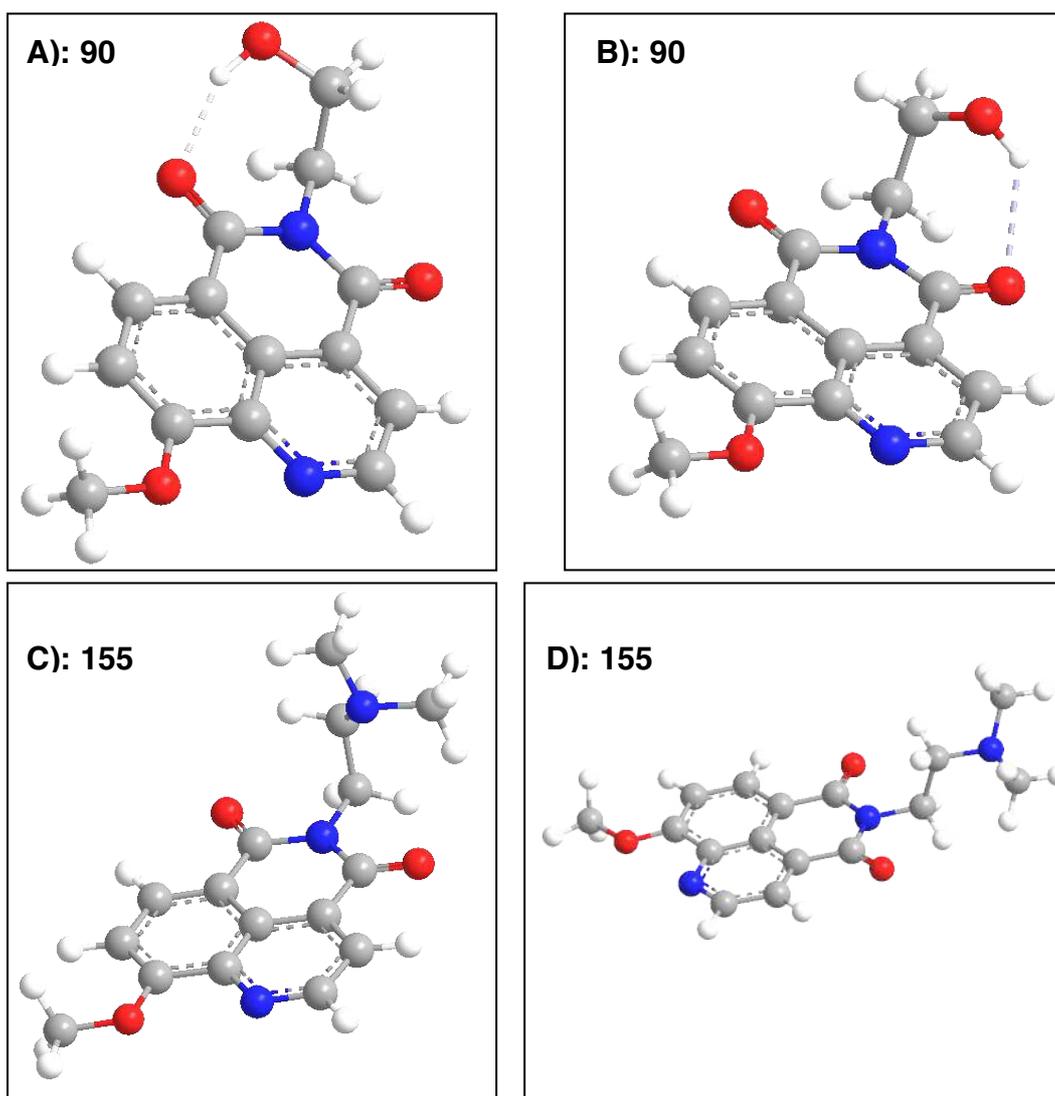


Figura 44. Conformaciones de mínima energía de **90** (A y B) y **155** (C y D).

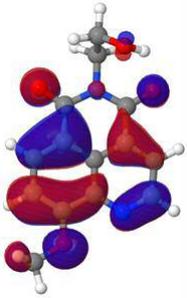
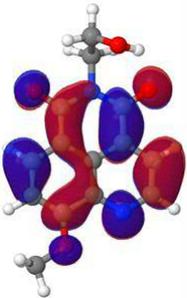
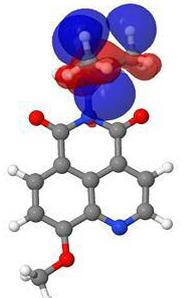
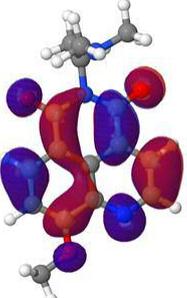
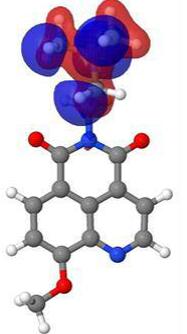
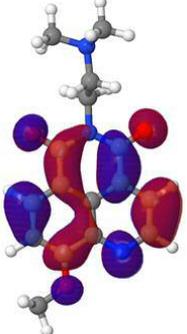
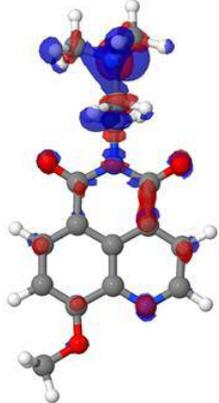
Las otras dos conformaciones de mínima energía corresponden a disposiciones extendidas de la cadena de 2-(dimetilamino)etilo (Figura 44D para **155**), alejando el grupo dimetilamino del anillo de imida. Estas dos conformaciones únicamente se diferencian en la disposición relativa de los dos grupos metilo. La energía de estas conformaciones en fase gaseosa fue 3.14-3.76 kJ/mol mayor que la de las otras dos conformaciones plegadas. Sin embargo, al aumentar la polaridad del disolvente, esta diferencia energética va disminuyendo, de forma que en H₂O es ≤ 0.7 kJ/mol. La mayor estabilidad de las conformaciones plegadas en fase gaseosa y en disolventes apolares, con el par de electrones del N orientado hacia el anillo de imida, explicaría el efecto PET de inhibición de fluorescencia que se observa en estos disolventes, mientras que, al aumentar la constante dieléctrica del disolvente no habría preferencia conformacional y se neutralizaría el PET.

Además, en los confórmeros de mínima energía se calcularon las energías y distribución molecular de los orbitales frontera HOMO/LUMO y las diferencias de densidad de carga entre el estado fundamental (S₀) y el 1^o estado excitado (S₁) producidas mediante excitación vertical, que se muestran en la Tabla 12 para las quinolimidas **90** y **155**. En los fluoróforos portadores de la cadena de hidroxietilo **90** y **118**, tanto el HOMO como el LUMO se localizan mayoritariamente en el grupo metoxilo y en el anillo aromático, las pérdidas de carga por la excitación se localizan en el oxígeno del OMe, N₁ (en el caso de la quinolimida **90**), C_{6a} y C₈ del anillo de quinolimida, y las ganancias en C_{3a}, C₄ y C₇. Sin embargo, en los análogos portadores de la cadena de 2-(dimetilamino)etilo **155** y **157**, el orbital HOMO se localiza mayoritariamente en esta cadena, mientras que, el LUMO se localiza fundamentalmente en el anillo aromático y en el grupo OMe.

Las pérdidas de carga se localizan en toda la cadena 2-(dimetilamino)etilo, centradas en el nitrógeno, y en el N₁ (en la quinolimida **155**). Las ganancias de carga se localizan en los dos oxígenos carbonílicos, el enlace C_{3a}-C₄, y en C₃.

Los cálculos de orbitales HOMO/LUMO apoyan los resultados del análisis conformacional y explicarían el efecto PET en los fluoróforos portadores de la cadena de (dimetilamino)etilo y su diferente comportamiento fluorescente con respecto a los análogos portadores de la cadena de hidroxietilo.

Tabla 12. Representación de orbitales HOMO/LUMO y diferencias de carga producidas por excitación en **90** y **155**

Confórmero	HOMO	LUMO	Variación de carga por excitación ^a
90: B			
155: C			
155: D			

^aPérdida de carga en color azul. Ganancia de carga en color rojo

2.1.3.4. Análisis de difracción de rayos X

Se intentó la cristalización de la 5-[2-(dimetilamino)etil]-quinolimida **155** y la 2-[2-(dimetilamino)etil]-naftalimida **157**, aunque solo se obtuvieron cristales adecuados de esta última, mediante cristalización en ciclohexano. Como se puede observar en la Figura 45, las coordenadas de difracción de rayos X para **157** fueron muy similares a las de la geometría optimizada para el conformero más estable obtenido en los cálculos TD-DFT y similar a la estructura de la quinolimida **155** indicada en la Figura 44C. En la estructura cristalina de **157** la distancia entre el N del dimetilamino y el C₁ es 3.47 Å. Este resultado coincide con los de los cálculos TD-DFT e indica que la estructura cristalina de la naftalimida **157** es similar a su estructura en fase gaseosa y en medios apolares y explicaría la ausencia de fluorescencia por un efecto PET.

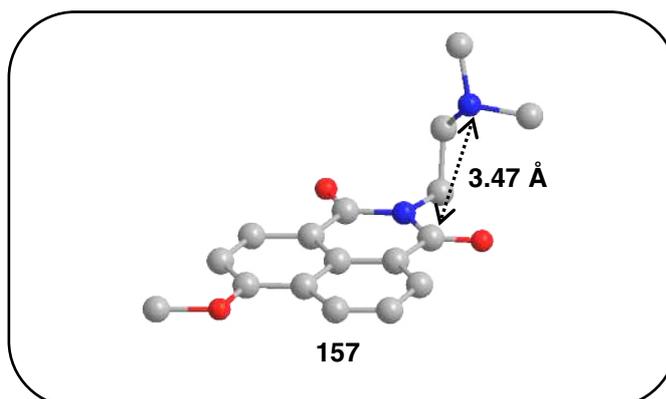


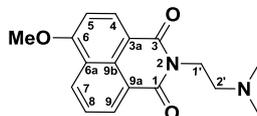
Figura 45. Estructura de rayos X de la naftalimida **157**

2.1.3.5. Estudio de RMN de la naftalimida **157**

Con el fin de estudiar las variaciones estructurales que conlleva el cambio de un disolvente apolar a H₂O en los fluoróforos portadores de la cadena de 2-(dimetilamino)etilo y su influencia en las propiedades fotofísicas, se compararon los espectros ¹H-RMN, ¹³C-RMN y ¹⁵N-RMN de la naftalimida **157** en CDCl₃ y D₂O, respectivamente, cuyos datos se recogen en la Tabla 13.

Resultados y Discusión

Tabla 13. Datos de RMN en $CDCl_3$ y D_2O de la 2-(dimetilamino)etil-naftalimida **157**



	Núcleo	$\delta(CDCl_3, ppm)$	$\delta(D_2O, ppm)$	$\Delta (CDCl_3- D_2O)$
1H-RMN	N-Me	2.36	3.01	-0.65
	2'-H	2.65	3.09	-0.44
	1'-H	4.32	4.01	0.31
	4-H	8.55	7.38	1.17
	5-H	7.04	6.35	0.69
	7-H	8.56	7.48	1.08
	8-H	7.70	6.92	0.78
	9-H	8.60	7.44	1.16
	OMe	4.13	3.74	0.39
^{13}C-RMN	N-Me	46.0	43.1	2.9
	$C_{2'}$	57.2	54.4	2.8
	$C_{1'}$	38.2	34.6	3.6
	C_1	164.8	163.9	0.9
	C_3	164.2	163.1	1.1
	C_{3a}	115.3	110.8	4.5
	C_4	133.7	133.5	0.2
	C_5	105.4	105.4	0
	C_6	161.1	160.6	0.4
	C_{6a}	123.7	121.0	2.7
	C_7	128.9	128.8	0.1
	C_8	126.2	125.3	0.9
	C_9	131.8	130.9	0.9
	C_{9a}	122.6	118.3	4.3
	C_{9b}	129.7	126.6	3.1
OMe	56.4	56.1	0.3	
^{15}N-RMN^a	$N_{3'}$	-356.9	-343.2	-13.7
	N_2	-208.3	-212.7	4.5

^aApantallamiento con respecto a la referencia de nitrometano

En ^1H -RMN todos los protones aromáticos aparecen 0.69-1.17 ppm a campo más bajo en CDCl_3 que en D_2O . Este desapantallamiento podría ser debido a que el par de electrones libres del nitrógeno orientado hacia el anillo en CDCl_3 incrementa la corriente π del anillo, que desapantalla los protones situados en el plano del anillo por efecto de anisotropía magnética. Sin embargo, los protones del grupo dimetilamino y los 2'-H de la cadena de etilo se desapantallan 0.65 y 0.44 ppm, respectivamente, al pasar de CDCl_3 a D_2O . Este desapantallamiento indica que la interacción con D_2O retira carga del par de electrones libres del nitrógeno, mediante enlace de hidrógeno o protonación.

En ^{13}C -RMN todos los carbonos aparecen a campo más alto en D_2O que en CDCl_3 , observándose los mayores apantallamientos (2.7-4.5 ppm) en los carbonos de la cadena de 2-(dimetilamino)etilo y en los carbonos cuaternarios de fusión de los anillos (C_{3a} , C_{6a} , C_{9a} y C_{9b}).

En cuanto a ^{15}N -RMN, la asignación de los dos nitrógenos se realizó en el espectro de correlación $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HMBC, en el que se observó que la señal a campo más alto, asignada al N_3 , correlacionaba con los protones de la cadena y los de los grupos metilos, mientras que, la señal a campo más bajo correlacionaba solo con los protones de la cadena y se asignó al nitrógeno imídico. Al pasar de CDCl_3 a D_2O , esta señal se apantalla 4.5 ppm, mientras que el N_3 se desapantalla 13.7 ppm. Este desapantallamiento es del mismo orden al descrito para la protonación de aminas terciarias alifáticas²⁷⁴ (9-18 ppm). También se ha descrito que los efectos de los enlaces de hidrógeno van en la misma dirección y son del mismo orden que la protonación²⁷⁴.

El conjunto de resultados de RMN indica una fuerte interacción del grupo dimetilamino con D_2O , bien por protonación o mediante enlace de hidrógeno, que afectaría a su conformación, dificultaría el efecto PET y explicaría el incremento de fluorescencia al aumentar la acidez del disolvente.

2.1.3.6. Sensores de H_2O

En vista de los importantes incrementos de fluorescencia observados al aumentar la polaridad y la acidez del disolvente, en la 5-[2-(dimetilamino)etil]-quinolimida **155** y la 2-[2-(dimetilamino)etil]-naftalimida **157** se analizó su potencial como sensores de H_2O . A

este respecto, es importante señalar que el agua es la impureza más común en disolventes orgánicos y su detección es crucial para numerosas reacciones químicas y en aplicaciones industriales, tales como la industria de los carburantes o la industria de materias primas en alimentación²⁷⁵. Se han descrito varios sensores fluorescentes de H₂O derivados de naftalimida, que funcionan por un mecanismo ICT, no por PET, cuya fluorescencia disminuye al aumentar el contenido de H₂O²⁷⁶⁻²⁷⁸.

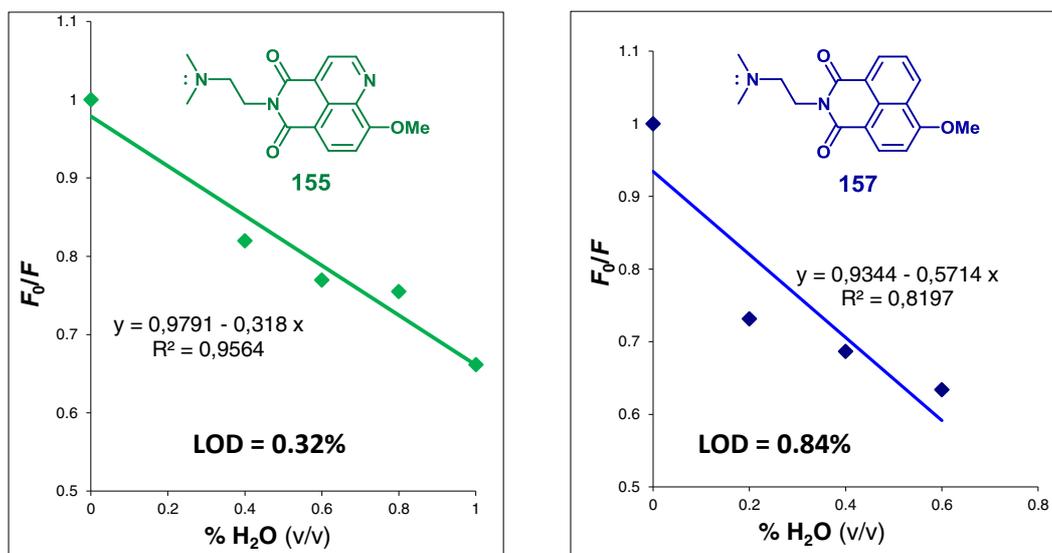


Figura 46. Cálculo de los límites de detección de H₂O con la quinolimida **155** y la naftalimida **157**

Con el fin de analizar el potencial de **155** y **157** como sensores de H₂O, se determinaron sus respectivos límites de detección (LOD)²⁷⁹ en acetonitrilo. Para ello, se determinaron las intensidades máximas de fluorescencia de una disolución 18 μM de cada uno de los fluoróforos, a la que se añadieron porcentajes crecientes de H₂O, en el rango de 0-1%, excitando en los respectivos máximos de absorción. A los resultados obtenidos se les aplicó la correspondiente ecuación de Stern-Volmer ($F_0/F = 1 + K_{SV}[H_2O]$)⁹, donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia de H₂O y K_{SV} es la constante de Stern-Volmer, o pendiente de la correspondiente regresión lineal. Una vez determinada esta pendiente, el LOD se calculó aplicando la fórmula $LOD = (3.3 \times SD)/K_{SV}$, donde SD es la desviación estándar residual de la regresión lineal²⁷⁹. En la Figura 46 se muestran las regresiones lineales obtenidas para

155 y para **157**. El límite de detección con la quinolimida **155** fue 0.32%, mientras que el de la naftalimida **157** fue 0.84%, si bien en este caso hubo más dispersión entre los puntos de medida y la desviación fue mayor.

2.1.3.7. Sensibilidad al pH

Teniendo en cuenta la sensibilidad de la fluorescencia de la 5-(2-(hidroxi)etil)-quinolimida **90** al pH, comentada en el capítulo 2.1., y la sensibilidad de los análogos portadores de la cadena de 2-(dimetilamino)etilo **155** y **157** a la acidez del disolvente, se estudió la sensibilidad de éstos al pH del medio. Para minimizar la interferencia del disolvente en la fluorescencia, este estudio se realizó primero en medio no acuoso, adicionando cantidades crecientes de TFA a una disolución 12 μ M de cada uno de los fluoróforos en CH₃CN. Como se muestra en la Figura 47A, la fluorescencia de la quinolimida **155** aumenta bruscamente a partir de pH 5.5, alcanzando el máximo de fluorescencia con la adición de un equivalente de TFA (pH = 4.9), para volver a caer a mínimos a pH = 1. El aumento de fluorescencia se explicaría por inhibición del PET, mientras que, si se sigue aumentando la acidez, entra en juego la disminución de la fluorescencia por la protonación del N₁ del anillo de quinolimida, ya comentada en el apartado 2.1.1.5. Por lo tanto, en disolvente orgánico **155** se comporta como un sensor de acidez de tipo apagado-encendido-apagado (terminología inglesa: OFF-ON-OFF).

En el mismo estudio, la fluorescencia de la naftalimida **157** (Figura 47B) aumenta de forma similar a partir de pH 5.5, alcanzando el máximo con un equivalente de TFA, manteniéndose constante, sin caída, hasta pH<1. Hay que señalar que el aumento máximo de fluorescencia en ambos fluoróforos con la adición de TFA fue del mismo orden que el aumento observado con la adición de H₂O.

Cuando el estudio de sensibilidad de la fluorescencia al pH se realizó en H₂O, adicionando cantidades crecientes de disolución de HCl, la fluorescencia de la naftalimida **157** no se afectó, mientras que, la de la quinolimida **155**, disminuyó hasta valores mínimos a pH = 1. Estos resultados indicaron que el efecto PET se bloquea por el disolvente y la adición de ácido no modifica este bloqueo, afectando solo a la protonación del N₁ del anillo de quinolimida de **155**.

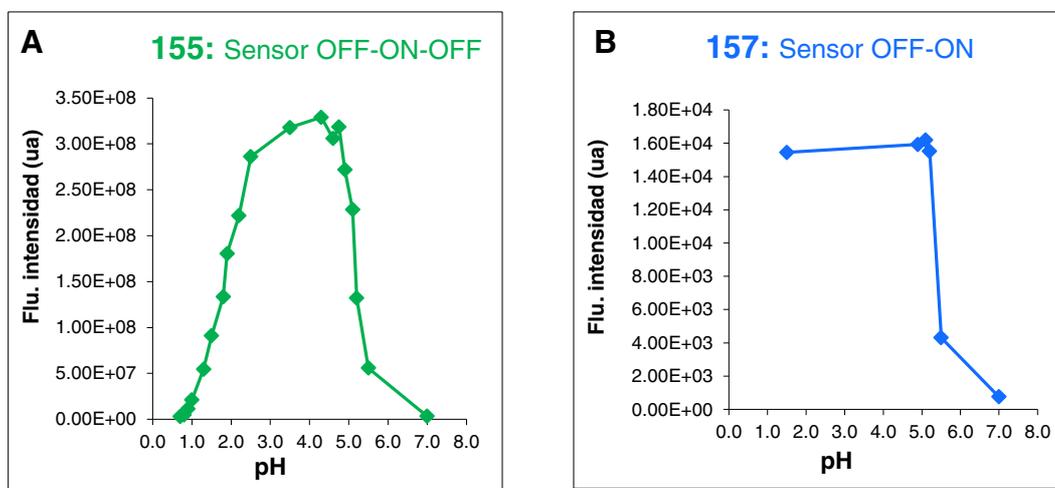


Figura 47. Sensibilidad de la fluorescencia de la quinolimida **155** (A) y la naftalimida **157** (B) al pH

Por lo tanto, ambos fluoróforos no servirían como sensores de pH en medio acuoso. Hay que señalar que se ha descrito un aumento de 14 veces en el rendimiento cuántico de fluorescencia de la naftalimida **157** disuelta en CH_3CN por acidificación con H_2SO_4 0.1 N²⁶⁸. Este aumento muy probablemente fue debido al H_2O de la disolución de este ácido. También se ha descrito la utilización de **157** como sensor de cationes de metales de transición en disolventes orgánicos (CH_3CN y THF) por bloqueo del efecto PET del grupo dimetilamino^{280, 281}.

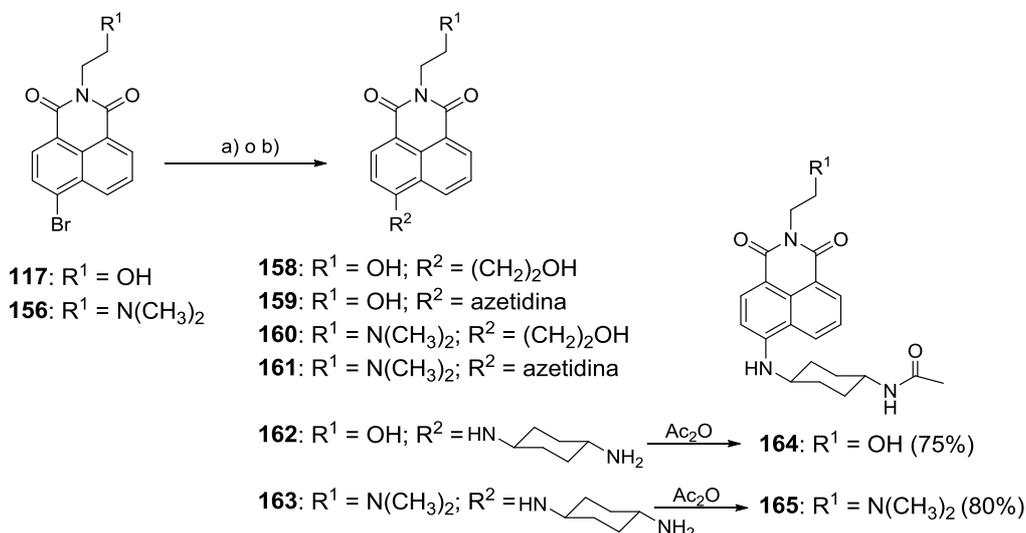
2.1.3.8. Exploración estructural para mejora de los fluoróforos

Coincidiendo con nuestros estudios sobre quinolimidas y naftalimidias PET, se publicó un estudio orientado a aumentar la fluorescencia en agua de fluoróforos de tipo dador-aceptor (ICT) portadores de un grupo dador dialquilamino²⁸². En este estudio se argumentaba que la baja fluorescencia de estos fluoróforos en medio acuoso era debida a que la interacción de la dialquilamina con H_2O , a través de enlaces de hidrógeno, disminuye su carácter electrodonador y facilita la desactivación no radiativa. Con el fin de dificultar la interacción con H_2O , sustituyeron el grupo dimetilamino por dialquilaminas o monoalquilaminas más voluminosas. El aumento del volumen estérico, además de dificultar la interacción con agua, reduce la libertad rotacional, facilitando la transferencia

de carga. Aplicaron el estudio a varios fluoróforos conocidos, tales como las 4-dimetilamino-1,8-naftilamidas. Entre las diversas aminas estudiadas, la *trans*-(4-hidroxi)ciclohexilamina, la *trans*-(4-acetamido)ciclohexilamina y la 2-(hidroxietyl)amina dieron lugar a los mayores aumentos de fluorescencia en H₂O con respecto al correspondiente análogo con dimetilamino. Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos preparar análogos de la quinolimidas **155** y de las naftalimidias **118** y **157** en los que el grupo OMe se sustituye por *trans*-(4-acetamido)ciclohexilamino o 2-(hidroxietyl)amino. Teniendo en cuenta los buenos resultados de la incorporación del anillo de azetidina en quinolimidas, comentados en el capítulo anterior, esta amina también se incorporó en sustitución del grupo OMe en los derivados de naftalimida.

2.1.3.8.1. Síntesis

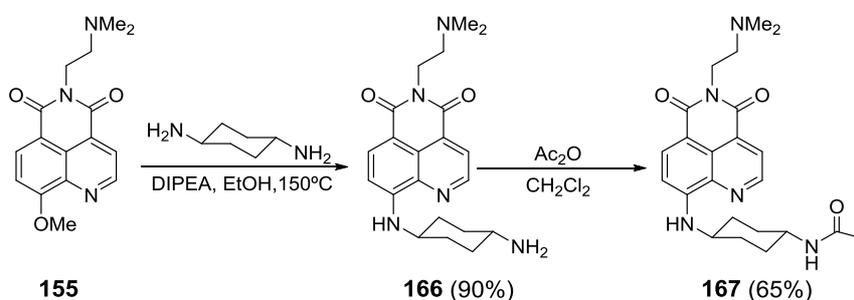
Como se muestra en el esquema 23, las naftalimidias **158-163** se prepararon a partir de las correspondientes 6-bromo-naftalimidias **117** y **156** por sustitución nucleófila aromática, mediante tratamiento con la correspondiente amina.



Esquema 23. Síntesis de las naftalimidias **158-165**. (a) 2-hidroxietylamina o azetidina, EtOH, MW 120°C (20-85%); (b) *trans*-(4-amino)ciclohexilamina, DIPEA, EtOH, 150-180°C (91% y 32%).

La reacción con *trans*-(4-amino)ciclohexilamina se realizó en presencia de DIPEA y fue necesario aumentar la temperatura de 120 a 150-180 °C en tubo cerrado y el tiempo de reacción de 1.5 h a 7 días. La acetilación del grupo amino de las correspondientes naftalimidias **162** y **163**, por tratamiento con anhídrido acético en CH₂Cl₂, dio lugar a las naftalimidias objetivo **164** y **165**.

Una metodología similar fue aplicada para la preparación de los derivados de quinolimidias **166** y **167**, en este caso a partir de la correspondiente 9-metoxi-quinolimidias **155** (Esquema 24).



Esquema 24. Síntesis de las quinolimidias **166** y **167**

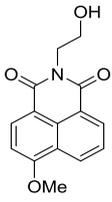
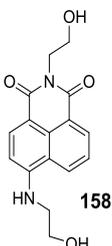
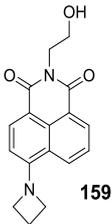
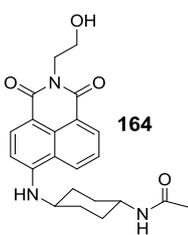
2.1.3.8.2. Propiedades fotofísicas

Las propiedades fotofísicas de los derivados de naftalimidias portadores de la cadena de 2-hidroxietilo en N₂ **158**, **159** y **164** se recogen en la Tabla 14, en comparación con las de la 6-metoxi-naftalimidias **118**. En la Tabla 15 se muestran los datos de las naftalimidias **160**, **161** y **165**, y de la quinolimidias **167**, portadoras de la cadena de 2-(dimetilamino)etilo, en comparación con los respectivos prototipos **157** y **155**, respectivamente.

En las naftalimidias portadoras de la cadena 2-(hidroxietilo) en posición 2, la sustitución del grupo OMe en **118** por aminas en **158**, **159** y **164** dio lugar a un aumento del carácter solvatocrómico típico de los fluoróforos ICT, con desplazamientos batocrómicos de 65-100 nm tanto en las $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ como en las $\lambda_{\max}^{\text{em}}$.

Resultados y Discusión

Tabla 14. Propiedades fotofísicas de las 2-(2-(hidroxi)etil)-naftalimidias **118**, **158**, **159** y **164**

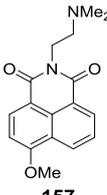
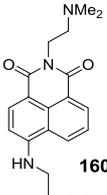
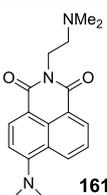
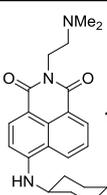
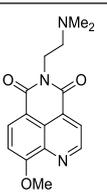
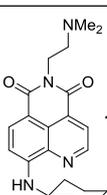
Compd ^a	Disolvente	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_F^b
 <p>118</p>	CHCl ₃	360	14540	428	0.57
	Dioxano	359	12080	426	0.60
	Acetona	357	13610	434	0.43
	F ₃ C-CH ₂ OH	373	11950	449	0.32
	MeOH	366	12790	442	0.57
	H ₂ O	375	9650	458	0.30
 <p>158</p>	CHCl ₃	428	11730	502	0.86
	Dioxano	422	11370	501	0.97
	Acetona	430	11570	516	0.82
	F ₃ C-CH ₂ OH	438	9970	523	0.55
	MeOH	438	12790	525	0.26
	H ₂ O	445	15780	527	0.17
 <p>159</p>	CHCl ₃	443	13620	510	0.98
	Dioxano	428	10820	501	0.68
	Acetona	437	11380	521	0.72
	F ₃ C-CH ₂ OH	449	12720	527	0.44
	MeOH	449	14580	528	0.40
	H ₂ O	460	18660	533	0.16
 <p>164</p>	CHCl ₃	433	10170	497	0.98
	Dioxano	426	13120	491	0.84
	Acetona	435	8400	510	0.77
	F ₃ C-CH ₂ OH	450	9230	524	0.51
	MeOH	447	8860	522	0.56
	H ₂ O	451	10630	527	0.23

^aMedidos en duplicado a una concentración 12 μ M. ^bRendimientos cuánticos calculados utilizando como referencia la cumarina 153 (en EtOH), excepto **118**, que se utilizó como referencia sulfato de quinina (en 0.1 M de H₂SO₄).

De forma similar a como se ha comentado en el capítulo anterior, el aumento de la polaridad del disolvente produjo desplazamientos batocrómicos (10-40 nm) en ambos máximos de longitud de onda, disminución en los rendimientos cuánticos de fluorescencia y aumento en los coeficientes de extinción molar.

Resultados y Discusión

Tabla 15. Propiedades fotofísicas de las 2-(2-(dimetilamino)etil)-naftalimidias **157**, **160**, **161** y **165** y las 5-(2-(dimetilamino)etil)-quinolimidias **155** y **167**

Compd ^a	Disolvente	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_F^b
 157	CHCl ₃	366	8100	428	0.20
	Dioxano	358	6700	425	0.22
	Acetona	359	9700	433	0.14
	F ₃ C-CH ₂ OH	371	10100	450	0.63
	MeOH	367	8300	444	0.50
	H ₂ O	376	7200	460	0.63
 160	CHCl ₃	426	6570	501	0.61
	Dioxano	422	5810	499	0.69
	Acetona	433	6190	511	0.99
	F ₃ C-CH ₂ OH	437	7530	530	0.56
	MeOH	438	4360	527	0.94
	H ₂ O	445	5220	531	0.57
 161	CHCl ₃	441	9800	506	0.81
	Dioxano	430	10380	502	0.78
	Acetona	437	8510	518	0.87
	F ₃ C-CH ₂ OH	453	11830	534	0.20
	MeOH	449	7320	527	0.32
	H ₂ O	460	6540	533	0.18
 165	CHCl ₃	430	6900	499	0.51
	Dioxano	422	3600	489	0.35
	Acetona	436	6700	511	0.77
	F ₃ C-CH ₂ OH	452	8300	529	0.40
	MeOH	441	7320	525	0.66
	H ₂ O	446	8170	534	0.71
 155	CHCl ₃	377	3100	457	0.12
	Dioxano	367	2800	457	0.12
	Acetona	370	4900	467	0.04
	F ₃ C-CH ₂ OH	380	2900	495	0.63
	MeOH	376	3700	493	0.23
	H ₂ O	381	3200	505	0.26
 167	CHCl ₃	470	3900	554	0.16
	Dioxano	466	3470	562	0.12
	Acetona	462	4020	572	0.025
	F ₃ C-CH ₂ OH	483	4225	539	0.016
	MeOH	471	3040	526	0.050
	H ₂ O	471	3800	533	0.022

^aMedidos en duplicado a una concentración 12 μ M. ^bRendimientos cuánticos calculados utilizando como referencia la cumarina 153 (en EtOH), excepto **157**, que se utilizó sulfato de quinina (en 0.1 M de H₂SO₄).

Estos efectos fueron muy similares independientemente de la amina introducida. El análisis del efecto del disolvente con la ecuación de Catalán, utilizando los 10 disolventes de diversa dipolaridad, polarizabilidad, acidez y basicidad mencionados en el apartado 2.2.2, dio buenos coeficientes de correlación lineal ($r > 0.9$) para las frecuencias de absorción y de emisión y para los rendimientos cuánticos. En todos los casos se observó una mayor contribución, de signo negativo, del coeficiente de acidez (a_{SA}) y cierta participación, particularmente en el derivado de azetidina **159**, del coeficiente de dipolaridad (d_{SDP}), también de signo negativo, en las longitudes onda. En cuanto a las naftalimidias portadoras de la cadena de 2-(2-(dimetilamino)etilo) **160**, **161** y **165** y la quinolimida **167**, el efecto de la amina introducida en sustitución del grupo OMe sobre λ_{max}^{abs} y λ_{max}^{em} fue muy similar al comentado para los análogos derivados de 2-(hidroxi)etilo, desplazamientos batocrómicos de 65-100 nm. Igualmente, estas longitudes de onda aumentaron al aumentar la polaridad y acidez del disolvente, excepto en la quinolimida **167**, en la que λ_{max}^{em} aumentó al aumentar la polaridad de $CHCl_3$ a acetona y disminuyó al aumentar la acidez hasta H_2O . Esta quinolimida presentó emisión dual desde los estados excitados LE e ICT. En $CHCl_3$, dioxano, THF y acetona la emisión desde el ICT, de mayor λ_{max}^{em} , es preferente, mientras que, en disolventes con mayor acidez, como los alcoholes y el agua es preferente la emisión desde el estado LE, de mayor energía (menor λ_{max}^{em}).

El efecto de la sustitución del grupo OMe sobre los coeficientes de extinción y los rendimientos cuánticos fue muy diverso, en las naftalimidias **160** y **165**, en general, ϵ disminuyó y Φ_F aumentó en todos los disolventes, eliminando el efecto de la polaridad observado en el prototipo **157**. En el derivado de azetidina **161**, se ha eliminado el carácter PET y aumentado el carácter solvatocrómico, aumentando mucho el rendimiento cuántico en los disolventes más apolares, que disminuye al aumentar la acidez. En la quinolimida **167** la introducción de la *trans*-4-(acetamido)ciclohexilamina también dio lugar a un aumento del carácter solvatocrómico ICT, con respecto a **155**, aunque, a diferencia de la naftalimida **161**, no va acompañado de aumentos significativos de Φ_F en los disolventes menos polares. En el análisis con la ecuación de Catalán, solo se encontró buen coeficiente de correlación lineal para las longitudes de onda y el rendimiento cuántico en la naftalimida portadora del anillo de azetidina **161**. Nuevamente, el coeficiente de acidez (a_{SA}) y el de dipolaridad (d_{SDP}), ambos con signo negativo, fueron los que más contribuyeron a su carácter solvatocrómico.

2.1.3.9. Citotoxicidad en líneas celulares de cánceres humanos

En el cribado de citotoxicidad en líneas celulares de cánceres humanos realizado en PharmaMar, S. A., utilizando doxorrubicina como referencia, las naftalimidias portadoras de la cadena de 2-(2-(dimetilamino)etilo) **157**, **160** y **165**, y la quinolimida **167** mostraron citotoxicidades moderadas, de orden micromolar, cuyos datos de GI50, TGI y LC50 se recogen en la Tabla 16. El resto de los compuestos descritos en este capítulo no mostró citotoxicidad a la máxima concentración ensayada de 1 µg/ml (≈20-40 µM).

Las GI50 mostradas por **157**, **160**, **165** y **167** son del mismo orden que las descritas para mitonafide (**26a**) y amonafide (**26b**), comentados en la Introducción (1.1.6). Los valores de GI50 descritos para estos antitumorales se encuentran en el rango 0.47-10 µM, dependiendo de la línea celular de ensayo y del artículo en el que se describen^{94, 167}. Estos antitumorales son intercalantes del ADN e inhiben la topoisomerasa II^{89, 94, 283}, formando y estabilizando el complejo ternario ADN-intercalante-topoisomerasa II²⁸⁴.

Tabla 16. Citotoxicidad de 2-(2-(dimetilamino)etil-naftalimidias y 5-(2-(dimetilamino)etil-quinolimidias^a

Compd		Pulmón A549	Colón HT29	Mama MDA-MD-231	Páncreas PSN1
157	GI50	11.40	9.39	16.10	16.10
	TGI	> 33.5	> 33.5	> 33.5	27.50
	LC50	> 33.5	> 33.5	> 33.5	> 33.5
160	GI50	11.90	9.77	10.1	13.7
	TGI	> 30.5	> 30.5	30.5	> 30.5
	LC50	> 30.5	> 30.5	> 30.5	> 30.5
165	GI50	7.57	3.79	5.44	8.05
	TGI	14.9	> 23.7	10.7	10.9
	LC50	23.4	> 23.7	17.3	15.4
167	GI50	7.79	5.67	8.26	9.44
	TGI	14.9	23.4	16.3	13.1
	LC50	> 23.6	> 23.6	> 23.6	> 23.6

^aDatos expresados en concentraciones µM

Por otra parte, las quinolimidas antitumorales descritas por Braña y *col.*, comentadas en la Introducción (1.3), no se unen al ADN¹⁶⁷. Teniendo en cuenta estos precedentes, como se comenta en el apartado 2.2.11, se estudió la unión de la naftalimida **160** y la quinolimida **167** a ADN.

2.1.3.10. Sondas para visualización celular

A diferencia de los fluoróforos solvatocrómicos que funcionan por un mecanismo ICT, el número de fluoróforos sensores de polaridad de tipo OFF-ON al aumentar la polaridad del medio es muy limitado, entre los que se encuentran la acridina²⁸⁵, el pireno-3-carboxaldehído²⁸⁶ y la 7-metoxi-4-metilcumarina²⁸⁷, que emiten fluorescencia en medios polares, aunque tienen limitada aplicabilidad debido al quenching de su fluorescencia por protonación y a las bajas longitudes de onda de excitación y emisión²⁸⁸. La escasez de este tipo de fluoróforos, que emiten en medios polares, ha limitado la monitorización de procesos biológicos que implican un aumento en la hidrofilia local. Entre los limitados ejemplos de este tipo de sensores, recientemente, se han descrito los derivados de 2-(*trans*-(4-hidroxi)ciclohexilamino)-naftalimida²⁸², comentados en el apartado 2.2.8, como sensores de tioles, la 2-(2-aminoetil)-naftalimida como sensor *in cellulo* de metales²⁶⁷ y derivados de BODIPY como sensores de hidrofilia local en lisosomas disfuncionales²⁸⁹. A la vista de estos precedentes y teniendo en cuenta el buen comportamiento fotofísico en disolventes polares de las naftalimidias y quinolimidas descritas en este capítulo, se exploró su aplicación como sensores de visualización celular en macrófagos.

Este estudio se realizó en colaboración con la Dra. M^a Mar Fernández Gutiérrez del grupo de Biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polimeros del CSIC (ICTP). Se estudiaron las 2-(2-(dimetilamino)etil)-naftalimidias **157**, **160**, **161** y **165** y las 5-(2-(dimetilamino)etil)-quinolimidas **155** y **167**, en paralelo con las 2-(2-(hidroxi)etil)-naftalimidias **118**, **158**, **159** y **164**. Para ello, macrófagos de ratón fueron tratados con una concentración 5 μM de cada uno de los fluoróforos y, tras una hora de incubación a 37 °C, las células se visualizaron mediante microscopía confocal. En primer lugar, se estudiaron las naftalimidias y quinolimidas con grupo MeO **118**, **157**, **90** y **155**, excitando con láser a 364 nm y observando la emisión con el filtro de UV (350-439 nm). Como se

observa en la Figura 48, en las células tratadas con los fluoróforos portadores de la cadena de 2-(hidroxi)etilo en la imida **118** y **90** (48, 1b y 2b) se observó muy poca fluorescencia, prácticamente como en las células control. Sin embargo, las células tratadas con los fluoróforos análogos portadores de la cadena de 2-(dimetilamino)-etilo **157** y **155** mostraron un gran incremento en la fluorescencia localizada en el citoplasma (Figura 48, 1c-d, y 2c-d). Estos resultados se correlacionan bien con las diferencias observadas en la emisión de los fluoróforos en H₂O. A continuación, en las mismas condiciones se estudiaron los análogos en los que el grupo OMe se ha sustituido por una amina, excitando con láser a 488 nm y observando la emisión con el filtro GFP (525-615 nm). Los resultados se muestran en la Figura 49.

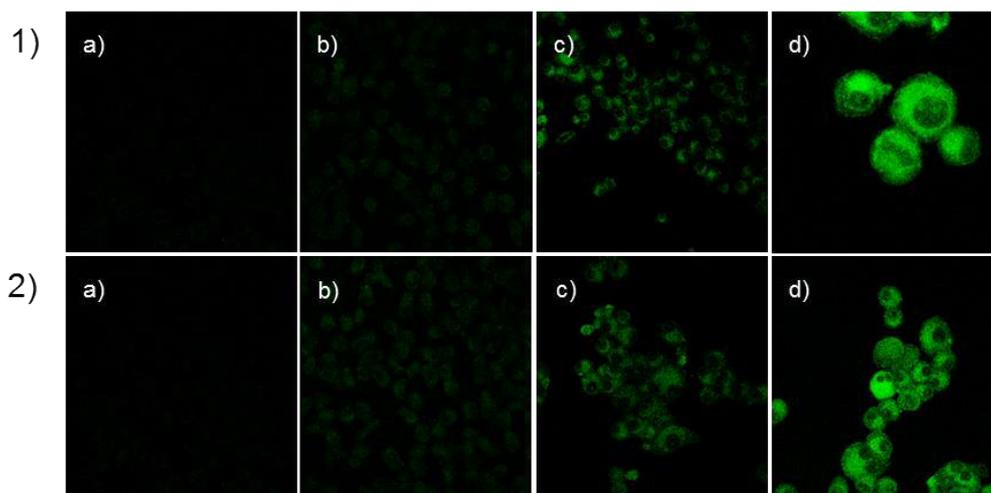


Figura 48. Visualización mediante microscopía confocal de macrófagos de ratón tratados con una concentración 5 μ M de los derivados de naftalimida **118** y **157** y de quinolimida **90** y **155**. (1) a) Células control; b) visualización del derivado **118** a 40x; c) visualización del derivado **157** a 40x; d) visualización del derivado **157** a 63x. (2) a) Células control; b) visualización del derivado **90** a 40x; c) visualización del derivado **155** a 40x; d) visualización del derivado **155** a 63x.

Al igual que los prototipos con el grupo OMe en el anillo aromático, las células tratadas con los fluoróforos portadores de la cadena de 2-(hidroxi)etilo en el anillo de imida **158**, **159** y **164** mostraron fluorescencia muy baja (Figura 49, 1-3b), mientras que las células tratadas con los portadores de 2-(dimetilamino)etilo **160**, **161**, **165** y **167** mostraron alta fluorescencia (Figura 49, 1-3d y 4b-d), localizada en los núcleos de las

células. De acuerdo con sus respectivos rendimientos cuánticos de fluorescencia en H₂O, la naftalimida portadora de (*trans*-4-hidroxi)ciclohexilamina **165** mostró una fluorescencia significativamente mayor que el análogo portador de (2-hidroxi)etilo **160**.

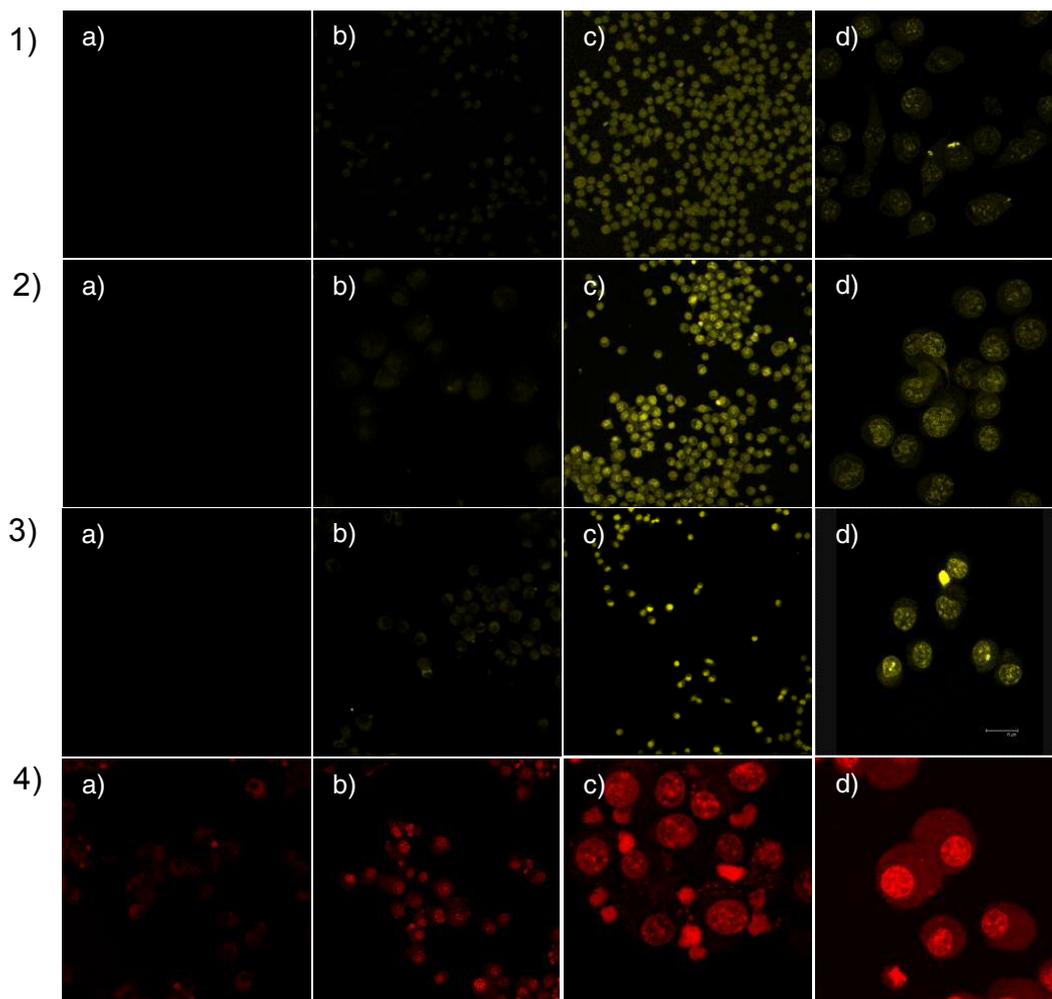


Figura 49. Visualización mediante microscopía confocal de macrófagos de ratón tratados con una concentración 5 μ M de los derivados de naftalimida **158**, **159**, **160**, **161**, **164** y **165** y de la quinolimidate **167**. (1) a) Células control; b) visualización del derivado **158** a 40x; c) visualización del derivado **160** a 40x; d) visualización del derivado **160** a 63x; (2) a) Células control; b) visualización del derivado **159** a 40x; c) visualización del derivado **161** a 40x; d) visualización del derivado **161** a 63x; (3) a) Células control; b) visualización del derivado **164** a 40x; c) visualización del derivado **165** a 40x; d) visualización del derivado **164** a 63x; (4) a) Células control; b) visualización del derivado **170** a 40x; c) y d) visualización del derivado **167** a 63x.

Sorprende la alta fluorescencia en las células tratadas con la naftalimida **161** y con la quinolimida **167**, a pesar de sus bajos rendimientos cuánticos en H₂O, 78-86% menores que en CHCl₃ o dioxano, lo que indicaría su localización en un entorno hidrófobo en el núcleo

El núcleo es el orgánulo más prominente de las células, donde se regula la síntesis de los ribosomas y la expresión de los genes²⁹⁰, por lo que su visualización es importante para ayudar a responder cuestiones sobre la regulación y expresión génica, la génesis de tumores o la acción de algunos fármacos. Entre el limitado número de fluoróforos nucleares conocidos, el 4',6-diamidino-2-phenilindole (**DAPI**, Figura 50) y el Hoeschst, que se unen al surco menor del ADN, y el yoduro de propidio (**PI**), intercalante del ADN, han sido los sensores más utilizados para teñir los núcleos celulares, por su buena permeabilidad celular y su especificidad por ADN²⁹¹. Sin embargo, estos fluoróforos generalmente son mutagénicos, poseen baja solubilidad en agua y poca fotoestabilidad, lo que limita su aplicación en estudios que requieran largos tiempos de observación.

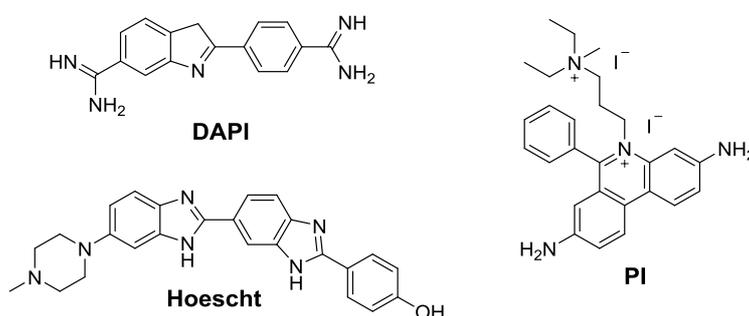


Figura 50. Estructura de los sensores nucleares más usuales

Otros pequeños fluoróforos, utilizados para la visualización del núcleo, como por ejemplo, diversos derivados de estirilo^{292, 293}, la fluoresceína²⁹⁴, el rutenio (II)²⁹⁵ y la hemicianina²⁹⁶, se utilizan a concentraciones muy bajas, debido a problemas de quenching de su fluorescencia por agregación. Además, estos colorantes suelen sufrir pérdida de fluorescencia tras fotoexcitación²⁹⁷. Por ello, la obtención de nuevas sondas nucleares, solubles en agua, fotoestables y con baja citotoxicidad es un objetivo de gran interés para la visualización del núcleo celular en estudios de larga duración²⁹⁸.

Teniendo en cuenta la clara localización nuclear de las naftalimidias portadoras de la cadena de 2-(dimetilamino)etilo **160**, **161**, **165** y de la quinolimida **167**, con el fin de ayudar a dilucidar su sitio de unión, se exploró si estos fluoróforos co-localizaban con **DAPI**. Las imágenes obtenidas con nuestros fluoróforos solaparon completamente con las obtenidas con **DAPI**, indicando coincidencia en la unión a ADN. En la Figura 51 se muestran los resultados obtenidos para la naftalimida **165**. Además, se realizaron dos experimentos de competición entre los dos fluoróforos. En el primero se añadió una concentración 1 μM de **DAPI** a los macrófagos y, tras 1 hora de incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$ y después de comprobar que el **DAPI** se encontraba en el núcleo, se añadió la naftalimida **165** en concentraciones crecientes desde 1 μM hasta 10 μM .

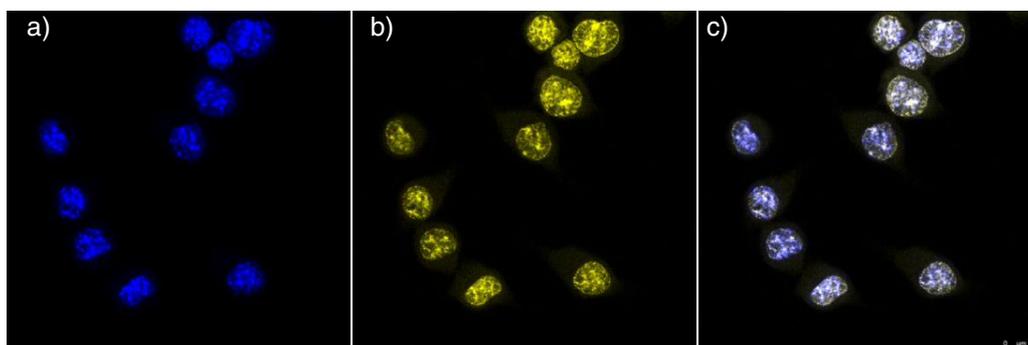


Figura 51. Co-localización celular del colorante nuclear **DAPI** y el derivado de naftalimida **165** en macrófagos de ratón a una concentración 5 μM . a) Núcleos de células macrocíticas teñidos con **DAPI**. b) Núcleos de células macrocíticas teñidos con el derivado **165**. c) co-localización nuclear de **DAPI** y el compuesto **165**.

En el segundo experimento se cambió el orden de adición de los fluoróforos, añadiendo el compuesto **165** a una concentración 1 μM y concentraciones crecientes de **DAPI** desde 1 μM hasta 10 μM . En todos los casos, ambos fluoróforos co-localizaban en el núcleo sin observar desplazamiento entre ellos. Estos resultados indicaron que, aunque ambos fluoróforos se unen al ADN, deben hacerlo de distinta forma.

Teniendo en cuenta la moderada citotoxicidad mostrada por **157**, **160**, **165** y **167** en células tumorales, se determinó también la citotoxicidad en macrófagos de ratón RAW 264.7 (ECACC, Sigma P11), mediante un ensayo Alamar blue²⁹⁹. Después de 24 h de

incubación a 37 °C, se añadieron concentraciones crecientes hasta 100 µM de los fluoróforos estudiados. Como se muestra en la Tabla 17, todos los compuestos mostraron baja citotoxicidad, con GI50 superiores a 10 µM, excepto la quinolimida **167**, con una GI50 de 5.8 µM.

Tabla 17. Citotoxicidad en macrófagos de ratón

Compuesto	GI50 (µM)
158	36.3
159	19.6
160	38.1
161	20.8
164	21.2
165	33.3
167	5.8

2.1.3.11. Interacción con ADN

Teniendo en cuenta los precedentes bibliográficos de derivados de naftalimidias y quinolimidas antitumorales ya comentados y la localización nuclear de nuestros fluoróforos portadores de la cadena 2-(dimetilamino)-etilo, se estudió la interacción de la naftalimida **165** y la quinolimida **167** con ADN de esperma de salmón (**FS-ADN**) y con la doble hebra del oligonucleótido **R-13** (5'-GCGTACGCCAGCG-3')³⁰⁰, en colaboración con Diego García Puente bajo la dirección de la Dr. Cristina Vicent del Instituto de Química Orgánica General (CSIC). Para ello, se registraron los espectros de dicroísmo circular, espectrometría UV y excitación de fluorescencia de la valoración de concentraciones constantes de los fluoróforos (**165**: 16 µM, **167**: 20 µM) con concentraciones crecientes de ADN (8.1 µM hasta 2.0 mM pares de bases) o de **R-13** (0.165 µM hasta 4.4 mM)³⁰¹.

2.1.3.11.1. Interacción de la naftalimida **165** con ADN

En la longitud de onda del máximo de absorción de **165** (≈ 450 nm), en el espectro de dicroísmo circular, tanto de **FS-ADN** como de **R-13** (Figura 52), se observó una banda negativa muy débil. Si la unión de **165** con ADN fuese en el surco menor o mayor, se debería haber observado un cambio importante en dicha banda, mientras que, si la unión es por intercalación, la banda sería muy débil e incluso podría no observarse, como ocurre en este estudio.

Además, la intensidad de DC aumenta ligeramente al aumentar la concentración de **165**.

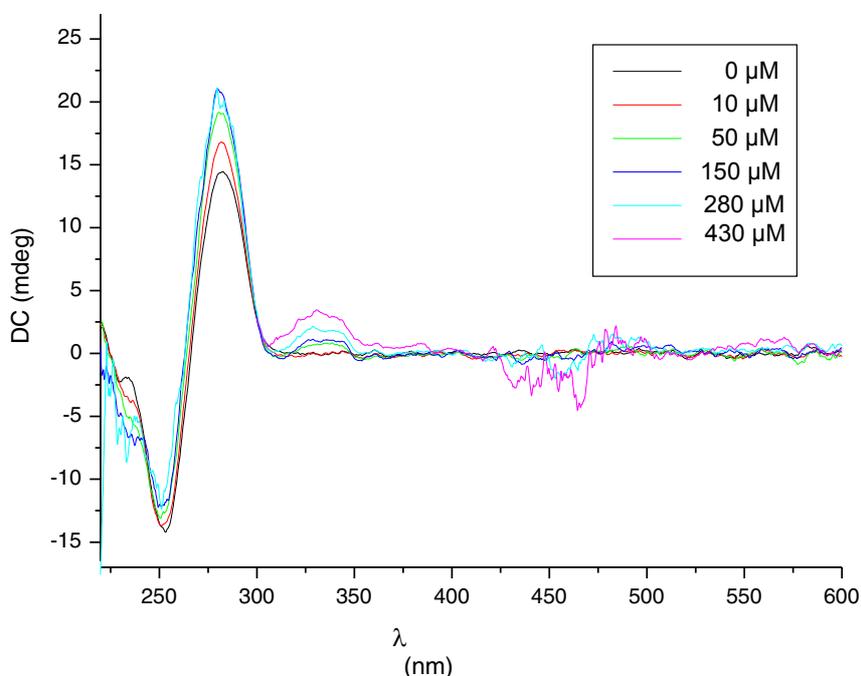


Figura 52. Espectro de DC de **R-13** con concentraciones crecientes de **165**

Estos resultados son indicativos de una unión intercalante del compuesto **165** al ADN³⁰³. Sin embargo, tanto en UV como en el espectro de excitación de fluorescencia, se observaron cambios significativos. La intensidad de absorción UV disminuyó al aumentar la concentración de ADN, mientras que, la intensidad de la fluorescencia

aumentó, ambos resultados fueron también indicativos de intercalación entre los pares de bases del ADN³⁰⁴.

Estos resultados explicarían porqué, aunque **165** co-localiza con **DAPI** no se observa competición entre ambos fluoróforos, ya que, como se ha comentado, **DAPI** se une a la hebra menor y no es intercalante.

Al representar las intensidades de absorción UV frente a la concentración de ADN se obtuvo la isoterma de unión (Figura 53) y se calculó la constante de afinidad, observándose buena correlación entre los resultados de **Fs-DNA** y de **R-13**, con una $K_d \approx 13 \mu\text{M}$, independientemente del tipo de ADN utilizado. La isoterma indicó la unión de 1 molécula del fluoróforo **165** por cada 2 pares de bases.

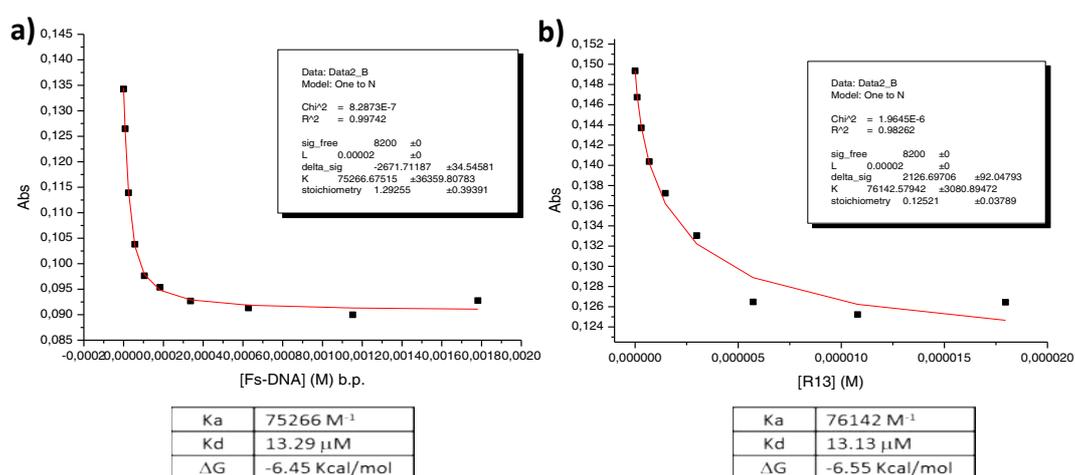


Figura 53. Isotermas de la unión de **165** a **FS-ADN** (a) y a **R-13** (b)

2.1.3.11.2. Interacción de la quinolimida **167** con ADN

El comportamiento de la quinolimida **167** en las valoraciones de dicroísmo circular con **Fs-ADN** y con el oligonucleótido **R-13** fue similar al comentado para la naftalimida **165**. Posiblemente debido a los bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia, no fue posible detectar la excitación de fluorescencia de **167**.

A partir de los espectros de UV de las valoraciones con ADN, se pudo representar la isoterma de unión y calcular la constante de afinidad, observándose una buena correlación en la unión de **167** con **FS-DNA** y con el oligonucleótido **R-13**, con valores de K_d de 24.5 μM y 21.15 μM , respectivamente (Figura 54). Se determinó una estequiometría de 8 pares de bases por cada molécula de **167**. Estos resultados indican un modo de unión similar para **165** y **167**, aunque no idéntico, ambos son intercalantes, pero la estequiometría es diferente y la unión de la naftalimida fue aproximadamente un 85% más fuerte que la de la quinolimida **167**.

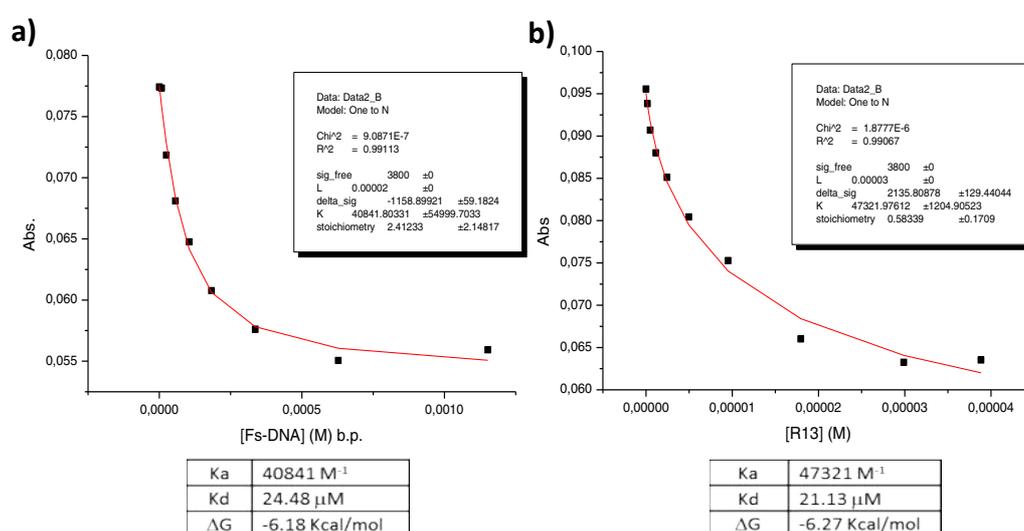


Figura 54. Isotermas de la unión de **167** a **FS-DNA**(a) y **R-13** (b)

El conjunto de resultados de los estudios *in cellulo* y de interacción con ADN, indica que las naftalimidias y quinolimidias portadoras de la cadena 2-(dimetilamino)-etilo en el anillo de imida presentan una buena penetración celular y se localizan en el núcleo, posiblemente debido a que las aminas terciarias se protonan a pH fisiológico⁸⁹, facilitando su entrada como sales de amonio y la interacción electrostática con ADN²⁹⁸. Al igual que las naftalimidias antitumorales amonafide, mitonafide^{89, 94, 283} y compuestos análogos³⁰⁵, las naftalimidias descritas en este capítulo se unen al ADN como intercalantes y presentan moderada citotoxicidad en células tumorales.

2.1.3.12. Conclusiones

Los estudios descritos en este capítulo muestran que pequeñas modificaciones estructurales en fluoróforos derivados de naftalimidias y quinolimidias, como la sustitución de un grupo hidroxilo por un grupo dimetilamino, puede cambiar el carácter del fluoróforo de solvatocrómico por mecanismo de transferencia intramolecular de carga (ICT) a solvatocrómico inverso, con mayor emisión en entornos polares que apolares, por un mecanismo PET de transferencia de carga a través del espacio. Tanto los estudios de cálculos TD-DFT, como de RMN y difracción de rayos X, apoyan el bloqueo de la fluorescencia por un mecanismo PET en disolventes polares y sobre todo en disolventes próticos de carácter ácido. Este carácter ácido es el que más contribuye al comportamiento de la emisión de estos fluoróforos en función del disolvente. Los fluoróforos PET pueden ser usados como sensores de agua y como sensores de acidez tipo OFF-ON en disolventes orgánicos.

Como ya se ha visto en el capítulo anterior, la sustitución del grupo OMe de la posición 6 de las naftalimidias o de la posición 9 de las quinolimidias en los fluoróforos portadores de la cadena 2-(hidroxi)etilo en el anillo de imida por aminas, que son mejores grupos electrodonadores conduce a incrementos de fluorescencia, manteniendo y aumentando el carácter solvatocrómico ICT. Sin embargo, en los fluoróforos portadores de la cadena 2-(dimetilamino)etilo, en los que OMe se sustituye por 2-(hidroxi)etilo, *trans*-4-(acetamido)-ciclohexilamino o azetidina, coexisten los grupos responsables del PET y del ICT, con direcciones opuestas. Por lo que, dependiendo de la amina incorporada al anillo aromático, los fluoróforos tienen cierto carácter PET o exclusivamente ICT, aunque, en general, la modificación conduce a incrementos de fluorescencia en todos los disolventes estudiados.

Los fluoróforos portadores de la cadena 2-(dimetilamino)etilo han resultado buenas sondas de visualización del núcleo celular en macrófagos, se unen al ADN como intercalantes y muestran citotoxicidad moderada en líneas celulares de cánceres humanos.

2.2. ANTENAS DE LANTÁNIDOS

En este capítulo se describe la caracterización fotofísica y aplicación como antenas de lantánidos de las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas de fórmula general **C**, mencionadas en la Introducción (1.3), cuya síntesis como intermedios para la preparación de quinolimidaz se ha descrito en el apartado 2.1.1.1. También se describe el diseño y la síntesis de derivados de carbostirilo, de fórmula general **D**, y su estudio también como antenas de lantánidos.

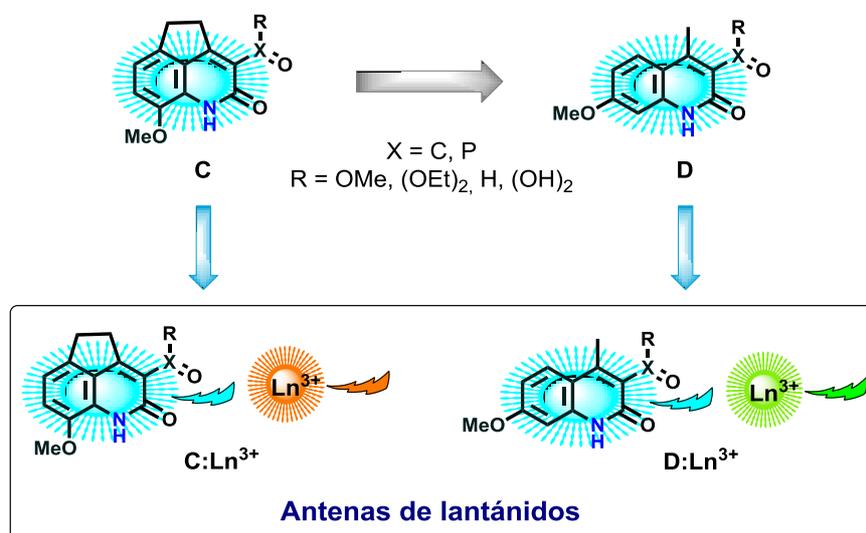


Figura 55. Estructuras generales de las antenas de lantánidos descritas en este capítulo

2.2.1. Propiedades fotofísicas de (8-metoxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolin-3-il)-fosfonatos y -carboxilatos

Como se ha indicado en la Introducción (1.3), las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas tienen carácter β -dicarbonílico, por lo que podrían ser quelantes de cationes y, más concretamente, de cationes lantánidos y actuar como antenas, sensibilizando su emisión de fluorescencia o fosforescencia. Teniendo en cuenta el alto interés actual de estas antenas, se determinaron las propiedades fotofísicas de las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas **C** en ausencia y presencia de diversos cationes metálicos. En primer lugar, se realizó una evaluación cualitativa de la emisión de fluorescencia de los derivados de ciclopenta[de]quinolina **67-71** y **73**, mostrados en la Figura 56, cuya síntesis se ha descrito en el apartado 2.1.1.1 de esta memoria. Esta evaluación indicó que los fosfonatos **67**, **70** y **71** y el carboxilato **73** emitían en la zona del azul y que la emisión se incrementaba al aumentar la polaridad del disolvente, como se muestra en la Figura 57 para el fosfonato **67**. A continuación, se determinaron las propiedades fotofísicas de este fosfonato y del carboxilato **73**, productos mayoritarios de la síntesis, en tolueno, dioxano, acetonitrilo, MeOH y H₂O, que se recogen en la Tabla 18.

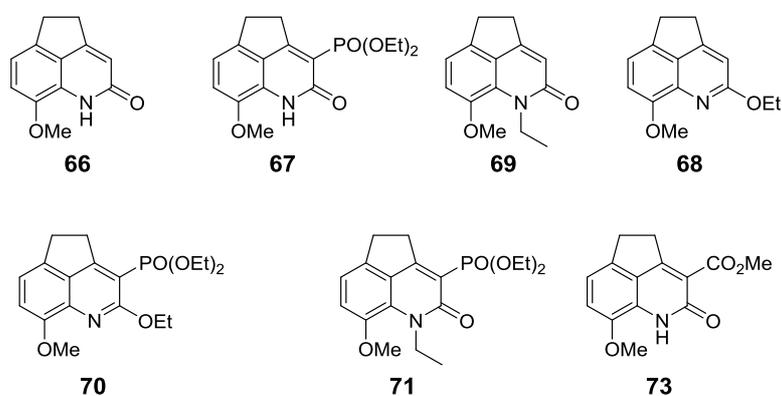


Figura 56. Derivados de ciclopenta[de]quinolina incluidos en la evaluación de fluorescencia

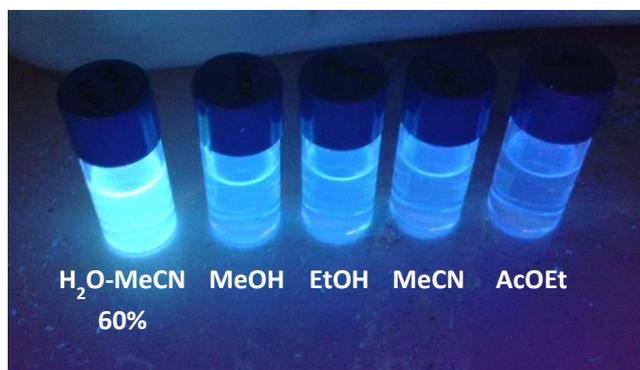
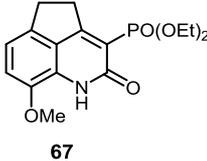
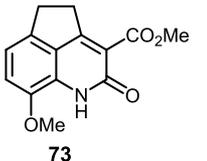


Figura 57. Fluorescencia del fosfonato **67** en distintos disolventes

Tabla 18. Propiedades fotofísicas del fosfonato **67** y del carboxilato **73**

Compuesto ^a	Disolvente	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^b	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm) ^c	Φ_F ^d	Brillo
 67	Tolueno	313, 354	3541	421	0.0708	251
	Dioxano	312, 356	3544	421	0.0441	156
	CH ₃ CN	312, 355	2896	435	0.0976	283
	MeOH	313, 365	3992	440	0.1379	550
	H ₂ O	313, 354	4168	460	0.4028	1679
 73	Tolueno	308, 361	3727	435	0.0587	219
	Dioxano	308, 359	3723	437	0.0432	161
	CH ₃ CN	310, 357	2989	458	0.1111	332
	MeOH	310, 356	4849	464	0.0945	458
	H ₂ O	312, 357	4564	485	0.3436	1568

^aMedidos en duplicado a una concentración 12 μ M. ^bEn la menor $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$. ^cExcitación a 320 nm. ^dRendimientos cuánticos calculados con referencia al sulfato de quinina (en 0.1 M de H₂SO₄).

El fosfonato **67** y el carboxilato **73** mostraron propiedades fotofísicas similares. Ambos presentan dos máximos de absorción a 308-313 y a 355-361 nm, que varían poco con la polaridad del disolvente, y bajos coeficientes de extinción molar, en particular el pico próximo a 355 nm, ancho y muy poco intenso. Al excitar a 320 nm, ambos emiten

fluorescencia con desplazamientos batocrómicos en el máximo de emisión (≈ 40 nm al pasar de tolueno a H_2O) e incremento en los rendimientos cuánticos de fluorescencia al aumentar la polaridad del disolvente. Se exploró también la influencia del medio ácido en las propiedades fotofísicas de **67** y **73**, registrando sus espectros de emisión en acetonitrilo con un 5% de TFA (≈ 0.7 M). En ambos casos, la $\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ sufre desplazamiento batocrómico (≈ 40 nm) con la adición de TFA, pero el comportamiento de la intensidad de fluorescencia fue diferente en los dos fluoróforos. La intensidad de fluorescencia del fosfonato **67** aumentó 3,6 veces, mientras que la del carboxilato **73** disminuyó 2 veces.

El zinc es el segundo metal de transición más abundante en el cuerpo humano después del hierro y es necesario para la actividad de más de 200 proteínas, entre las que se incluyen los llamados dedos de zinc, diversas enzimas catalíticas y la mayoría de las RNA polimerasas³⁰⁶⁻³⁰⁹. Cambios en la concentración de Zn^{2+} pueden dar lugar a disfunciones de estas proteínas, que afectan al crecimiento, al sistema inmune, el sistema nervioso central y el sistema reproductivo^{310, 311}. Aunque la concentración total de Zn^{2+} en células eucarióticas es de rango micromolar (100-300 μM), la concentración del catión libre es mucho menor, de orden picomolar (60-450 pM)³⁰⁶. Los mayores niveles se encuentran en el cerebro, donde actúa como neurotransmisor/neuromodulador^{312, 313}. En cuanto al Mg^{2+} , es un catión necesario para numerosos procesos celulares, tales como proliferación, muerte celular y regulación enzimática. Se une al pirofosfato de la molécula de ATP, siendo el complejo MgATP la especie activa en las quinasas, en la producción de energía, en el transporte activo y en la contracción muscular³¹⁴. Además, el Mg^{2+} es cofactor en la síntesis de ADN, ayudando a modular la transducción de la señal^{315, 316}. Por lo tanto, cambios en la concentración del Mg^{2+} total o libre pueden tener consecuencia en el metabolismo y función celular. El Mg^{2+} participa en la excitabilidad cardíaca, de forma que bajos niveles aumentan las arritmias³¹⁷ y el infarto cardiovascular³¹⁸ y están implicados en la hipertensión arterial³¹⁹.

Teniendo en cuenta la importancia biológica de los cationes Zn^{2+} y Mg^{2+} , se exploró la capacidad del fosfonato **67** para quelar estos cationes. Para ello, se añadieron concentraciones crecientes, en el rango mM, de $ZnCl_2$ o $MgCl_2$ en H_2O a una disolución 12 μM de **67** en acetonitrilo y se registraron los correspondientes espectros de emisión. En ambos casos, tal como se muestra en la Figura 58, la adición de los cationes produjo un incremento de 10 veces en la intensidad del máximo de emisión y desplazamientos batocrómicos de estos máximos de 20-30 nm. La fluorescencia se saturó para una

concentración 5 mM de ZnCl_2 y 3mM de MgCl_2 . La intensidad de los máximos de emisión de los posibles quelatos fue del mismo orden que la de una disolución de la misma concentración de sulfato de quinina, la referencia más utilizada para el estudio de fluoróforos que absorben y emiten en la misma zona del espectro visible. Con el fin de valorar el potencial de **67** como sensor de Zn^{2+} y Mg^{2+} en sistemas biológicos, es decir en medios acuosos, sus espectros de emisión también se registraron en disolución tampón 150 mM de NaCl y 50 mM de Hepes a pH 7.4, adicionando concentraciones crecientes (0-242 mM) de ZnCl_2 y MgCl_2 . En ningún caso se observó incremento de la fluorescencia, indicando que los correspondientes quelatos no son estables en medio acuoso.

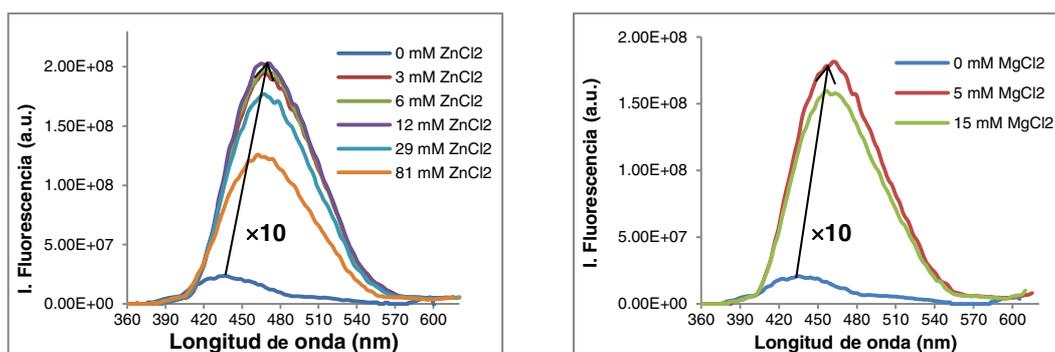


Figura 58. Espectros de emisión del fosfonato **67**, en presencia de distintas concentraciones de ZnCl_2 y MgCl_2 , excitando a 313 nm.

Como se ha comentado en la Introducción, los cationes trivalentes lantánidos presentan gran semejanza, en términos de radio iónico y oxofilia, con los cationes divalentes Mg^{2+} y Ca^{2+} ^{139, 320}. Por ello, teniendo en cuenta el mencionado potencial de las antenas de lantánidos en el desarrollo de biosensores^{147, 321-325} y el incremento de fluorescencia del fosfonato **67** producido por la coordinación de Mg^{2+} , se exploró la posible coordinación de lantánidos por los fosfonatos **67** y **70** y el carboxilato **73** y su influencia en la emisión de fluorescencia, en comparación con el análogo **63**. Entre los lantánidos se seleccionaron Tb(III), Eu(III), Dy(III) y Sm(III), que emiten en el visible, facilitando por tanto la lectura del ensayo. Inicialmente se llevó a cabo una evaluación

cualitativa en la que a una disolución 0.1 mM de las posibles antenas en THF se les añadió una cantidad equimolecular de lantánido (0.1 mM de TbCl₃, EuCl₃, DyCl₃ o SmCl₃ en THF) y, tras irradiación con luz UV (365 nm), las mezclas resultantes se analizaron “a simple vista” mediante detección de la luminiscencia típica de cada metal (Tb = verde, Dy = amarillo, Eu = rojo, Sm = rojo/marrón). Con Tb(III), Dy(III) o Sm(III) no se observó ninguna transferencia de energía. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 59, la adición de EuCl₃ dio lugar a luminiscencia roja intensa, característica de este lantánido, en las muestras de los fosfonatos **67** y **70** y algo más débil en la del carboxilato **73**. Esta luminiscencia no se observó en la dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona **63**, no portadora de grupo fosfonato o carboxilato, que facilitan la coordinación de Eu(III). Estos resultados suponen el descubrimiento de una nueva familia de antenas de Eu(III) capaces de coordinarse en disolventes orgánicos, lo que resulta de gran relevancia, si se tiene en cuenta el limitado número de compuestos con estas características descrito hasta el momento en la bibliografía. Los requisitos moleculares que gobiernan la coordinación de estos derivados a Eu(III) parecen ser la presencia de un grupo fosfonato o carboxilato en posición 3, un grupo CO o OEt en posición 2, y un nitrógeno no sustituido en la posición 1, similares a los que gobiernan la coordinación de Zn²⁺ y Mg²⁺.

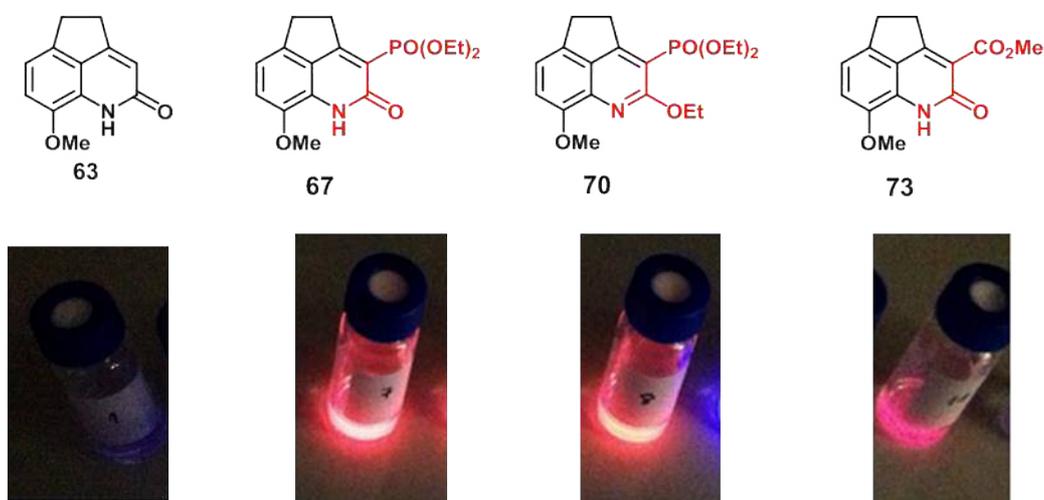


Figura 59. Luminiscencia producida por la adición de EuCl₃.

La configuración electrónica del catión Eu^{3+} se suele abreviar como $[\text{Xe}]4f^6$. Los 6 electrones 4f se localizan en 7 orbitales f y están protegidos del entorno por los orbitales $5s^2$ y $5p^6$, lo que dificulta su participación en enlaces covalentes. Como se ha comentado en la Introducción, las transiciones electrónicas entre los orbitales 4f son prohibidas, por lo que su excitación directa por absorción de fotones es difícil y es responsable de los bajos coeficientes de extinción molar ($\epsilon < 5 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Esta dificultad se puede evitar mediante la utilización de un cromóforo orgánico con alto coeficiente de absorción que le transfiere energía. En la Figura 60 se muestra el espectro de excitación y de emisión de un complejo de Eu^{3+} a temperatura ambiente³²⁶, en el que se ha marcado la transferencia de energía a la que corresponde cada una de las bandas.

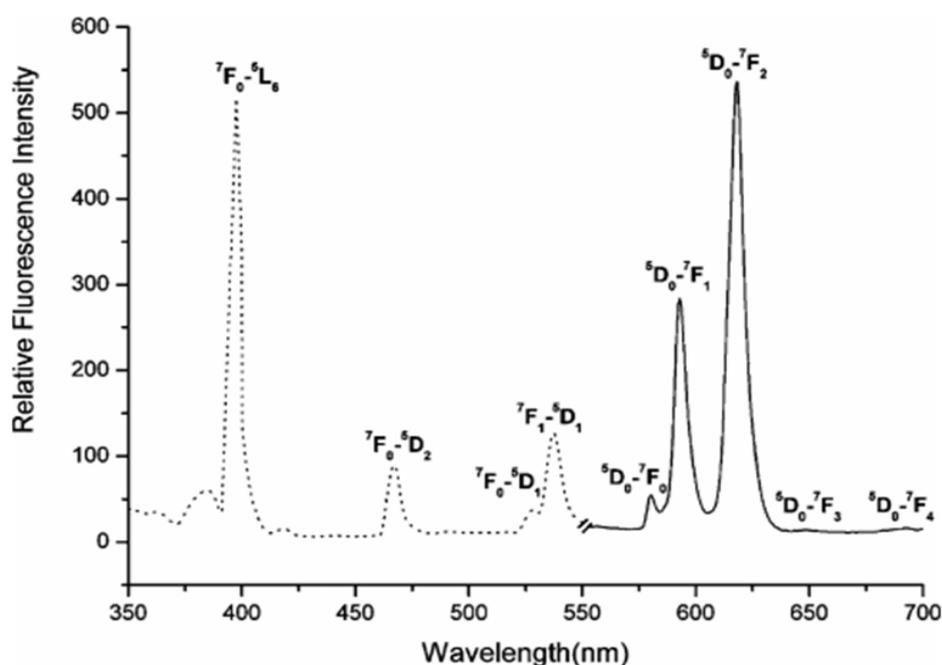


Figura 60. Espectro de excitación (línea de puntos) y emisión (línea continua) de un complejo de Eu^{3+} ($\lambda_{\text{ex}}=397 \text{ nm}$)³²⁶.

En el espectro de emisión la banda ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$ (570-585 nm) es muy débil, su intensidad depende de la simetría del complejo e incluso puede no aparecer, y no se desdobra ya que los niveles ${}^5\text{D}_0$ y ${}^7\text{F}_0$ no son degenerados³²⁷. La transición ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$ (585-600 nm) es una transición de dipolo magnético independiente del entorno del catión Eu^{3+} , por lo que la integral de la intensidad de esta banda es constante y se suele utilizar

para calibrar la intensidad de los espectros de emisión de este catión. Por efecto del campo eléctrico que generan los ligandos esta banda se puede desdoblar hasta en tres bandas³²⁷. La transición $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (610-630 nm) es una transición de tipo dipolo eléctrico y es muy sensible al entorno, de hecho se la denomina transición hipersensible. Esta transición se puede desdoblar hasta en 5 bandas y suele ser la más intensa junto con la $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$. Las transiciones $^5D_0 \rightarrow ^7F_3$ (640-660 nm), $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ (680-710 nm), $^5D_0 \rightarrow ^7F_5$ (740-770 nm) y $^5D_0 \rightarrow ^7F_6$ (810-840 nm) son también de tipo dipolo eléctrico y suelen ser muy débiles y en algunos casos no aparecen.

Los resultados iniciales de sensibilización de la luminiscencia de Eu^{3+} con el fosfonato **67** y el carboxilato **73** se confirmaron espectroscópicamente, registrando sus espectros de emisión en CH_3CN (54 μM), tras la adición de 1 y 2 equivalentes de EuCl_3 , TbCl_3 , DyCl_3 y SmCl_3 disueltos también en CH_3CN (54 μM), excitando a 320 nm. Como se observa en la Figura 61, la adición de EuCl_3 fue la única que produjo la aparición de las bandas características de emisión del lantánido, fundamentalmente de la $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ a 612 nm, y la correspondiente disminución en la banda de emisión de la dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona a 459 nm, confirmando la selectividad de la transferencia de energía a europio.

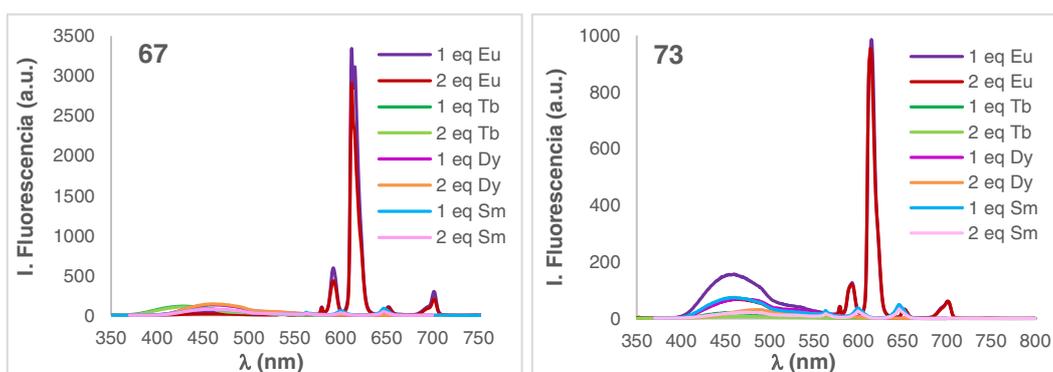


Figura 61. Espectros de emisión de **67** y **73** tras la adición de EuCl_3 , TbCl_3 , DyCl_3 y SmCl_3 .

Una vez comprobada la selectividad en la sensibilización de la luminiscencia del europio, se estudió la estequiometría de la unión, mediante la valoración de las antenas **67** y **73** en CH_3CN (54 μM) con concentraciones crecientes de EuCl_3 en CH_3CN (54 μM) hasta saturación de la emisión, en ambos casos con una estequiometría 1:1 (Figura 62). A

medida que aumentó la concentración de Eu^{3+} , disminuyó la fluorescencia de la antena por quencheamiento del lantánido y aumentó la emisión de este catión, fundamentalmente la correspondiente a la banda ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$, entre 606 y 630 nm. Un análisis más detallado del desdoblamiento de esta banda indicó que, en el caso del fosfonato **67**, inicialmente, se formaba un complejo 2:1, en el que la banda a 615 es más intensa, con un hombro a 612, y que, al aumentar la concentración de EuCl_3 , aumentaba preferentemente esta última, manteniéndose fija la relación de intensidades I_{612}/I_{615} a partir de una relación de equivalentes 1:1 (Figura 63).

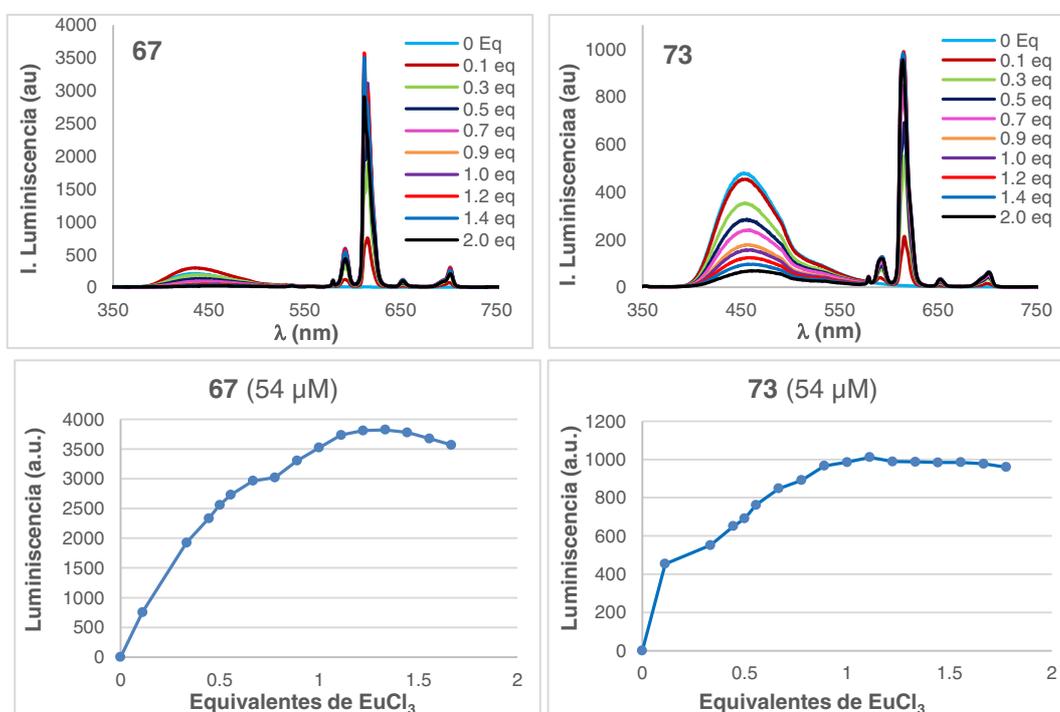


Figura 62. Espectros de emisión de **67** y **73** tras la adición de cantidades crecientes de EuCl_3

En el caso del carboxilato **73**, al aumentar la proporción de EuCl_3 , aumentaba significativamente la fluorescencia de la suma de las dos bandas y la relación I_{612}/I_{615} aumentaba progresivamente hasta una relación de equivalentes 1:1, pero siendo siempre mayor I_{612} que I_{615} y sin observarse punto de inflexión próximo a la relación de

equivalentes antena:Eu³⁺ de 2:1, como si se observó en **67**. Estas variaciones en la relación de intensidades y en la forma de las bandas reflejan cambios en la esfera de coordinación del europio³²⁸.

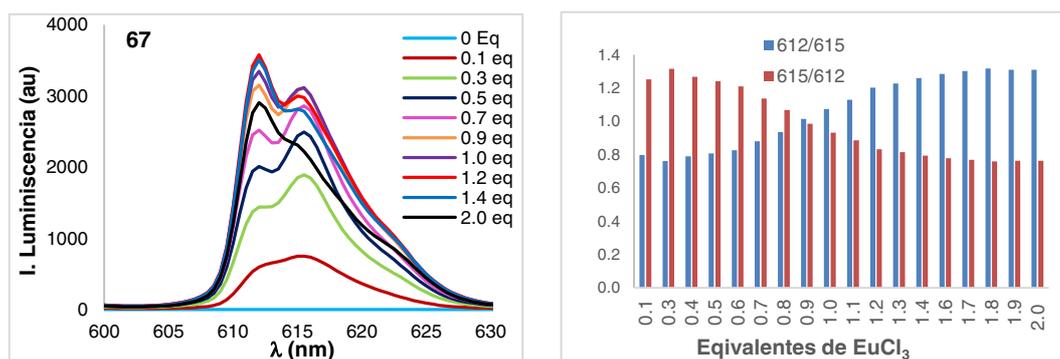


Figura 63. Ampliación de los espectros de emisión de **67** tras la adición de cantidades crecientes de EuCl₃ y representación de las relaciones de intensidad I₆₁₂/I₆₁₅ e I₆₁₅/I₆₁₂

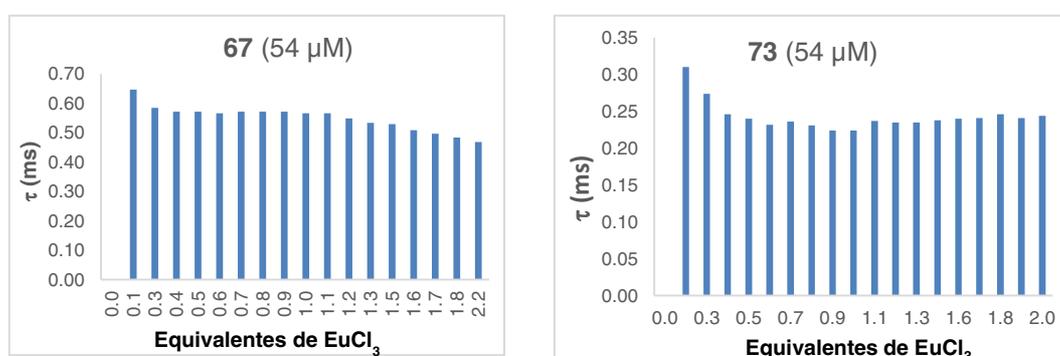


Figura 64. Variación de los tiempos de vida de emisión de Eu³⁺ al aumentar las proporciones EuCl₃: **67** y EuCl₃: **73**

En cuanto a los tiempos de vida de emisión de Eu³⁺, en el caso del fosfonato **67**, τ baja ligeramente de 0.65 a 0.57 ms a partir de 0.3 equivalentes de EuCl₃ y se mantiene constante hasta alcanzar una proporción 1:1, para volver a bajar progresivamente al

aumentar la proporción de EuCl_3 hasta un valor de 0.47 ms (Figura 64). En el caso del carboxilato **73**, τ baja de 0.31 a 0.25 ms para 0.4 equivalentes de EuCl_3 y luego se mantiene próximo a este valor al seguir aumentando la proporción del catión. Los tiempos de vida disminuyen al aumentar la proporción de EuCl_3 , al estar el catión menos protegido por la coordinación de la antena y más expuesto al disolvente.

Con el fin de obtener información adicional sobre la estequiometría de la coordinación de Eu^{3+} por **67** y **73**, se intentó la cristalización de los respectivos complejos, mediante evaporación lenta de ambas antenas co-disueltas con EuCl_3 en distintos disolventes, pero no se consiguieron buenos cristales, por lo que se decidió probar cambiando la sal de europio a $\text{Eu}(\text{OTf})_3$. De esta forma, se obtuvieron buenos cristales para difracción de rayos X de los complejos de ambas antenas, mediante disolución en CDCl_3 de 1 equivalente de antena y 5 equivalentes de $\text{Eu}(\text{OTf})_3$. Las estructuras de rayos X muestran en ambos casos una estequiometría antena/ Eu^{3+} 2:1, de acuerdo con la primera estequiometría determinada para el fosfonato **67** en las valoraciones de luminiscencia. En el complejo formado por esta antena el Eu^{3+} presenta un número de coordinación de 8, en el que participan dos moléculas de **67**, que unen al catión a través de su grupo ceto y del oxígeno del fosfonato, y cuatro moléculas de H_2O . Las dos moléculas de **67** se sitúan en disposición relativa ortogonal, ambas en la misma cara de un plano y en la opuesta se sitúan las 4 moléculas de H_2O (Figura 65).

En el complejo formado por el carboxilato **73**, el Eu^{3+} presenta un número de coordinación de 9, en el que también participan dos moléculas de la antena, que unen al catión a través de su grupo ceto y del carbonilo del carboxilato, cuatro moléculas de H_2O y una molécula de triflato. En este complejo, las dos moléculas de **73** se sitúan prácticamente perpendiculares con orientaciones opuestas enfrentadas situando dos moléculas de H_2O por arriba y por debajo del plano en el que se sitúan las antenas (Figura 65). En las respectivas celdillas unidad se localizan 3 o 2 moléculas del contranión OTf^- que forman enlaces iónicos a larga distancia con el centro metálico sin participar en su coordinación. Estos resultados indican la mayor estabilidad de los complejos 2:1 en estado sólido cristalino.

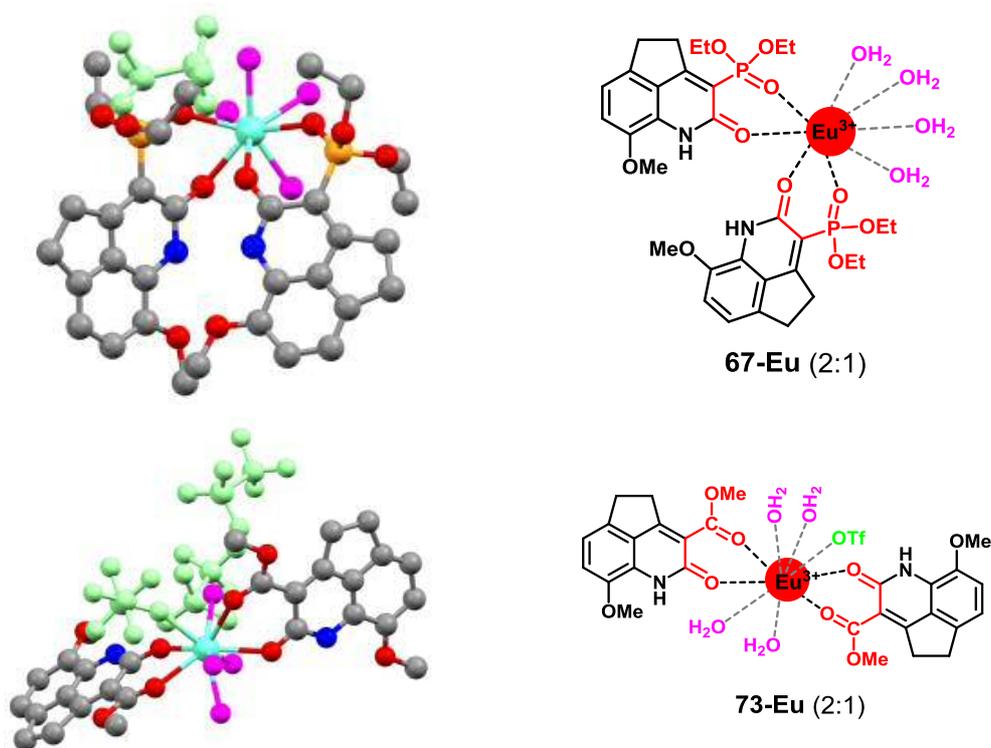


Figura 65. Estructuras de rayos X de los complejos $(67)_2\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OTf})_3$ y $(73)_2\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OTf})_3$

2.2.2. Diseño y síntesis de derivados de carbostirilo

Con el fin de simplificar la estructura de las dihidrociclopenta[*de*]quinolin-2-onas **67** y **73** e intentar mejorar sus coeficientes de extinción molar se planteó preparar análogos derivados de carbostirilo de fórmula general **D** (Figura 66). Como se ha comentado en la Introducción (1.1.8), la estructura de carbostirilo se encuentra entre las que transmiten energía más eficazmente a Eu^{3+} y Tb^{3+} . Sin embargo, no se han descrito derivados en los que, además de actuar como antenas, participen en la coordinación del catión. Suelen ir unidos a ciclenos o estructuras abiertas complejantes, que son las que coordinan al catión¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Diversos estudios previos con antenas de lantánidos derivadas de carbostirilo indican que la naturaleza de los sustituyentes sobre el anillo de quinolin-2-ona y su posición relativa influyen notablemente sobre sus propiedades fotofísicas y sobre la selectividad en la sensibilización de lantánidos^{158, 329}. En la Figura 66 se muestra

la influencia sobre los coeficientes de extinción molar (ϵ) de la posición de un grupo electrodonador MeO sobre dicho anillo. Cuando el MeO se sitúa en la posición 8 (**E**), equivalente a la posición 8 de las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas **67** y **73**, ϵ es el más bajo, con un valor de $3.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mientras que, el compuesto con el MeO en posición 7 (**G**) muestra el mayor valor de ϵ ($12.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

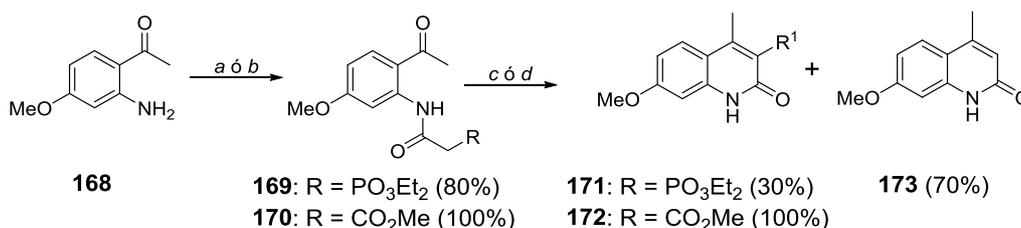
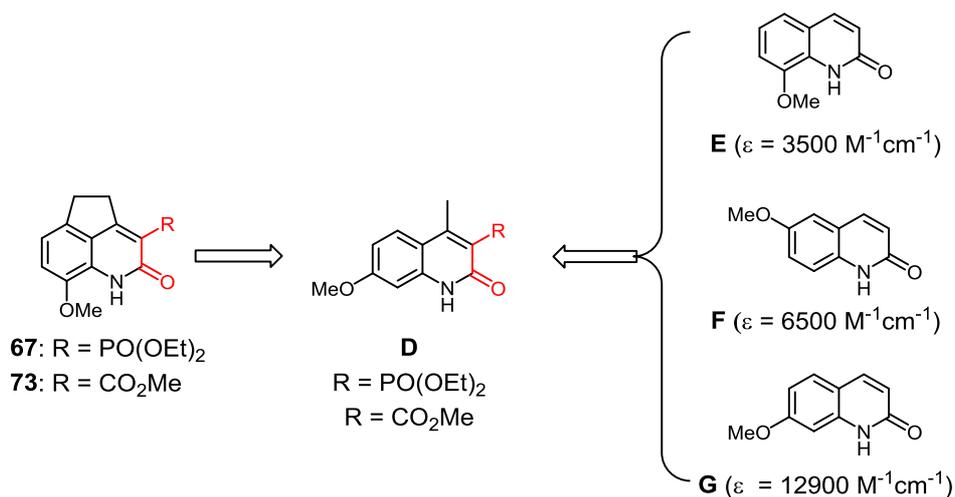


Figura 66. Diseño de los derivados de carbostirilo **D**

Para la síntesis de los derivados de carbostirilo objetivo **D** se aplicó una metodología similar a la utilizada para la síntesis de los derivados de dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas **67** y **73**, que implicaba acilación de la 2-amino-4-metoxi-acetofenona **168**, seguida de ciclación en medio básico (Esquema 25).



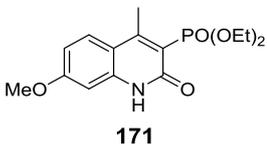
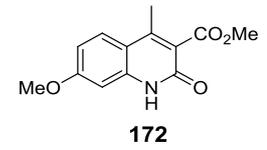
Esquema 25. Síntesis de los derivados de carbostirilo **171** y **172**. Reactivos y condiciones: (a) (EtO)₂OPCH₂CO₂H, HATU, DIPEA, CH₂Cl₂; (b) MeCO₂CH₂COCl, CH₂Cl₂; (c) NaH, DMF; (d) K₂CO₃, MeOH, 70°C MW.

La síntesis del fosfonato **171** se realizó mediante acilación de **168** con el ácido dietilfosfonacético en CH₂Cl₂, en presencia de HATU y DIPEA, seguida de ciclación de la amida intermedia **169**, por reacción con NaH en DMF a reflujo. Esta ciclación dio lugar a **173**, como producto mayoritario, resultado de la ciclación con eliminación de fosfato, obteniendo el fosfonato deseado **171** con bajo rendimiento. Por otra parte, el éster metílico **172** se obtuvo cuantitativamente mediante reacción de la amino-acetofenona **168** con 3-cloro-3-oxopropionato de metilo en CH₂Cl₂, seguida de ciclación de la amida **170**, por calefacción a 70 °C en presencia de K₂CO₃, mediante irradiación de microondas en MeOH.

2.2.3. Propiedades fotofísicas de los derivados de carbostirilo

Las propiedades fotofísicas de absorción y emisión de los carbostirilos **171** y **172** se recogen en la Tabla 19.

Tabla 19. Propiedades fotofísicas de los derivados de carbostirilo **171** y **172**

Compuestod ^a	Disolvente	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^b	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm) ^c	Φ_F ^d	Brillo
 <p>171</p>	Tolueno	328, 343	4119	366	0.0790	325
	Dioxano	328, 343	3085	366	0.0700	216
	CH ₃ CN	326, 340	3394	365	0.1197	406
	MeOH	325, 338	4713	359	0.1425	672
	H ₂ O	322, 336	5115	358	0.1886	965
 <p>172</p>	Tolueno	334, 347	3668	408	0.0933	342
	Dioxano	332, 346	3876	408	0.0558	216
	CH ₃ CN	332, 344	4236	409	0.0584	247
	MeOH	330, 342	4302	415	0.1015	436
	H ₂ O	330, 342	4334	415	0.1154	500

^aMedidos en duplicado a una concentración 12 μ M. ^bEn la menor $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$. ^cExcitación a 320 nm. ^dRendimientos cuánticos calculados con referencia al sulfato de quinina (en 0.1 M de H₂SO₄).

Al igual que los análogos derivados de dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona **67** y **73**, estos derivados de carbostirilo presentaron dos máximos de absorción (328-330 y 336-347), aunque en este caso ambos picos fueron de intensidad muy similar y mostraron

ligeros desplazamientos hipsocrómicos al aumentar la polaridad del disolvente. A diferencia de lo descrito para los derivados de carbostirilo **E-G**, arriba comentados, al comparar los coeficientes de extinción molar de **171** y **172** con los de las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas **67** y **73**, no se observaron diferencias significativas relacionadas con la diferente posición relativa del grupo MeO con respecto al carbonilo en posición 2. En cuanto a la emisión, **171** y **172** presentaron desplazamientos hipsocrómicos de 30-100 nm en las $\lambda_{\max}^{\text{em}}$, con respecto a sus análogos las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas **67** y **73** y, al igual que éstos, mostraron significativos aumentos en los rendimientos cuánticos al aumentar la polaridad del disolvente, pero no fueron solvatocrómicos.

Al igual que se ha comentado para los derivados de dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona, se realizó la valoración fluorimétrica de los derivados de carbostirilo **171** y **172** con 1 y 2 equivalentes de EuCl_3 , TbCl_3 , DyCl_3 y SmCl_3 . Como se muestra en la Figura 67, en ambos casos se observó transferencia de energía selectiva a terbio. El catión Tb^{3+} ($[\text{Xe}]4f^8$) posee 8 electrones en los orbitales 4f, que en estado fundamental están localizados en los niveles energéticos 7F_J ($J = 0-6$), con la excitación pasan preferentemente al nivel 5D_4 y en la relajación emiten fluorescencia en las transiciones a los niveles 7F_6 , 7F_5 , 7F_4 y 7F_3 , entre las cuales, la transición $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ (≈ 550 nm) es mayoritaria (la Figura 68 muestra las bandas de emisión descritas para TbPO_4 ³³⁰).

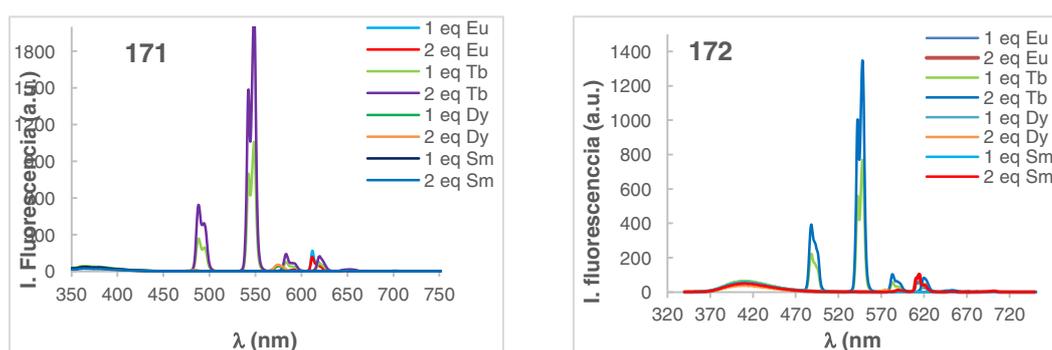


Figura 67. Espectros de emisión de los derivados de carbostirilo **171** y **172**, tras la adición de EuCl_3 , TbCl_3 , DyCl_3 y SmCl_3 .

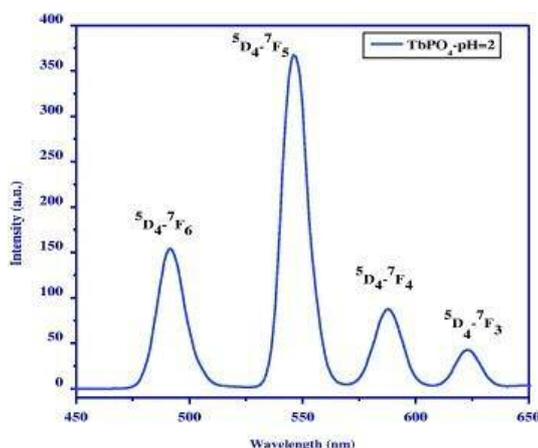


Figura 68. Espectro de emisión de TbPO_4 ³³⁰

La diferente selectividad en la sensibilización de lantánidos entre las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas **67** y **73** por europio y los carbostirilos **171** y **172** por terbio, podría explicarse debido a la diferencia energética en las respectivas bandas de absorción de mínima energía, a 355-361 nm para las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas y a 336-347 para los carbostirilos. La mayor energía de estos últimos facilitaría la sensibilización de Tb^{3+} , que requiere mayor energía de excitación para su nivel $^5\text{D}_4$ ($\approx 20.500 \text{ cm}^{-1}$)³³¹ que el europio para su nivel $^5\text{D}_0$ ($\approx 17.200 \text{ cm}^{-1}$)³²⁷. Hay que señalar que con la coordinación los máximos de absorción de los cuatro complejos se desplazaron a 320 nm para todos ellos y que sus rendimientos cuánticos absolutos, medidos en CH_3CN usando una esfera de integración³³², fueron superiores a los de las respectivas antenas solas (0.242 para **Eu-67**, 0.082 para **Eu-73**, 0.208 para **Tb-171** y 0.081 para **Tb-172**).

En el estudio de la estequiometría de la coordinación de Tb^{3+} , similar al comentado para las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas, en la valoración de una disolución 54 μM de **171** y **172** en CH_3CN con concentraciones crecientes de TbCl_3 en CH_3CN (54 μM), se empezó a observar incremento significativo de luminiscencia a partir de 0.5 equivalentes de TbCl_3 , con aumentos progresivos hasta alcanzar saturación en la intensidad de luminiscencia a partir de 2 equivalentes en el caso del fosfonato **171**, mientras que en el carboxilato **172** no se llegó a alcanzar saturación con más de 4 equivalentes (Figura 69). El análisis más detallado de la forma de la banda $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_5$ de Tb^{3+} con el fosfonato **171** no mostró diferencias con la estequiometría, mientras que, con el carboxilato **172**, al aumentar los equivalentes de TbCl_3 el máximo de emisión se va desplazando de 543 a

548 nm (Figura 70). Este diferente comportamiento de **171** y **172** se manifestó también en sus tiempos de vida (Figura 71). Con el fosfonato **171**, el tiempo de vida cae inicialmente de 0.78 a 0.20 ms para 0.3 equivalentes de $TbCl_3$ y vuelve a aumentar a 0.5 equivalentes para estabilizarse en 1.65 ms para 1 equivalente. En el caso del carboxilato **172**, el tiempo de vida se mantuvo constante próximo a 1.3 ms hasta los 1.5 equivalentes, a partir de los cuales empieza a bajar lentamente. Hay que señalar que en estos derivados no fue posible obtener buenos cristales de sus respectivos complejos de Tb^{3+} para el análisis de la estequiometría por difracción de rayos X.

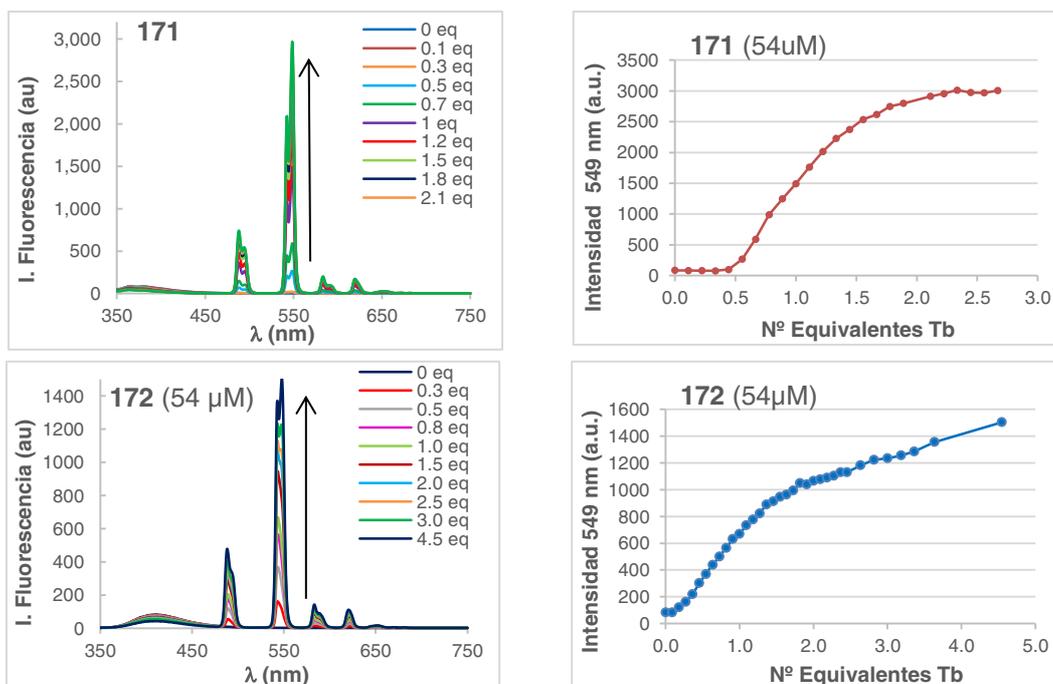


Figura 69. Espectros de emisión de **171** y **172** tras la adición de cantidades crecientes de $TbCl_3$

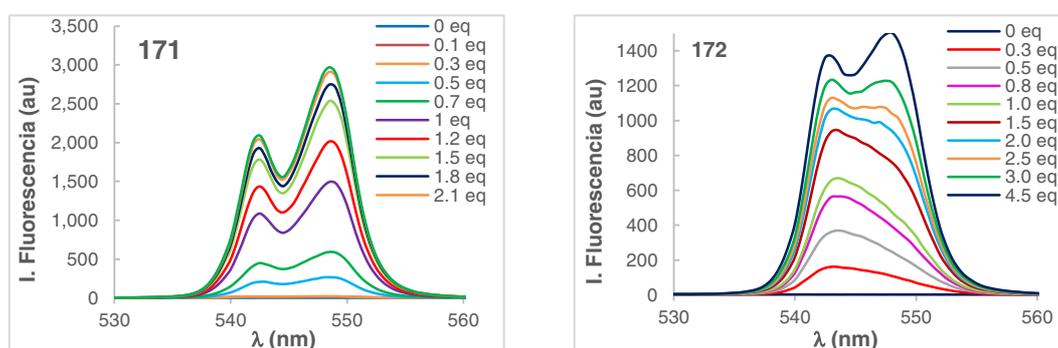


Figura 70. Ampliación de los espectros de emisión de **171** y **172**, obtenidos tras la adición de cantidades crecientes de $TbCl_3$

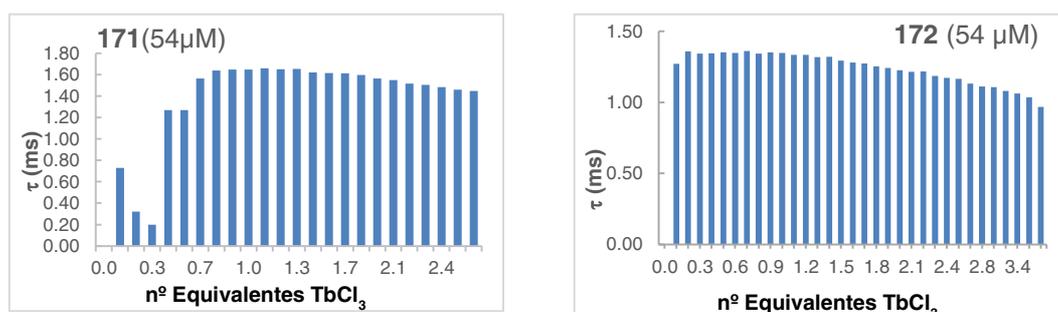


Figura 71. Variación de τ de Tb^{3+} con **171** y **172**, tras la adición de cantidades crecientes de $TbCl_3$

2.2.4. Antenas de lantánidos sensores de H_2O

A diferencia del comportamiento en disolventes orgánicos, tanto los derivados de dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona **67** y **73** como los derivados de carbostirilo **171** y **172** mantienen su fluorescencia en agua o alcoholes (MeOH o EtOH) y no sensibilizan la luminiscencia de lantánidos en estos disolventes. Como se muestra en la Figura 72 para **67** y **73**, la adición de trazas de agua o alcoholes (1%) a la disolución 0.1 mM de sus complejos de Eu^{3+} en THF elimina la fluorescencia roja del europio, observándose la fluorescencia azul de la antena no coordinada.

El hecho de que en agua se pierda la luminiscencia del lantánido parece indicar que la capacidad de coordinación de la antena no es suficientemente fuerte como para competir con el agua. Este resultado es indicativo de la posible utilidad de estas antenas como sensores de agua, abriendo la puerta a una nueva serie de antenas de lantánidos sensibles a la detección de agua.

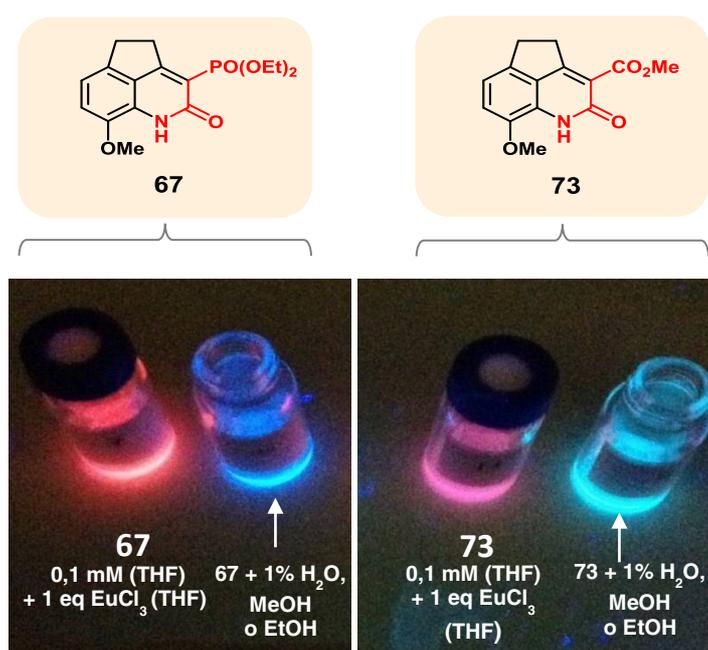


Figura 72. Luminiscencia de los complejos Eu-**67** y Eu-**73** a una concentración 0.1 mM en THF y su inestabilidad tras la adición de 1% de H₂O o alcoholes

Con el fin de valorar el potencial de nuestras antenas de lantánidos, como sensores de H₂O, se realizó la valoración espectrofotométrica de disoluciones 0,54 μM de sus respectivos complejos **Eu-67** (estequiometría 1:2) y **Tb-171** (estequiometría 1:1) en CH₃CN tras la adición de porcentajes crecientes de H₂O (0-2% v/v). Como se muestra en la Figura 73, en ambos complejos, la sensibilidad al agua fue muy elevada, ya que la luminiscencia de los lantánidos comenzó a disminuir con la adición de 0.005 %, llegando a desaparecer tras la adición de 2 % de agua. Simultáneamente con la disminución de la intensidad de la fluorescencia, se observó también disminución en los tiempos de vida desde 0.49 a 0.14 ms para **Eu-67** y desde 1.6 a 0.51 ms para **Tb-171**.

Resultados y Discusión

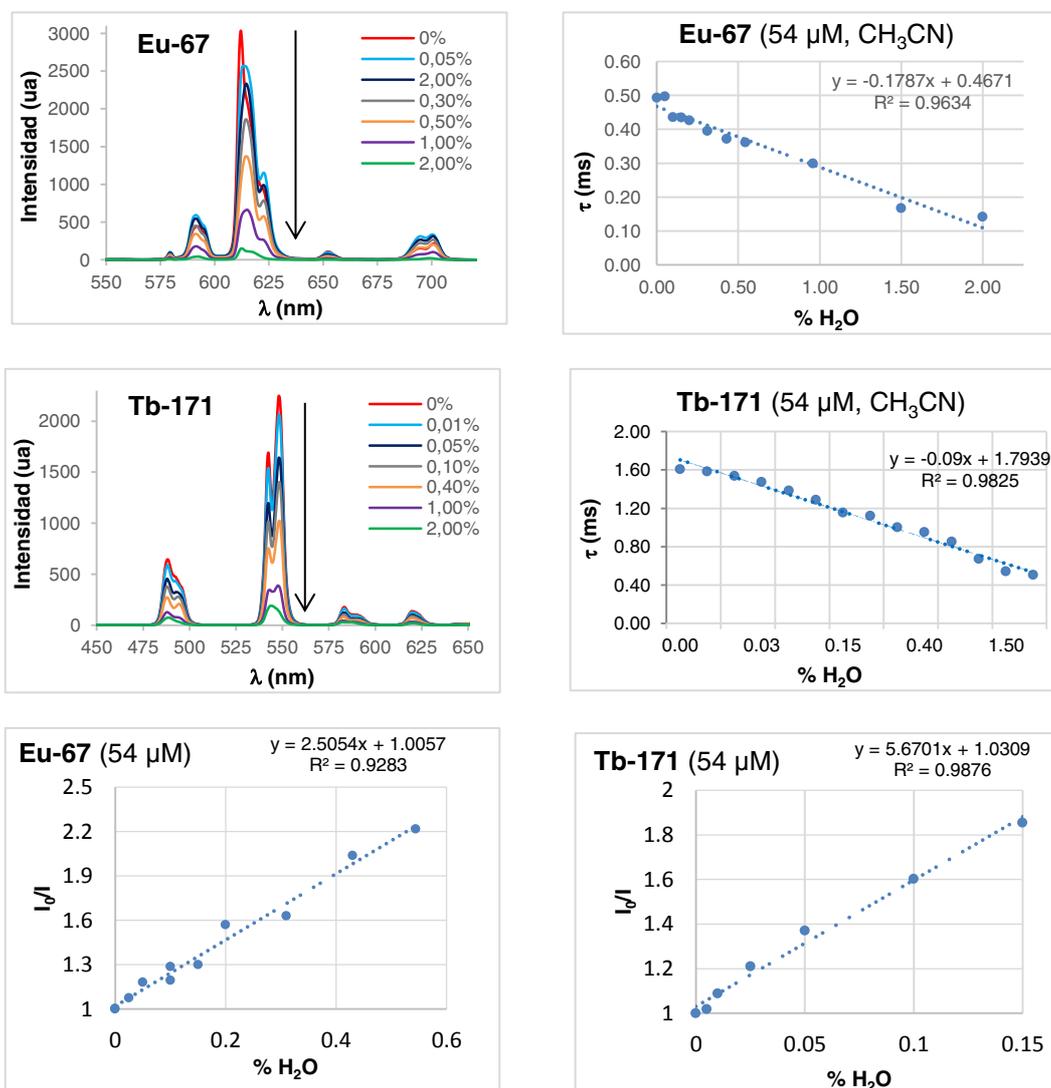


Figura 73. Variación de la intensidad y tiempo de vida de fluorescencia de los complejos **Eu-67** y **Tb-171** con el % de H_2O y respectivas rectas de regresión de la ecuación de Stern-Volmer

A continuación, aplicando la ecuación de Stern-Volmer⁹, ya comentada en el apartado 2.2.6 de esta tesis se determinaron los respectivos límites de detección (LOD)²⁷⁹ de H_2O en acetonitrilo. En la Figura 73 se muestran las regresiones lineales de I_0/I frente a la concentración de H_2O (en % (V/V)) para el cálculo de estos LOD para **Eu-67** y **Tb-171**, respectivamente. Aplicando la fórmula $LOD = (3.3 \times SD) / K_{SV}$, donde SD es la desviación estándar residual de la regresión lineal²⁷⁹ y K_{SV} (constante de Stern-Volmer)

es la pendiente de la regresión lineal, se obtuvieron unos valores de K_{SV} de 4.025 M^{-1} y 10.20 M^{-1} y de LOD de 0.025 % y 0.019 % (v/v) para **Eu-67** y **Tb-171** respectivamente. Estos valores son comparables con los de los sensores de H_2O más sensibles descritos hasta momento en la bibliografía^{275, 333}, entre los que se encuentran algunos complejos de lantánidos³³⁴. Hay que señalar que los límites de detección obtenidos para **Eu-67** y **Tb-171** fueron, al menos, un orden de magnitud inferiores a los que habíamos obtenido previamente para la quinolimida **155** y la naftalimida **157**.

2.3.5. Antenas de lantánidos sensores de tioles

En la mencionada evaluación de los derivados de dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona como potenciales antenas de lantánidos, se incluyó también el ácido carboxílico **74** (Figura 74), derivado del éster **73**. En esta evaluación cualitativa, se observó que **74** sensibilizaba la emisión de europio selectivamente en H_2O y no en disolventes orgánicos (CH_3CN o THF). Por ello, se determinaron las propiedades fotofísicas de este ácido en CH_3CN y H_2O , que se recogen en la Tabla 20 en comparación con las del correspondiente éster **73**.



Figura 74. Estructura de la dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona **74**

Hay que señalar, que solo unos pocos compuestos descritos en la bibliografía son capaces de coordinarse a los lantánidos y transferir su energía a los lantánidos en agua generando luminiscencia. Esto es debido a que, como comentamos en la introducción, el pequeño tamaño de los iones Ln^{3+} les genera una alta densidad de carga superficial positiva, comportándose como ácidos de Lewis duros, coordinándose preferentemente con grupos dadores muy electronegativos (bases de Lewis duras), como el grupo OH.

Resultados y Discusión

Esta coordinación produce la desactivación no radiativa del lantánido por acoplamiento con estados vibracionales de los OH del entorno e inhibe su luminiscencia^{335, 336}.

Tabla 20. Comparación de las propiedades fotofísicas de las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona **73** y **74**

Compuesto ^a	Disolvente	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_F ^b
73	CH ₃ CN	310	2989	458	0.11
	H ₂ O	312	4564	485	0.34
74	CH ₃ CN	305	4720	455	0.04
	H ₂ O	300	5451	450	0.03

^aMedidos en duplicado a una concentración 12 μ M. ^bRendimientos cuánticos calculados con referencia al sulfato de quinina (en 0.1 M de H₂SO₄).

Como se puede observar en la Tabla 20, en comparación con el éster **73**, el ácido **74** presenta desplazamientos hipsocrómicos en los máximos de absorción y de emisión de 5-12 nm y 3-35 nm, respectivamente, aumento en los coeficientes de extinción molar y disminución en los rendimientos cuánticos. Además, los máximos de absorción y emisión se modifican poco con el cambio de polaridad del disolvente, con un desplazamiento hipsocrómico de 5 nm al pasar de CH₃CN a H₂O.

En vista de la sensibilización de la emisión de Eu (III) con **74** observada en la evaluación cualitativa, se registraron los espectros de emisión de fluorescencia resuelta en el tiempo de **74** en presencia de cantidades crecientes de EuCl₃ y excitando a 320 nm (Figura 75). A partir de 0.1 equivalentes de Eu (III), se empezó a observar la emisión de las bandas de este catión ⁵D₀→⁷F₁ (585-600 nm) y ⁵D₀→⁷F₂ (610-630 nm), que alcanzaron el máximo de emisión con 0.5 equivalentes de EuCl₃, indicando una estequiometría 2:1 del complejo **74**: Eu.

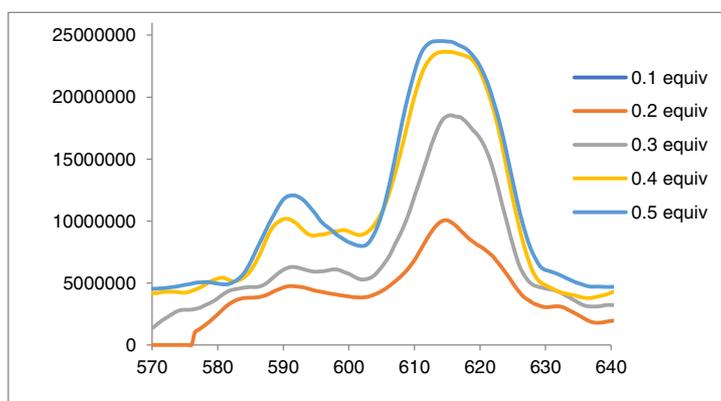
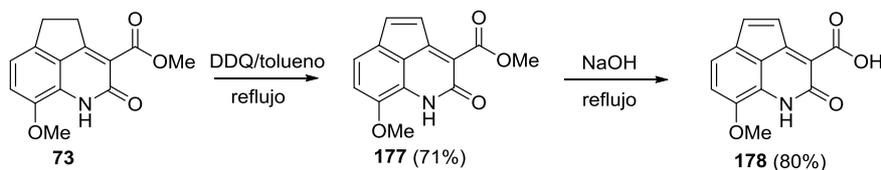


Figura 75. Espectros de emisión de la disolución de **74** (18 uM) en H₂O, tras adición de cantidades crecientes de EuCl₃ ($\lambda_{ex} = 320$ nm)

Por otra parte, con el fin de mejorar las propiedades fotofísicas de **74**, se planteó el aumento de la conjugación electrónica mediante la introducción de un doble enlace adicional en su esqueleto tricíclico. Por ello, tal como se indica en el Esquema 26, se preparó el derivado **178** a partir del éster metílico **73**, por oxidación con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ), seguida de saponificación por tratamiento con NaOH a reflujo, obteniendo **178** con un rendimiento global de 57%.



Esquema 26. Síntesis de la ciclopenta[de]quinolin-2-ona **178**.

Tal como se recoge en la Tabla 21, la introducción del doble enlace en las posiciones 4,5 de la dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona dio lugar a un desplazamiento de 85-100 nm en el máximo de absorción, aunque con disminución en los coeficientes de extinción molar. Sin embargo, la ciclopenta[de]quinolin-2-ona **178** no emite fluorescencia y no transfiere energía a Eu(III). Señalar que, mientras las disoluciones del compuesto **74** eran incoloras, las de **178** tanto en H₂O como en disolventes orgánicos se tornaron de un color naranja intenso.

Tabla 21. Comparación de las propiedades fotofísicas comparativas de la dihidrociclopenta[de]-quinolin-2-ona **73** y de la ciclopenta[de]quinolin-2-ona **178**.

Compuesto ^a	Disolvente	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	Φ_F^b
74	CH ₃ CN	305	4720	455	0.04
	H ₂ O	300	5451	450	0.03
178	CH ₃ CN	390	2125	-	-
	H ₂ O	400	3050	-	-

^aMedidos en duplicado a una concentración 12 μ M. ^bRendimientos cuánticos calculados con referencia al sulfato de quinina (en 0.1 M de H₂SO₄).

La falta de emisión de fluorescencia de **178** podría explicarse debido al carácter antiarómico del anillo de ciclopenta[de]quinolin-2-ona, de acuerdo con las reglas de Huckel de antiaromaticidad³³⁷. Según la IUPAC Los criterios de antiaromaticidad son los siguientes⁴:

1. La molécula debe tener $4n$ electrones π , donde n es cualquier número entero.
2. La molécula debe ser cíclica.
3. La molécula debe tener un sistema conjugado de electrones π .
4. La molécula debe ser plana

En sistemas antiarómicos, la inhibición de fluorescencia se produce por disminución de la energía de los orbitales HOMO-LUMO y desactivación no radiativa. Además, estos sistemas tienden a volver al estado aromático que es más estable³³⁸⁻³⁴¹.

Por ello, como se muestra en la figura 76, el ácido **178** podría ser un buen aceptor de Michael, con aplicación como sensor de tioles y como reactivo de marcaje de péptidos y proteínas en residuos de cisteína. Teniendo en cuenta esta hipótesis, estudiamos la aplicación de **178** como sensor de bitionoles [cisteína (Cys), homocisteína (Hcy), glutatión (GSH) y ácido sulfhídrico (H₂S)].

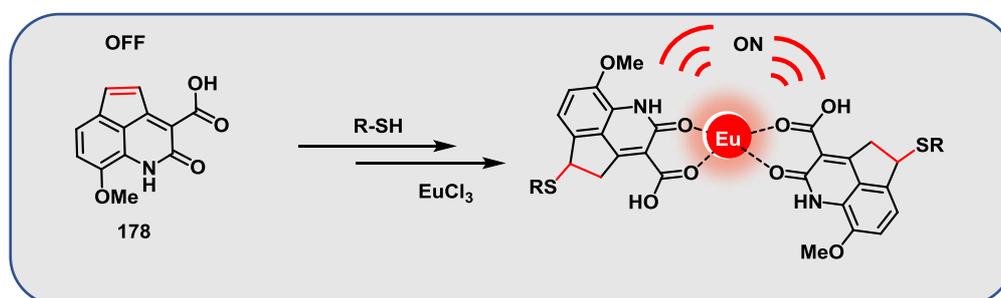


Figura 76. Propuesta de **178** como sensor de biotioles.

Los biotioles, desempeñan un papel crucial en la regulación intracelular de la homeostasis redox y en el mantenimiento de las funciones celulares, tales como las modificaciones post-transcripcionales, la biocatálisis, las uniones a metales y la detoxificación xenobiótica^{342,343}. El estrés oxidativo es uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de una gran variedad de enfermedades crónicas y degenerativas. Cambios en los niveles de biotioles están relacionados con diversas enfermedades. Por ejemplo, hay una elevada asociación de Cys con neurotoxicidad, pérdida de peso, lesiones en la piel, disminución del crecimiento en niños, daño renal y fatiga muscular³⁴³. La deficiencia de Hcy aumenta el riesgo de enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedad de Alzheimer y osteoporosis. El GSH ha sido directamente relacionado con enfermedades como cáncer, enfermedad de Parkinson y Alzheimer³⁴³ y el H₂S es un importante mensajero celular en una variedad de procesos fisiológicos³⁴⁴. Por lo tanto, el interés por monitorizar los niveles de biotioles ha aumentado exponencialmente debido a su importancia en diagnóstico y en investigación biomédica. En este campo, las sondas fluorescentes basadas en lantánidos tienen una gran ventaja, debido a su elevada vida media de fluorescencia en comparación con los fluoróforos orgánicos clásicos, lo que permite un aumento de sensibilidad y de relación señal-ruido, evitando la fluorescencia natural de fondo.

Se han desarrollado multitud de sondas y técnicas para la detección de biotioles. Entre los métodos empleados, los basados en emisión de fluorescencia se encuentran entre los que aportan mayores ventajas, debido a su simplicidad, bajos límites de detección y su facilidad de uso³⁴⁵. En el diseño de herramientas fluorescentes para la detección de tiores, se busca disponer de un cromóforo que presente dos características

principales, a) presentar un grupo susceptible al ataque nucleófilo por el tiol y que, por tanto, proporcione una rápida respuesta y b) que los cambios tras la unión del tiol a la sonda sean notables, es decir, el espectro de emisión de fluorescencia debe cambiar significativamente después de la reacción. Los llamados sensores off-on de tipo aceptor de Michael, se encuentran entre los más utilizados. Generalmente, tras el ataque nucleófilo del grupo sulfhidrilo y su adición al doble enlace la fluorescencia de estos sensores se incrementa notablemente³⁴⁶.

Para valorar el potencial del ácido **178** como sensor de biotioles, en primer lugar, se realizó el estudio de las cinéticas de reacción de este compuesto con Cys, Hcy, GSH y H₂S mediante espectroscopía de fluorescencia en placas de 64 pocillos. Para ello, se añadieron 1, 5, 10 y 100 equivalentes de los cuatro biotioles comentados anteriormente sobre una concentración 5 μ M de **178** en tampón Hepes pH 7.4, registrando los espectros de emisión entre 450 y 550 nm durante 3 horas.

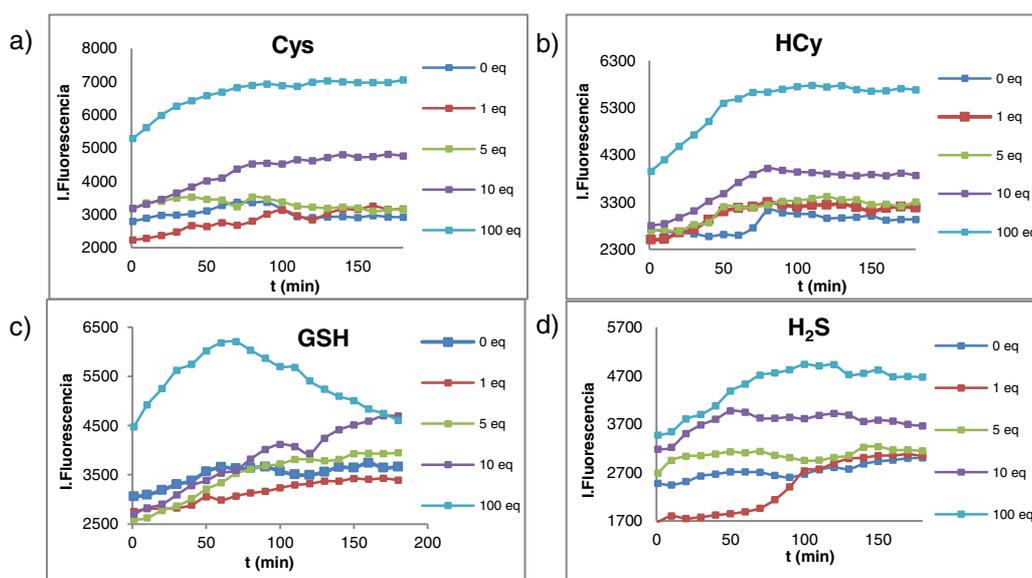


Figura 77. Cinéticas de reacción de **178** (5 μ M) con 1, 5, 10 y 100 equivalentes de biotiol durante 3 horas (λ_{ex} =320 nm). a) Cys; b) Hcy; c) GSH; d) H₂S.

Como se muestra en la Figura 77, tras la adición de los btiotioles estudiados, la emisión de fluorescencia de **178** fue similar para todos los btiotioles, con pequeñas diferencias. En todos los casos, se observó que con 1 ó 5 equivalentes de btiotiol, el aumento de fluorescencia con el tiempo era pequeño. También se observó que, con 10 equivalentes se alcanzaba el máximo de emisión después de 1 h de reacción, mientras que, con 100 equivalentes la reacción era instantánea, observando el máximo de emisión también a la hora de reacción. Estos datos indicaban una alta dependencia de la reactividad con la concentración del btiotiol. En este sentido, hay que señalar los altos niveles fisiológicos de los btiotioles. Así, por ejemplo, la concentración intracelular de GSH es 1-10 mM^{347, 348} y las de Cys y Hcy son micromolares³⁴⁹. En la reacción de GSH con **178**, llama la atención que tras la adición de 100 equivalentes se alcance el máximo de fluorescencia a la hora de reacción y comience a disminuir gradualmente, lo que podría ser debido a un efecto de reversibilidad en la reacción, volviéndose a formar el doble enlace como se describen en varios casos en la bibliografía^{350, 351}.

En la gráfica de la figura 78 se muestra el aumento comparativo de fluorescencia de **178** con 100 equivalentes de tiol después de 3 horas de reacción. La adición de Cys o Hcy produjo un aumento de 2.5 veces en la fluorescencia de **178**, mientras que con GSH o H₂S el aumento fue aproximadamente de 1.5 veces. La cinética de reacción con Cys, se siguió también por HPLC-MS, a intervalos de tiempo de 0, 15, 30, 60 min y 24 h.

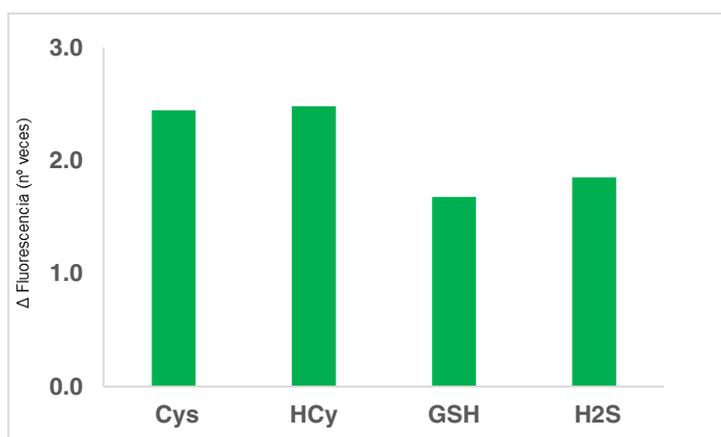


Figura 78. Aumentos de fluorescencia de **178** (5 μM) en tampón Hepes pH 7.4 después de 3 horas de la adición de 100 equiv. de btiotioles ($\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$)

En los cromatogramas recogidos en la Figura 79, se observó que a tiempo 0 (adición de Cys en el momento de inyectar la muestra en HPLC-MS) el 55% de **178** ya se había transformado en el pico de adición de Cys (masa = 365.16). A los 15 minutos se observó un 85 % de conversión, mientras que, a los 30 min el pico de **178** había desaparecido por completo. Este resultado confirmaba la alta reactividad de **178** con Cys y, por lo tanto, su potencial como sensor de fluorescencia de biotioles.

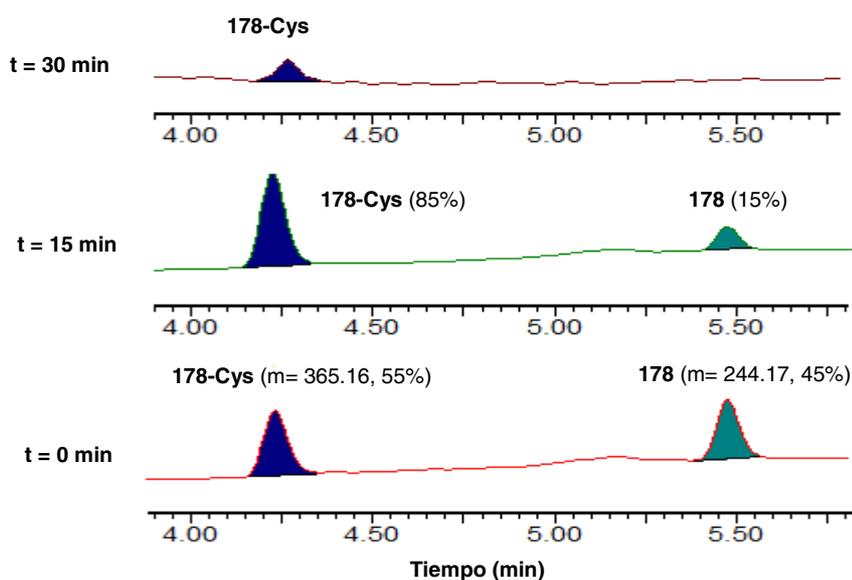


Figura 79. Análisis HPLC-MS de **178** ($5 \mu\text{M}$) en tampón Hepes pH 7.4 a distintos tiempos tras la adición de Cys ($50 \mu\text{M}$)

En base a la propuesta mostrada en la Figura 76, se repitió el estudio de las cinéticas de reacción de **178** con biotioles y a las 3 h se adicionaron 50 equiv de EuCl_3 y se registraron los correspondientes espectros de emisión de Eu (III) en la zona de 550-700 nm. Como se muestra en la Figura 80, en todos los casos el producto de la reacción de **178** con los biotioles fue capaz de transferir energía al catión Eu (III). El aumento más significativo de luminiscencia se produjo con GSH, hasta 7 veces. Con Cys y Hcy la luminiscencia aumento 4 veces y con H_2S el aumento fue de 2 veces. Hay que señalar que, si bien el GSH fue el tiol que produjo menor aumento de fluorescencia tras su reacción con **178**, en presencia de EuCl_3 fue el que produjo un mayor aumento en la

emisión de Eu (III). Este diferente comportamiento podría ser debido a la participación del GSH en la esfera de coordinación del lantánido^{352, 353}.

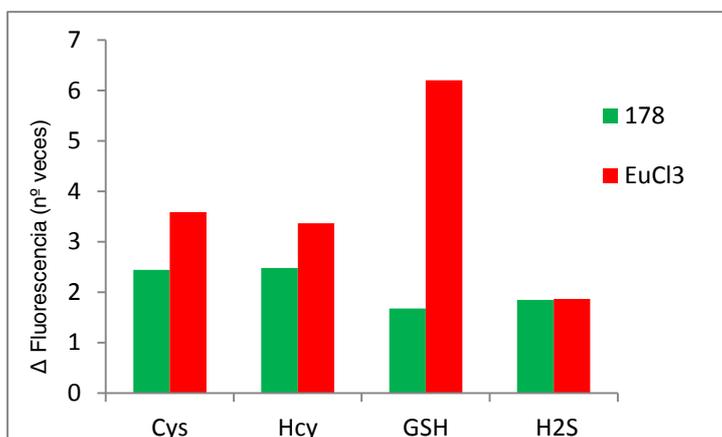


Figura 80. Aumentos de fluorescencia de **178** (5 μ M), en verde y de EuCl_3 (250 μ M) en rojo, a las 3 h de adición de biotioles ($\lambda_{\text{ex}}=320$ nm)

El conjunto de resultados indica que la ciclopenta[de]quinolin-2-ona **178** reacciona instantáneamente con cualquiera de los tioles, aunque requiere alta concentración de estas para la reacción completa, que se alcanza a 1-1.5 h, con aumentos máximos de fluorescencia para Cys y Hcy y mínimo para GSH y que en presencia de EuCl_3 sensibiliza la emisión de Eu (III), invirtiéndose el orden en el incremento de luminiscencia del catión, siendo máximo para GSH y mínimo para H_2S .

Desde nuestro conocimiento, solo unos pocos artículos han descrito previamente sensores de tioles basados en la sensibilización de la luminiscencia de lantanidos mediante antenas³⁵⁴⁻³⁵⁶. Todos ellos utilizan una estrategia similar de diseño, consistente en la utilización de una estructura capaz de formar complejos estables con Tb (III) unida a un fluoróforo orgánico, cuya emisión esta bloqueada por el efecto PET de un agrupamiento que es capaz de reaccionar con tioles. Al reaccionar con los tioles se desactiva el efecto PET y el fluoróforo transfiere la energía al Tb (III), activándose su luminiscencia.

A pesar de que nuestros estudios indicaban el alto potencial de **178** como sensor de tioles, la dificultad para la entrada celular conjunta de **178** y una sal de Eu (III) limitaba su utilización directa para estudios *in cellulo*. Por ello, con el fin de aumentar la estabilidad del complejo con Eu (III) y su penetración celular, se planteó la unión a **178** de una estructura fuertemente complejante de lantánidos como es el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecane-1,4,7-triacético (DO3A). Este ácido ha sido ampliamente utilizado en la complejación de una gran cantidad de metales entre los que se encuentra los lantanidos³⁵⁷⁻³⁶⁰. Esto permite, por un lado, que el lantanido no se encuentre en su estado libre y pueda ser utilizado en medios biológicos sin generar toxicidad, por otro, permite que la esfera de coordinación del lantanido esté protegida del agua y que una antena pueda transferirle la energía en medios acuosos, pudiendo ser utilizado en estudios *in cellulo*. Así, por ejemplo, Anh Thy Bui *et al*, diseñaron un sistema de 1,4,7-triazaciclononano complejado con terbio y unido a tres rotores moleculares que actúan como antenas de terbio cuando se inhibe su rotación por aumento de la viscosidad del medio (Figura 81). En base a este mecanismo, estos complejos de Tb (III) permitieron la visualización mediante FLIM de células cancerosas T24 fijadas³⁶¹.

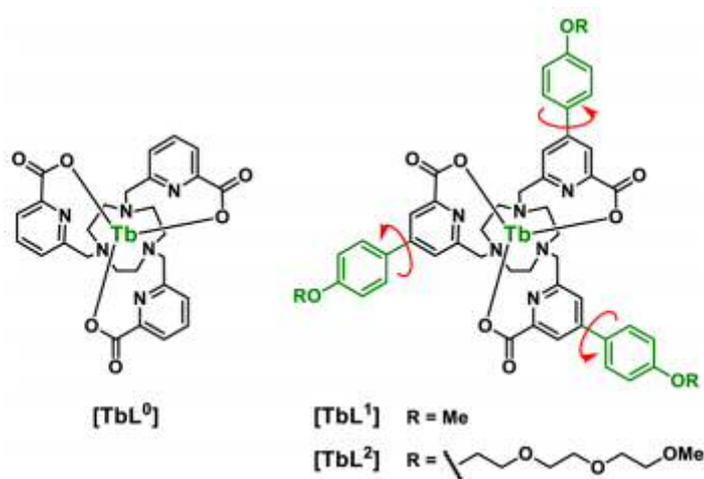


Figura 81. Estructura de los complejos de terbio diseñados por Anh Thy Bui *et al*³⁶¹.

En nuestro caso, se planteó el estudio de la unión del ácido **178** a DO3A mediante un enlace amida, a través de un espaciador aminoetileno como se muestra en la Figura 82.

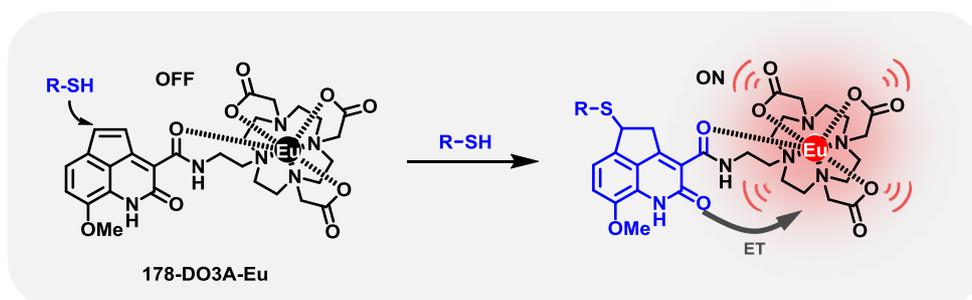
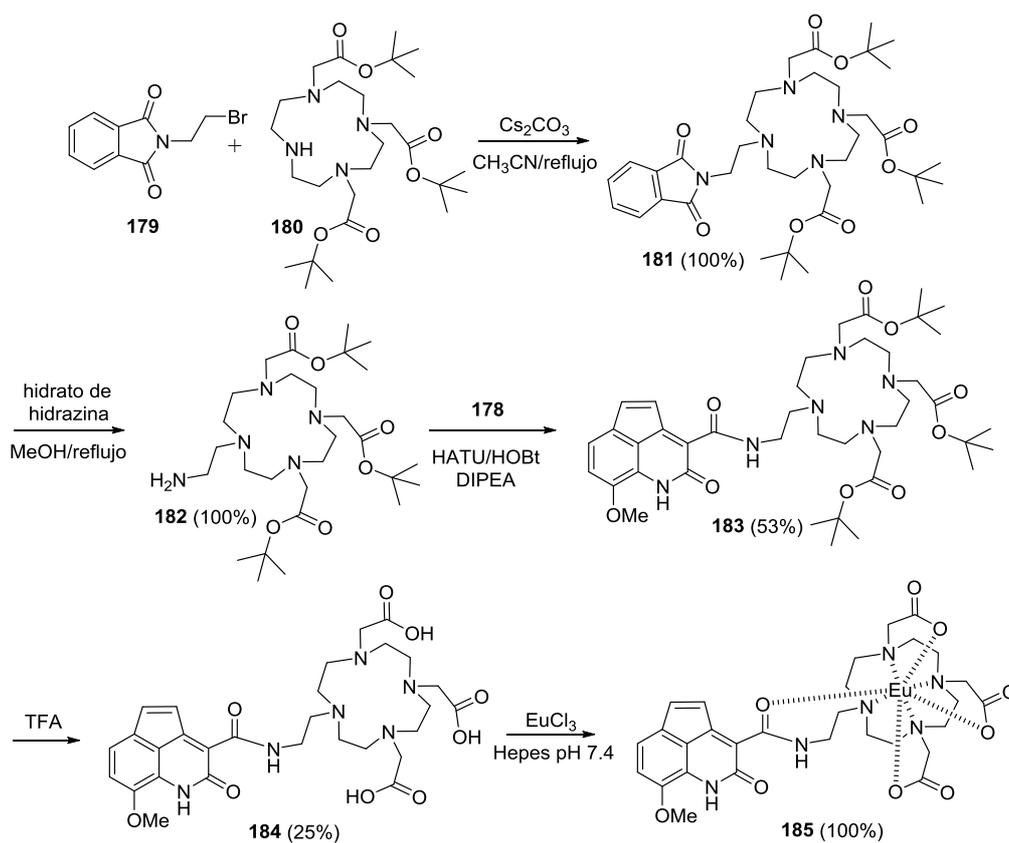


Figura 82. Propuesta del complejo **178-DO3A-EuCl₃** para la detección de btiolios.

Como se indica en el Esquema 27, la síntesis del complejo **178-DO3A-Eu(III)** (**185**) requirió la adecuada funcionalización de DO3A para introducir el espaciador de aminoetileno. Para ello, se llevó a cabo la reacción del triéster terbutílico de DO3A (**180**) con *N*-(2-bromoetil)-ftalimida (**179**), a reflujo de CH₃CN en presencia de 2 equiv de Cs₂CO₃, seguida de desprotección del grupo amino por tratamiento con hidrato de hidrazina, obteniendo **182** con rendimiento cuantitativo. Posteriormente, se llevó a cabo el acoplamiento de la amina **182** con el ácido **178**, utilizando HATU y HOBt en presencia de DIPEA como agentes de acoplamiento, obteniendo la correspondiente amida **183** con un 53% de rendimiento. A continuación, se llevó a cabo la eliminación de los grupos ^tBu por tratamiento con TFA durante 24 h, para obtener **184** con 25 % de rendimiento, tras purificación por HPLC-semipreparativo. Finalmente, se llevó a cabo la formación del complejo con Eu (III) mediante disolución de **184** en Hepes pH 7.4 (10 mM) y adición de una disolución 50 mM de EuCl₃, con agitación circular durante 12 h, para la formación del complejo **185** de forma cuantitativa.

Tras la obtención de **185** disuelto en Hepes pH 7.4, se registraron sus espectros de emisión en la zona de 380-750 nm, a distintos tiempos tras la adición de cantidades crecientes de los tioles Cys, Hcy, GSH y H₂S (5-100 equiv), excitando a 320 nm. La emisión se registró durante 24 h a intervalos de 3 min. Se observó que, a medida que el tior iba reaccionando con **185**, se iba produciendo un incremento en la fluorescencia de

la dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona generada (máximo de emisión a 460 nm) y de la emisión de Eu (máximo de emisión a 616 nm). Como se muestra en la Figura 83, al igual que con el ácido **178**, el incremento era dependiente del número de equivalentes de tiol adicionados, obteniendo los mayores incrementos con la adición de 100 equiv. En todos los casos, a 1-1.5 h de la adición del tiol, tanto la fluorescencia de la dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona como la luminiscencia de Eu(III) fueron máximas, aunque la reacción con Cys fue más rápida, alcanzándose máximos de emisión a partir de los 25 minutos. Hay que señalar que, al igual que con **178**, en la adición de GSH y H₂S, después de alcanzar los máximos de luminiscencia a los 100 y 20 minutos, respectivamente, se observó una caída en la emisión, recuperándose posteriormente los valores máximos de fluorescencia. Estos resultados podrían ser debidos a la ya comentada reversibilidad en la adición de Michael^{16,17}.



Esquema 27. Síntesis del complejo **178-DO3A-EuCl₃** (**185**).

Resultados y Discusión

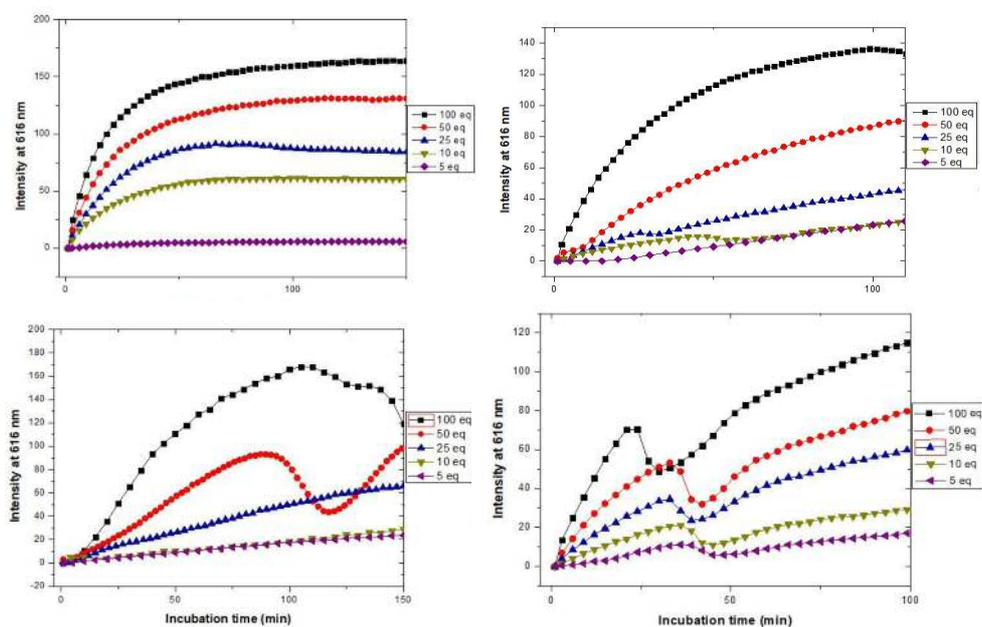


Figura 83. Variaciones en la intensidad de emisión de 185 ($5\mu\text{M}$ en Hepes pH 7.4) a 616 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm) al aumentar el tiempo tras la adición de tioles (5-100 Equiv.). a) Cys; b) Hcy; c) GSH; d) H₂S.

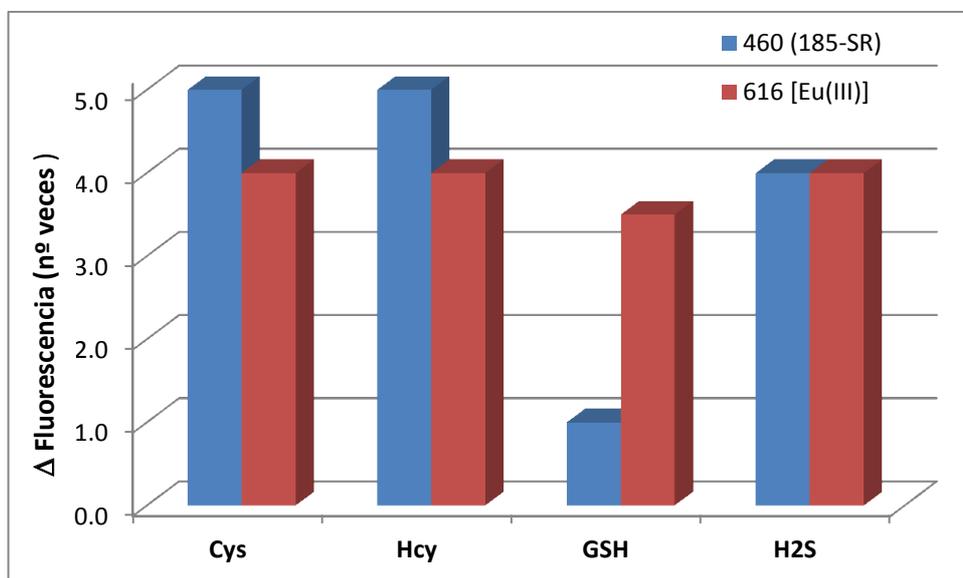


Figura 84. Aumentos de fluorescencia del complejo 185 ($5\mu\text{M}$ en Hepes) a 460 nm (máximo de emisión de la dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona, en azul) y a 616 nm (máximo de Eu, en rojo) a 1 h de adición de diferentes biotioles (100 Equiv.) ($\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm).

Al comparar los incrementos de fluorescencia que producen la adición de los diferentes tioles sobre la emisión de **185**, representados en la Figura 84, con los ya comentados para el ácido **178**, se observó un comportamiento similar, aunque con algunas diferencias. Tanto a 460 como a 616 nm, los aumentos de fluorescencia fueron mayores para Cys y Hcy. En ambos casos, a diferencia de **178**, los aumentos a 460 nm fueron superiores a los observados a 616 nm, indicativos de que la transferencia de energía al Eu(III) es menos eficiente, posiblemente porque la distancia que separa el anillo de dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona del catión sea mayor en **185**. Sin embargo, el comportamiento de este complejo frente a GSH y H₂S fue muy similar al de **178**, con una transferencia máxima de energía para GSH.

El conjunto de resultados es indicativo del alto potencial del uso conjunto de la ciclopenta[de]quinolin-2-ona **178** y una sal de Eu(III) como sensor off/on de tioles en estudios *in vitro* y de su complejo **185** como sensor en estudios *in cellulo*, aunque con poca selectividad con respecto al tiol. En sistemas multicanal sería posible la detección selectiva de GSH mediante detección ratiométrica en base a la relación de intensidades de emisión a 460 nm y a 616 nm. Sin embargo, estos resultados son preliminares y habría que confirmarlos con la determinación de los límites de detección para cada uno de los biotioles y con estudios de imagen *in cellulo*. Estos estudios serán realizados en un próximo futuro, aunque fuera del marco de esta tesis.

2.2.6. Conclusiones

De los resultados descritos en este capítulo se puede concluir:

1. El fosfonato derivado de dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona **67** y el correspondiente carboxilato de metilo **73** son fluoróforos solvatocrómicos, que emiten en la zona azul del espectro y cuya fluorescencia se incrementa al aumentar la polaridad del medio y al coordinarse con los cationes Zn²⁺ y Mg²⁺.
2. En disolventes orgánicos las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas **67** y **73** se coordinan con el catión Eu³⁺, formando complejos estables de estequiometría EuL₂ y coordinación 8. La excitación de estos fluoróforos sensibiliza selectivamente la emisión de luz de Eu³⁺, fundamentalmente de la banda ⁵D₀→⁷F₂, actuando como antenas de la luminiscencia de este lantánido. La coordinación de Eu³⁺ desplaza los

máximos de absorción de **67** y **73** de ≈ 350 nm a 320 nm, incrementa sus rendimientos cuánticos y disminuye el tiempo de vida de fluorescencia de Eu^{3+} . Los complejos no son estables en H_2O , su adición elimina la luminiscencia del lantánido y revierte a la fluorescencia de la antena.

3. La simplificación de la estructura tricíclica de dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona de **67** y **73** a la bicíclica de quinolin-2-ona en los análogos de carbostirilo **171** y **172** produce un desplazamiento hipsocrómico de ≈ 10 nm en los máximos de absorción y de 30-100 nm en los máximos de emisión, dando lugar a fluoróforos que, a diferencia de **67** y **73**, no son solvatocrómicos y que, en disolventes orgánicos, sensibilizan selectivamente la luminiscencia del catión Tb^{3+} . Los complejos de este catión con **171** ó **172** tampoco fueron estables en H_2O . Este disolvente quenchea la luminiscencia del lantánido.
4. La alta sensibilidad de la luminiscencia de los complejos de los ésteres derivados de dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona **67** y **73** y de carbostirilo **171** y **172** al quenching por H_2O les convierte en buenos sensores de trazas H_2O en disolventes orgánicos y de humedad en materiales orgánicos. Los límites de detección de agua determinados para los complejos **Eu-67** y **Tb-171** en CH_3CN son comparables a los de los mejores sensores fluorescentes de H_2O descritos en la bibliografía.
5. A diferencia del éster metílico **73**, su correspondiente ácido carboxílico **74** sensibiliza la emisión de Eu^{3+} en H_2O y no en disolventes orgánicos. Este ácido presenta desplazamientos hipsocrómicos en sus máximos de absorción y emisión con respecto al éster **73**, aumentos en los coeficientes de extinción molar y disminución de rendimientos cuánticos.
6. La introducción de un doble enlace adicional en el ácido **74** para dar lugar al derivado de ciclopenta[de]quinolin-2-ona **178** da lugar a un desplazamiento batocrómico de 85-100 nm en el máximo de absorción y pérdida de la emisión de fluorescencia. Este nuevo ácido carboxílico presenta alta reactividad como aceptor de Michael frente a tioles. Teniendo en cuenta estas características, estudios preliminares indican el alto potencial de **178** coordinado con una sal de Eu^{3+} como sensor *in vitro* de btiotes.
7. Con el fin de aumentar la estabilidad de los complejos de **178** con Eu^{3+} para estudios *in cellulo*, se ha preparado un derivado de **178** en el que a su estructura se ha anclado la estructura de 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacético (DO3A), frecuentemente utilizada en el campo por su alta capacidad para formar complejos

estables con cationes lantánidos. Los estudios preliminares del correspondiente complejo de Eu^{3+} **185** indican su potencial como sensor de biotioles para estudios *in cellulo*.

3. CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones Generales

Del conjunto de resultados descritos en esta Memoria se deducen las siguientes conclusiones:

- Se ha diseñado y puesto a punto una metodología general para la preparación de derivados de 4,5-quinolimidias, con diversidad de sustituyentes, como nuevos fluoróforos con aplicación en diversos biosensores de fluorescencia. Así mismo, se han desarrollado metodologías sintéticas adecuadas para la preparación de aminoácidos portadores de los nuevos fluoróforos y de reactivos apropiados para el marcaje de péptidos y proteínas.

- En general, los nuevos fluoróforos derivados de quinolimida son altamente fluorogénicos y solvatocrómicos y presentan importantes ventajas con respecto a los análogos derivados de naftalimida, una de las familias de fluoróforos más conocidas y utilizadas en el desarrollo de biosensores de fluorescencia, tales como: a) desplazamientos batocrómicos en los máximos de absorción y emisión; b) mayores desplazamientos de Stokes; c) mejor comportamiento solvatocrómico y d) mayor solubilidad en H₂O.

- La estructura de los sustituyentes sobre el esqueleto de quinolimida determina el mecanismo dominante en la emisión de fluorescencia, modulando el comportamiento fotofísico del fluoróforo mediante transferencia intramolecular de carga (ITC) o mediante transferencia electrónica fotoinducida (PET). De esta forma, en las quinolimidias portadoras de buenos grupos dadores de electrones en posición 9, como los grupos metoxilo y amino, la emisión se produce por mecanismo ITC, siendo altamente fluorogénicos y solvatocrómicos en medios apolares y buenos sensores de interacciones proteína-proteína. Mientras que, en las quinolimidias portadoras de un grupo (dimetilamino)etilo protonable, capaz de inhibir la emisión por efecto PET, dependiendo

del carácter electrodonador de otros grupos presentes en el fluoróforo, predomina el efecto PET, dando lugar a fluoróforos solvatocrómicos inversos sensores de H₂O y de acidez, o predomina el mecanismo ITC, dando lugar a fluoróforos solvatocrómicos, o a fluoróforos intermedios entre los dos tipos.

- Se ha demostrado que las quinolimidas con buenos grupos dadores de electrones en posición 9, que emiten por un mecanismo ITC, constituyen buenas herramientas para el estudio de la agregación del péptido β-amiloide y son buenos sensores *in vitro* e *in cellulo* de la interacción de la quinasa CDK5 con la proteína reguladora p25. Entre los grupos amino estudiados en la posición 9 del esqueleto de quinolimida, el anillo de azetidina es el que da lugar a mejores propiedades fotofísicas del fluoróforo para su utilización en biosensores.

- Entre las quinolimidas y naftalimidas portadoras del grupo (dimetilamino)etilo, las portadoras del grupo OMe en posición 9 se localizan en el citoplasma de macrófagos, mientras que las portadoras de grupos amino en esta posición se localizan en el núcleo celular, se unen al ADN como intercalantes y podrían tener aplicación como sondas fluorescentes para la visualización microscópica del núcleo.

- Las dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas portadoras de grupos fosfonato o carboxilato en posición 3 se coordinan con el catión Eu³⁺ y, tras su excitación UV, transfieren energía al catión, actuando como antenas de la luminiscencia del lantánido. La simplificación de la estructura de estas dihidrociclopenta[de]quinolin-2-onas para dar quinolin-2-onas, análogas de carbostirilo, ha conducido a antenas selectivas de la emisión de Tb³⁺. En ambos casos, los complejos de Eu³⁺ y de Tb³⁺ no son estables en disolventes polares próticos, anulándose el efecto de antena. Esta alta sensibilidad de la luminiscencia de los lantánidos a los disolventes próticos, permite la utilización de estas antenas como sensores de H₂O comparables a los mejores sensores de fluorescencia de humedad descritos en la literatura. Sin embargo, por el contrario, los compuestos análogos, portadores de grupos ácido carboxílico en lugar del carboxilato, si forman complejos estables en H₂O con Eu³⁺ o Tb³⁺, actuando como antenas de los lantánidos en este disolvente, pero no en disolventes apolares.

- La introducción de un doble enlace en la estructura de dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona da lugar a la correspondiente ciclopenta[de]quinolin-2-ona, que no es fluorescente, pero es muy reactiva frente a tioles en una reacción de adición de Michael, dando lugar a los correspondientes derivados de dihidrociclopenta[de]quinolin-2-ona, capaces de sensibilizar la emisión de Eu³⁺. Los

Conclusiones Generales

resultados preliminares descritos en esta Memoria indican que este comportamiento convertiría a la ciclopenta[de]quinolin-2-ona portadora de un ácido carboxílico en posición 3 en la primera antena de lantánidos sensor OFF-ON de biotioles por un mecanismo de adición de Michael. Con el fin de aumentar la estabilidad de los complejos de este derivado de quinolin-2-ona con lantánidos y facilitar la penetración celular en estudios *in cellulo*, esta estructura se ha anclado al ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triaácetico (DO3A), fuertemente complejante de lantánidos. Los estudios preliminares de este conjugado confirman sus buenas características como sensor de biotioles.

- En resumen, se ha diseñado, sintetizado y estudiado una nueva familia de fluoróforos y de antenas de lantánidos que han demostrado un alto potencial como herramientas para el desarrollo de novedosos biosensores de fluorescencia.

Conclusiones Generales

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. PRODUCTOS DE PARTIDA COMERCIALES

1-(2-Amino-4-metoxifenil)etan-1-ona	FLUOROCHEM
Acetona-d6	MERCK
Ácido acético glacial	SCHARLAU
Ácido cianacético	ALDRICH
Ácido dietilfosfonoacético	ALDRICH
AlCl ₃	FLUKA
(S)-3-Amino-2-(Boc-amino)-propiónico	PANCREAC
2-Aminoetanol	ALDRICH
Anhídrido acético	ALDRICH
Azetidina	ALDRICH
Azodicarboxilato de dietilo	ALDRICH
BBr ₃	ALDRICH
N-Boc-2-bromoetilamina	ALDRICH
N-Boc-1,4-butanodiamina	ALDRICH
N-Boc-etilendiamina	ALDRICH
4-Bromo-1,8-anhidrido naftálico	ALDRICH
Bromuro de ácido bromoacético	ALDRICH
N-Bromosuccinimida	FLUKA
N-Butilamina	ALDRICH

Parte Experimental

3-Cloro-3-oxopropionato de metilo	ALDRICH
CBr ₄	ABCR
CDCl ₃	ALDRICH
CD ₃ OD	ALDRICH
Clarcel®	ALDRICH
CrO ₃	ALDRICH
Cs ₂ CO ₃	FLUKA
DBU	ALDRICH
DDQ	ALDRICH
Trans-1,4-Diaminaciclohexano	ALDRICH
N,N-Dimetiletlenamina	ALDRICH
DMSO-d ₆	EURISO
Disolución saturada de metilamina en EtOH	ALDRICH
DIPEA	ALDRICH
D ₂ O	EURISO
DO3A	ABCR
EDC	ALDRICH
Et ₃ N	ALDRICH
EuCl ₃	ALDRICH
Fmoc-Osu	ALDRICH
HATU	ALDRICH
HCl 35%	PANREAC
Monohidrato de hidrazina	ALFA
HOBt	ALDRICH
K ₂ CO ₃	ALDRICH
Maleimida	ALDRICH
6-Metoxi-7-nitro-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona	ALDRICH
NaH (suspensión en aceite mineral)	ALDRICH
NaHCO ₃	ALDRICH
Na ₂ SO ₄	ALDRICH
Alcohol neopentílico	ALDRICH
POCl ₃	ALDRICH
tert-Butil (2-aminoetil)carbamato	ALDRICH
N-Boc-L-cisteína	ALDRICH

Parte Experimental

TFA	ALDRICH
THF seco	ALDRICH
TMSBr	ALDRICH

Todos los disolventes empleados fueron comerciales y se secaron y purificaron utilizando métodos estándar.

4.2. METODOS GENERALES

Los disolventes y los reactivos empleados fueron adquiridos de las casas comerciales habituales. Las cromatografías analíticas en capa fina fueron realizadas sobre cromatofolios de 0.2 mm de espesor, con gel de sílice de tipo 60, Merck F₂₅₄. Los compuestos se detectaron con luz UV a 254 nm y/o a 365 nm. Las separaciones cromatográficas en columna de media presión (flash) se realizaron con gel de sílice Merck 60 (230-400 mesh) o empleando cartuchos SNAP de Sílice KP-SIL de 5 g (12 x 75 mm), 10 g (12 x 150 mm) o 50g (39 x 81 mm) y KP-C18-HS 12g (12 x 150 mm), utilizando un equipo Biotage Isolera One. Los eluyentes se indican en cada caso y las proporciones indican la relación volumen:volumen. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Mettler Toledo M170. Los espectros de ¹H-, ¹³C- y ¹⁵N-RMN se han registrado a temperatura ambiente y a temperatura variable en los espectrómetros Varian-INOVA 300 (¹H, 300 MHz; ¹³C, 75 MHz), Varian-INOVA 400 (¹H, 400 MHz; ¹³C, 100 MHz), Varian Mercury 400 (¹H, 400 MHz; ¹³C, 100 MHz) y Varian Unity 500 (¹H, 400 MHz; ¹³C, 125 MHz). En las muestras disueltas en CDCl₃ se utilizó TMS como referencia interna, y en el resto se empleó la señal correspondiente al disolvente utilizado. En aquellos compuestos cuyos espectros monodimensionales presentaban complejidad, la asignación de las diferentes señales se realizó con la ayuda de espectros de correlación homonuclear ¹H-¹H COSY, y espectros de correlación heteronuclear ¹H-¹³C de tipo HSQC o/y HMBC. En el caso de haber dos núcleos de carbono en la asignación de una

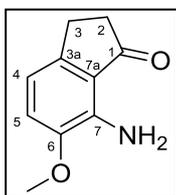
señal, esta corresponde al núcleo indicado en cursiva. Los análisis HPLC-MS se llevaron a cabo en un equipo Waters 12695, equipado con columnas de fase reversa, conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ, utilizando diferentes gradientes que serán indicados en cada caso. La columna utilizada fue Sunfire C₁₈ (2.1 x 50 mm, 3.5 μm). El flujo utilizado fue de 0.5 ml/min y se utilizaron diferentes gradientes de disolución al 0.1% de HCOOH en CH₃CN (disolvente A) y disolución al 0.1% de HCOOH en agua (disolvente B) como eluyentes. Se utilizó detección por espectrometría de masas con monitorización de temperatura con sensor transversal de IR. La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) fue realizada en un espectrómetro de masas Agilent 6520 Q-TOF con una fuente ESI en modo positivo. Los experimentos de irradiación de microondas fueron realizados en un reactor de microondas monomodo EmrysTM Synthesizer (Biotage AB).

Las rotaciones ópticas fueron determinadas en un polarímetro Perkin Elmer 141.

4.3. NUEVOS FLOURÓFOROS SOLVATOCRÓMICOS DERIVADOS DE QUINOLIMIDA

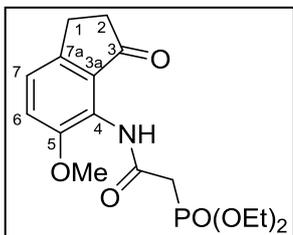
4.3.1. SÍNTESIS DE 9-METOXI-QUINOLIMIDAS

4.3.1.1. Síntesis de 7-amino-6-metoxi-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-ona¹⁷⁰ (**64**)



A una disolución de 6-metoxi-7-nitro-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-ona **63** (10 g, 48.3 mmol) en ácido acético (150 ml) se le añadió Fe⁰ polvo (10.8 g, 193 mmol) y la mezcla se agitó a 70°C durante 2 horas. La reacción se dejó enfriar, formándose un precipitado, que se filtró y el sobrenadante, se evaporó a sequedad. El crudo de reacción se disolvió en AcOEt (300 ml) y la disolución resultante se lavó con agua (100 ml) y salmuera (100 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó hasta sequedad, obteniendo el derivado deseado **64** (8.8 g, 100%) como un sólido marrón. Pf: 64 °C. Este compuesto se usó en el siguiente paso sin purificación adicional. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) *t_R* = 3.08 min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 2.65 (m, 2H, 2-H), 2.98 (m, 2H, 3-H), 3.85 (s, 3H, OMe), 5.68 (sa, 2H, NH₂), 6.58 (dd, 1H, *J* = 8 y 1 Hz, 4-H), 6.91 (dd, 1H, *J* = 8 y 1 Hz, 5-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 24.8 (C₃), 37.1 (C₂), 56.2 (C_{OMe}), 112.0 (C₄), 116.3 (C₅), 120.4 (C_{7a}), 137.5 (C₇), 144.6 (C₆), 146.7 (C_{3a}), 208.1 (C₁). HRMS (ESI) *m/z*. Calcd. para C₁₀H₁₁NO₂ ([M+H]⁺): 178.0790, Encd: 178.0788.

4.3.1.2. Síntesis de (2-((5-metoxi-3-oxo-2,3-dihidro-1H-inden-4-il)amino)-2-oxoetil) fosfonato de dietilo¹⁷⁰ (65)



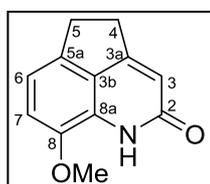
A una disolución de **64** (8.8 g, 49.7 mmol) y ácido dietilfosfonoacético (8.8 ml, 54.6 mmol) en CH₂Cl₂ seco (300 ml), se añadió HATU (22.7 g, 59.6 mmol) y DIPEA (21.6 ml, 124 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de este período, la transformación fué incompleta, entonces se añadió más ácido dietilfosfonoacético (4.0 ml, 24 mmol), HATU (9.4 g, 29.4 mmol) y DIPEA (4.3 ml, 29.4 mmol). La mezcla se agitó 2 horas más y se lavó sucesivamente con HCl 0.2 N (100 ml), NaOH 0.2 N (100 ml), agua (100 ml) y salmuera (100 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía flash, usando gradiente 0-20% de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente, para obtener el producto deseado **65** (16.0 g, 76 %) como un sólido amarillo pálido. Pf: 113 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) *t_R* = 1.30 min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.29 [t, 6H, *J* = 7 Hz, CH₃(OEt)], 2.60 (m, 2H, 2-H), 2.95 (m, 2H, 1-H), 3.03 [d, 2H, *J* = 21 Hz, CH₂P(OEt)₂], 3.80 (s, 3H, OMe), 4.16 [m, 4H, CH₂(OEt)], 7.12 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 6-H), 7.18 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 7-H), 8.75 (br s, 1H, NH). ¹³C-RMN (Cl₃CD, 100 MHz) δ: 16.0 y 16.1 [CH₃(OEt)], 24.1 (C₁), 35.3 [d, *J* = 131 Hz, [CH₂P(OEt)₂], 37.0 (C₂), 56.2 (C_{OMe}), 62.3 y 62.4 [CH₂(OEt)], 118.6 (C₆), 122.2 (C₄), 123.8 (C₇), 130.3 (C_{3a}), 146.5 (C_{7a}), 151.6 (C₅), 162.1 (d, *J* = 4 Hz, CONH), 204.7 (C₃). HRMS (ESI) *m/z*. Calcd. para C₁₆H₂₂NO₆P ([M+H]⁺): 356.1185, Encd: 356.1193.

4.3.1.3. Síntesis de las quinolinonas 66, 67, 69 y 71 y las quinolinas 68 y 70.

Método A: A una disolución de **65** (1.0 g, 2.8 mmol) en DMF seca (18 ml) se añadió NaH (94 mg, 2.8 mmol) y la mezcla se calentó a 180°C mediante irradiación por MW durante 5 minutos. A continuación, el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (20 ml) y la disolución se lavó con H₂O (5 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó hasta sequedad. El crudo de a reacción se purificó por cromatografía flash, usando gradiente 0-5 % de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente, para obtener las quinolinonas **66** (203 mg, 36 %) y **67** (341mg, 36 %), conjuntamente con trazas (menos del 5%) de **69**, **71** y de las quinolinas **68** y **70**.

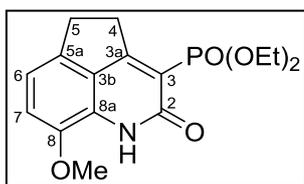
Método B: A una disolución de **65** (54 mg, 0.15 mmol) en THF seco (3 ml), se añadieron LiCl (19 mg, 0.45 mmol) y DBU (68 μ L, 0.45 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Después, el disolvente, se evaporó y el crudo de reacción se disolvió en CH₂Cl₂ (20 ml). La disolución resultante se lavó con H₂O (5 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía flash, usando gradiente 0-5 % de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente, obteniendo la quinolinona **67** como único producto (50 mg, 100%).

4.3.1.3.1. 8-Metoxi-4,5-dihidrociclopenta[de]quinolin-2(1H)-ona¹⁷⁰ (**66**) (Método A)



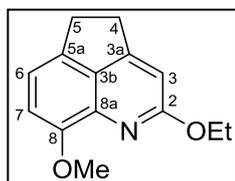
Sólido blanco. Pf: 275 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 1.86$ min. ¹H-RMN (CD₃OD/CDCl₃ 1:1, 500 MHz) δ : 3.25 (m, 4H, 4-H y 5-H), 3.95 (s, 3H, OMe), 6.37 (s, 1H, 3-H), 7.04 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 7-H), 7.08 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 6-H), 7.76 (s, 1H, NH). ¹³C-RMN (CD₃OD/CDCl₃ 1:1, 125 MHz) δ : 30.7 (C₅), 31.2 (C₄), 56.7 (C_{OMe}), 113.8 (C₃), 114.2 (C₇), 118.6 (C₆), 126.2 (C_{8a}), 128.5 (C_{3b}), 138.2 (C_{5a}), 145.2 (C₈), 162.7 (C₂), 167.1 (C_{3a}). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para C₁₂H₁₁NO₂ ([M+H]⁺): 202.0790, Encd: 202.0792.

4.3.1.3.2. Síntesis de (8-metoxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quino-lin-3-il)-fosfonato de dietilo (**67**) (Método B)



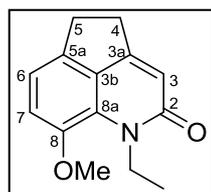
Sólido amarillo. Pf: 210 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 2.31$ min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.34 [t, 6H, $J = 7$ Hz, CH₃(OEt)], 3.19 (t, 2H, $J = 5.5$ Hz, 5-H), 3.55 (m, 2H, 4-H), 3.91 (s, 3H, OMe), 4.24 [m, 4H, CH₂(OEt)], 6.96 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 6-H), 7.00 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 7-H), 9.04 (br s, 1H, NH). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ : 16.5 y 16.6 [CH₃(OEt)], 30.2 (C₅), 33.8 (C₄), 56.5 (C_{OMe}), 62.5 y 62.6 [CH₂(OEt)], 114.3 (d, $J = 197$ Hz, C₃), 114.9 (C₇), 117.3 (C₆), 126.6 (d, $J = 16.5$ Hz, C_{3b}), 126.7 (C_{8a}), 139.2 (C_{5a}), 143.2 (C₈), 162.5 (d, $J = 14$ Hz, C₂), 171.1 (d, $J = 9$ Hz, C_{3a}). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para C₁₆H₂₀NO₅P ([M+H]⁺): 338.1079, Encd: 338.1085.

4.3.1.3.3. Síntesis de 2-etoxi-8-metoxi-4,5-dihidrociclo-penta[de]quinolina (**68**) (Método A)



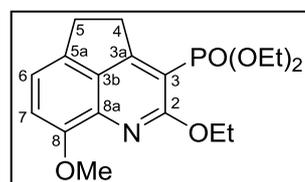
(15 mg, 0.8 %). Sólido amarillo. Pf: 75 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 4.72$ min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.43 [t, 3H, $J = 7$, $\text{CH}_3(\text{OEt})$], 3.31 (m, 4H, 4-H y 5-H), 4.04 (s, 3H, OMe), 4.57 [c, 2H, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_2(\text{OEt})$], 6.68 (s, 1H, 3-H), 6.99 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 7-H), 7.09 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 6-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 14.8 [$\text{CH}_3(2\text{-OEt})$], 29.8 (C_5), 30.9 (C_4), 56.7 (C_{OMe}), 62.1 [$\text{CH}_2(\text{OEt})$], 107.4 (C_3), 111.5 (C_7), 117.7 (C_6), 133.1 (C_{3b}), 135.3 (C_{8a}), 137.1 (C_{5a}), 151.3 (C_8), 158.3 (C_{3a}), 164.4 (C_2). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 230.1103, Encd: 230.1106.

4.3.1.3.4. Síntesis de 1-etil-8-metoxi-4,5-dihidrociclopenta[de]quinolin-2(1H)-ona (**69**) (Método A)



(8 mg, 0.4 %). Sólido marrón. Pf: 88 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 4.32$ min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.32 [t, 3H, $J = 7$, $\text{CH}_3(1\text{-Et})$], 3.16 (m, 4H, 4-H y 5-H), 3.92 (s, 3H, OMe), 4.61 [c, 2H, $J = 7$, $\text{CH}_2(1\text{-Et})$], 6.48 (s, 1H, 3-H), 6.98 (d, 1H, $J = 8$, 6-H), 7.03 (d, 1H, $J = 8$, 7-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 15.3 [$\text{CH}_3(1\text{-Et})$], 29.6 (C_5), 29.7 (C_4), 40.5 [$\text{CH}_2(1\text{-Et})$], 57.1 (C_{OMe}), 114.4 (C_3), 115.6 (C_7), 117.6 (C_6), 127.7 (C_{8a}), 128.9 (C_{3b}), 138.6 (C_{5a}), 145.6 (C_8), 157.8 (C_{3a}), 164.6 (C_2). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 230.1105, Encd: 230.1103.

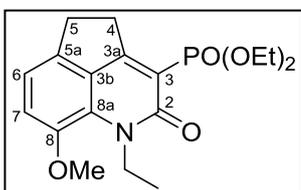
4.3.1.3.5. Síntesis de (2-etoxi-8-metoxi-4,5-dihidrociclopenta[de]quinolin-3-il)-fos-fonato de dietilo (**70**) (Método A)



(20 mg, 1 %). Sólido amarillo. Pf: 79 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 4.43$ min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.30 [t, 3H, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3(2\text{-OEt})$], 1.35 [t, 6H, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3[\text{PO}(\text{OEt}_2)]$], 3.14 (t, 2H, $J = 6$ Hz, 5-H), 3.52 (m, 2H, 4-H), 3.91 (s, 3H, OMe), 4.27 [m, 4H, $\text{CH}_2[\text{PO}(\text{OEt}_2)]$], 4.57 [c, 2H, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_2(2\text{-OEt})$], 7.01 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 6-H), 7.11 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 7-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 15.1 [$\text{CH}_3(2\text{-OEt})$], 16.6 y 16.7 [$\text{CH}_3\text{PO}(\text{OEt}_2)$], 29.5

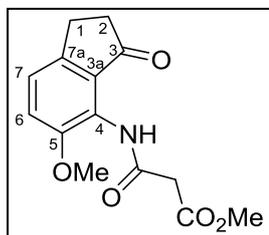
(C₅), 32.8 (d, $J = 2$ Hz, C₄), 40.8 [CH₂[PO(OEt)₂]], 57.1 (C_{OMe}), 62.5 y 62.6 [CH₂[PO(OEt)₂]], 114.19 (d, $J = 200$ Hz, C₃), 117.7 (C₇), 117.8 (C₆), 127.9 (d, $J = 16.5$ Hz, C_{3b}), 128.9 (d, $J = 2$ Hz, C_{8a}), 140.8 (C_{5a}), 145.1 (C₈), 162.5 (d, $J = 13.5$ Hz, C₂), 168.35 (d, $J = 9$ Hz, C_{3a}). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para C₁₈H₂₄NO₅P ([M+H]⁺): 366.1392, Encd: 366.1392.

4.3.1.3.6. Síntesis de (1-etil-8-metoxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quino-lin-3-il)fosfonato de dietilo (**71**) (Método A)



(10 mg, 0.5 %). Sólido marrón. Pf: 110 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 5.08$ min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.34 [t, 6H, $J = 7$, CH₃(OEt)], 1.46 [t, 3H, $J = 7$ Hz, CH₃(1-Et)], 3.27 (m, 2H, 5-H), 3.66 (m, 2H, 4-H), 4.03 (s, 3H, OMe), 4.06-4.32 [m, 4H, CH₂(OEt)], 4.64 [c, 2H, $J = 7$ Hz, CH₂(1-Et)], 7.09 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 7-H), 7.14 (dd, 1H, $J = 7.5$ y 0.5 Hz, 6-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ : 14.6 [CH₃(1-Et)], 16.5 y 16.6 [CH₃(OEt)], 29.9 (C₅), 34.0 (C₄), 56.9 (C_{OMe}), 62.2 y 62.3 [CH₂(OEt)], 62.9 [CH₂(1-Et)], 107.8 (d, $J = 191$ Hz, C₃), 114.1 (C₇), 118.3 (C₆), 132.29 (d, $J = 13$ Hz, C_{3b}), 136.4 (C_{8a}), 138.9 (C_{5a}), 151.0 (C₈), 163.0 (d, $J = 7$ Hz, C₂), 168.2 (d, $J = 8.5$ Hz, C_{3a}). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para C₁₈H₂₄NO₅P ([M+H]⁺): 366.1392, Encd: 366.1399.

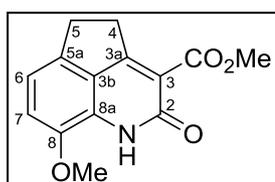
4.3.1.4. Síntesis de 3-[(5-metoxi-3-oxo-2,3-dihidro-1H-inden-4-il)amino]-3-oxopropionato de metilo (**72**)



A una disolución de 7-amino-6-metoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona **64** (830 mg, 4.68 mmol) en CH₂Cl₂ seco (8 ml), se añadió 3-cloro-3-oxopropionato de metilo (750 μ L, 7.02 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El crudo de reacción se evaporó a presión reducida. El residuo se redisolvió en CH₂Cl₂ (300 ml) y la disolución se lavó con H₂O (100 ml) y salmuera (100 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó hasta sequedad, para obtener el compuesto deseado **72** (1.290 mg, 100 %) como un sólido marrón. Pf: 138 °C.

HPLC-MS (30-95% gradiente de A en B, 10 min) $t_R = 1.21$ min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 2.62 (m, 2H, 2-H), 2.96 (m, 2H, 1-H), 3.49 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{Me}$), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.82 (s, 3H, CO_2Me), 7.14 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 6-H), 7.19 (dt, 1H, $J = 8.5$ y 1 Hz, 7-H), 9.16 (s, 1H, NH). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 24.5 (C_1), 37.8 ($\text{CH}_2\text{-CO}_2\text{Me}$), 41.7 (C_2), 52.5 (C_{OMe}), 56.7 ($\text{C}_{\text{CO}_2\text{Me}}$), 119.2 (C_6), 122.6 (C_{3a}), 124.1 (C_7), 130.4 (C_4), 147.0 (C_{7a}), 152.0 (C_5), 163.2 (CONH), 169.3 ($\text{C}_{\text{CO}_2\text{Me}}$), 205.8 (C_3). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 278.0950, Encd: 278.1027.

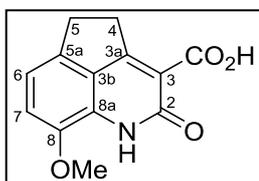
4.3.1.5. Síntesis de 8-metoxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxilato de metilo (73)



A una disolución de **72** (1.290 g, 4.65 mmol) en MeOH (8 ml) se añadió K_2CO_3 (707 mg, 5.12 mmol) y se calentó a 70 °C mediante irradiación de MW durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió y se evaporó hasta sequedad. Después, el crudo de reacción se disolvió en CH_2Cl_2 (300 ml), la disolución se lavó sucesivamente con H_2O (100 ml), salmuera (100 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó a presión reducida, para obtener el producto deseado **73** (1.185 g, 100%) como un sólido amarillo, utilizándose el compuesto en el siguiente paso sin purificación adicional. Pf: 236 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 2.21$ min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 3.18 (m, 2H, 5-H), 3.46 (m, 2H, 4-H), 3.87 (s, 6H, OMe), 6.93 (dt, 1H, $J = 8$ y 1 Hz, 6-H), 6.96 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 7-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 30.4 (C_5), 33.5 (C_4), 52.2 (C_{OMe}), 56.4 ($\text{C}_{\text{CO}_2\text{Me}}$), 114.8 (C_7), 116.6 (C_3), 117.4 (C_6), 126.4 (C_{3b}), 126.6 (C_{8a}), 139.3 (C_{5a}), 143.2 (C_8), 161.2 (C_2), 165.8 ($\text{C}_{\text{CO}_2\text{Me}}$), 167.1 (C_{3a}). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 260.0844, Encd: 260.0923.

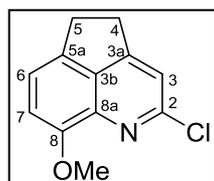
4.3.1.6. Síntesis del ácido 8-metoxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta-[de]-quinolina-3-carboxílico (74)

73 (50 mg, 0.193 mmol) se disolvió en una disolución de NaOH 2N (5 ml) y la mezcla se agitó a reflujo durante 3 horas. A continuación, la disolución se enfrió a temperatura ambiente y se añadió AcOEt (50 ml) y disolución 2 N de HCL hasta pH=2.



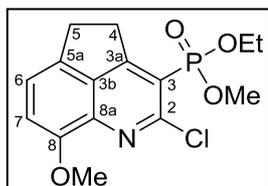
La mezcla resultante se extrajo con AcOEt (3×100 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a sequedad, para obtener **74** (47 mg, 100 %) como un sólido marrón. Pf: 236 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 2.4 min. ¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 3.15 (m, 2H, 5-H), 3.51 (m, 2H, 4-H), 3.85 (s, 3H, OMe), 6.93 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, 6-H), 6.98 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, 7-H). ¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ: 29.3 (C₅), 32.5 (C₄), 55.5 (C_{OMe}), 112.0 (C₇), 114.7 (C₆), 116.4 (C₃), 130.9 (C_{3b}), 136.3 (C_{8a}), 137.8 (C_{5a}), 149.6 (C₈), 167.6 (C₂), 169.4 (CO₂H), 174.0 (C_{3a}). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₃H₁₁NO₄ ([M+H]⁺): 246.0694, encontrada: 246.0767.

4.3.1.7. Síntesis de 2-cloro-8-metoxi-4,5-dihidrociclopenta[de]quinolina¹⁷⁰ (**75**)



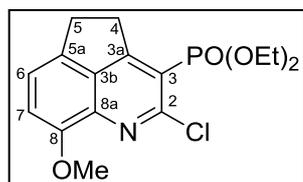
Una disolución de la dihidrociclopenta[de]quinolin-2(1*H*)-ona **66** (1.8 g, 8.9 mmol) se disolvió en POCl₃ (30 ml, 322 mmol). La disolución se agitó a 110 °C durante 45 minutos. A continuación, el disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se disolvió en CH₂Cl₂ (100 ml). La disolución resultante se lavó sucesivamente con NaOH 1N (50 ml), agua (50 ml) y salmuera (50 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía flash, usando un gradiente 0-3% de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente, obteniendo el compuesto deseado **75** (1.9 g, 100%) como un sólido blanco. Pf: 135 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 5.15 min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 3.13-3.56 (m, 4H, 4-H y 5-H), 4.01 (s, 3H, OMe), 7.01 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 7-H), 7.16 (s, 1H, 3-H), 7.22 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 6-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 29.5 (C₅), 31.1 (C₄), 56.1 (C_{OMe}), 111.0 (C₇), 117.3 (C₃), 120.4 (C₆), 134.6 (C_{3b}), 136.7 (C_{8a} y C_{5a}), 151.6 (C₂), 151.7 (C₈), 159.1 (C_{3a}). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₂H₁₀NOCl ([M+H]⁺): 220.0451, Encd: 220.0445.

4.3.1.8. Síntesis de (2-cloro-8-metoxi-4,5-dihidrociclopenta-[de]-quinolin-3-il)fosfato de etilo y metilo (79)



Una disolución de la dihidrociclopenta[de]quinolin-2(1*H*)-ona **76** (100 mg, 0.3 mmol) en POCl₃ (1.2 ml, 13 mmol) se agitó a 110 °C durante 45 minutos. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida y se disolvió en CH₂Cl₂ (100 ml). La disolución se lavó con NaOH 1N (50 ml), H₂O (50 ml) y salmuera (50 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash, utilizando gradiente 0-4 % de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente, para obtener el compuesto deseado **79** (14 mg, 14 %) como un sólido blanco. Pf: 88 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) *t_R* = 3.44 min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.37 [t, 3H, *J* = 7 Hz, CH₃PO(OEt)], 3.33 (m, 2H, 5-H), 3.77-3.81 (m, 2H, 4-H), 3.84 [s, 3H, CH₃PO(OMe)], 4.04 (s, 3H, OMe), 4.21 [m, 2H, CH₂ PO(OEt)], 7.17 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 7-H), 7.34 (dd, 1H, *J* = 8 y 1.5 Hz, 6-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 16.4 [CH₃PO(OEt)], 29.8 (C₅), 35.1 (C₄), 52.8 [CH₃PO(OMe)], 56.4 (C_{OMe}), 62.8, 62.9 [CH₂PO(OEt)], 113.6 (C₇), 116.4 (d, *J* = 196 Hz, C₃), 121.6 (C₆), 134.0 (d, *J* = 12.5 Hz, C_{3a}), 137.2 (C_{8a}), 138.6 (C₅), 151.3 (d, *J* = 9 Hz, C₂), 151.6 (C₈), 169.6 (d, *J* = 9.5 Hz, C₄). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₅H₁₇NO₄ClP ([M+H]⁺): 341.0584, Encd: 341.0591.

4.3.1.9. Síntesis de (2-cloro-8-metoxi-4,5-dihidrociclopenta[de]quinolin-3-il)fosfato de dietilo (80)



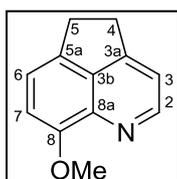
Una disolución de la dihidrociclopenta[de]quinolin-2(1*H*)-ona **76** (2.8 g, 8.3 mmol) en POCl₃ (28 ml, 300 mmol) se agitó a 110°C durante 45 minutos. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se agitó en EtOH (20 ml) a temperatura ambiente durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, se volvió a evaporar el disolvente y el crudo de reacción se purificó por cromatografía flash, usando gradiente 0-7% de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente, para obtener el compuesto deseado **80** (2.8 g, 96 %) como un sólido amarillo. Pf: 133 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) *t_R* = 4.19 min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.35 [t, 6H, *J* = 7, 2 x CH₃(OEt)], 3.33 (m, 2H, 5-H), 3.79 (m, 2H, 4-H), 4.03 (s, 3H, OMe), 4.04-4.35 [m, 4H,

CH₂(OEt)], 7.15 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 7-H), 7.33 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 6-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 16.4 y 16.5 [CH₃(OEt)], 29.8 (C₅), 35.1 (C₄), 56.4 (C_{OMe}), 62.6 y 62.7 [CH₂(OEt)], 113.5 (C₇), 117.0 (d, *J* = 195 Hz, C₃) 121.6 (C₆), 134.1 (d, *J* = 12 Hz, C_{3b}), 137.1 (C_{8a}), 138.6 (C_{5a}), 151.5 (d, *J* = 12 Hz, C₂), 151.6 (C₈), 169.3 (d, *J* = 9.5 Hz, C_{3a}). HRMS (ESI) *m/z*. Calcd. para C₁₆H₁₉NO₄PCl ([M+H]⁺): 356.0740, Encd: 356.0737.

4.3.1.10. Procedimiento general para la síntesis de 8-metoxi-4,5-dihidro-ciclopenta[de]quinolina (77) y (8-metoxi-4,5-dihidrociclopenta[de]quinolin-3-il)fosfo-nato de dietilo (78)

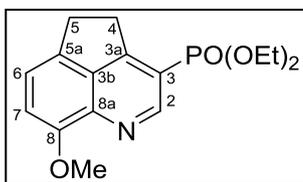
A una disolución de la correspondiente 2-cloroquinolina (75 u 80) (4.5 mmol) en MeOH (20 ml), se añadió Pd(C) (10% w/w) y la suspensión resultante se hidrogenó a temperatura ambiente (20 psi de H₂) durante 6 horas. A continuación, se filtró el catalizador, se evaporó el disolvente y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash, usando gradiente 0-10% de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente, para obtener los productos deseados 77 y 78.

4.3.1.10.1. Síntesis de 8-metoxi-4,5-dihidrociclopenta[de]quinolina¹⁷⁰ (77)



Se siguió el procedimiento general usando 75 (857 mg, 3.9 mmol) para obtener 77 (720 mg, 100 %) como un sólido marrón. Pf: 160 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) *t_R* = 0.46 min. ¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ: 3.55 (m, 2H, 5-H), 3.76 (m, 2H, 4-H), 4.18 (s, 3H, OMe), 7.64 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 7-H), 7.71 (d, 1H, *J* = 8 Hz, 6-H), 7.90 (d, 1H, *J* = 6 Hz, 3-H), 8.92 (d, 1H, *J* = 6 Hz, 2-H). ¹³C-RMN (CD₃OD, 100 MHz) δ: 30.8 (C₅), 34.6 (C₄), 57.6 (C_{OMe}), 117.1 (C₇), 118.1 (C₃), 125.3 (C₆), 128.0 (C_{8a}), 137.6 (C_{3b}), 140.8 (C_{5a}), 146.0 (C₂), 148.3 (C₈), 172.2 (C_{3a}). HRMS (ESI) *m/z*. Calcd. para C₁₂H₁₁NO ([M+H]⁺): 186.0841, Encd: 186.0843.

4.3.1.10.2. Síntesis de (8-metoxi-4,5-dihidrociclopenta[de]quinolin-3-il)fosfonato de dietilo (78)



Se siguió el procedimiento general usando **80** (925 mg, 2.6 mmol), para obtener el producto deseado **78** (835 mg, 100 %) como un sólido marrón. Pf: 82 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95 % de A en B, 10 min) $t_R = 2.25$ min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.34 [t, 6H, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3(\text{OEt})$], 3.36 (m, 2H, 5-H), 3.66 (m, 2H, 4-H), 4.07 (s, 3H, OMe), 4.07-4.25 [m, 4H, $\text{CH}_2(\text{OEt})$], 7.15 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 7-H), 7.35 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 6-H), 9.06 (d, 1H, $J = 5$ Hz, 2-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 16.4 y 16.5 [$\text{CH}_3(\text{OEt})$], 29.4 (C_5), 33.0 (C_4), 56.4 (C_{OMe}), 62.3 y 62.4 [$\text{CH}_2(\text{OEt})$], 112.4 (C_7), 116.9 (d, $J = 190$ Hz, C_3), 121.1 (C_6), 134.7 (d, $J = 13$ Hz, C_{3b}), 138.5 (C_{5a}), 139.0 (C_{8a}), 151.8 (d, $J = 15$ Hz, C_2), 152.5 (C_8), 163.2 (d, $J = 9$ Hz, C_{3a}). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_4\text{P}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 322.1130, Encd: 322.1133.

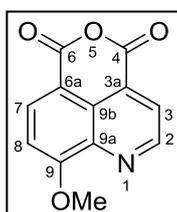
4.3.1.11. **Procedimiento general para la oxidación de las 8-metoxi-4,5-dihidrociclopenta[de]quinolinas 75, 77, 78 y 80. Síntesis de los correspondientes anhídridos 85-88.**

Método A: La correspondiente 8-metoxi-4,5-dihidropenta[de]quinolina (**75**, **77**, **78** y **80**) (0.5 mmol) se disolvió en anhídrido acético (3 ml) y se calentó a 110 °C. A continuación, se añadió cuidadosamente CrO_3 (4.0 mmol) y se agitó durante 30 minutos. Una vez pasado este tiempo, la disolución se volvió de un color verde y se agitó a 110°C durante 30 minutos más. A continuación, se añadió HCl concentrado (0.5 ml) y se extrajo el crudo con CH_2Cl_2 (3 x 50 ml). La fase orgánica resultante se lavó sucesivamente con H_2O (5 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó a sequedad, para obtener los correspondientes anhídridos **85-88**, los cuales fueron utilizados en el siguiente paso sin purificación adicional.

Método B: La correspondiente 8-metoxi-4,5-dihidropenta[de]quinolina (**75**, **77**, **78** y **80**) (0.5 mmol) se disolvió en una mezcla 5:1 de anhídrido acético/ácido acético (3 ml) a 110 °C. A la disolución, se añadió cuidadosamente CrO_3 (4.0 mmol) y se agitó durante 30 minutos. Se formó una disolución verde que se agitó a 110 °C durante 30 minutos más. A

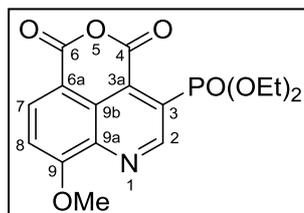
continuación, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó el disolvente. El crudo se disolvió en CH₂Cl₂ (25 ml) y se agitó a 40 °C durante 10 minutos. La suspensión verde resultante, se filtró a través de Clarcel® y se evaporó a presión reducida, para obtener los correspondientes **85-88**, los cuales fueron utilizados en el siguiente paso sin purificación adicional.

4.3.1.11.1. Síntesis de 9-metoxi-4*H*,6*H*-pirano[3,4,5-*de*]quinolina-4,6-diona (**85**)



A partir de **77** (56 mg, 0.30 mmol). Sólido naranja (Método A: 40 %; Método B: 89 %). HPLC-MS (gradiente 30-95 % de A en B, 10 min) $t_R = 1.68$ min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ : 4.27 (s, 3H, OMe), 7.37 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 8.38 (d, 1H, $J = 4$ Hz, 3-H), 8.66 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H), 9.30 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 2-H). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para C₁₂H₇NO₄ ([M+H]⁺): 230.0375, Encd: 230.0368.

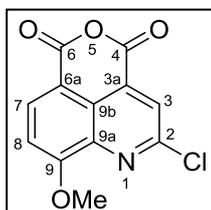
4.3.1.11.2. Síntesis de (9-metoxi-4,6-dioxo-4*H*,6*H*-pirano[3,4,5-*de*]quinolin-3-il)fosfo-nato de dietilo (**86**)



A partir de **78** (36 mg, 0.11 mmol). Sólido naranja (Método A: 51 %; Método B: 91 %). HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 2.19$ min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.43 [t, 6H, $J = 7$ Hz, CH₃(OEt)], 4.28 (s, 3H, OMe), 4.37-4.56 [m, 6H, CH₂(OEt)], 7.42 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 8-H), 8.70 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 7-H), 9.72 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, 2-H). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para C₁₆H₁₆NO₇P ([M+H]⁺): 366.0664, Encd: 366.0671.

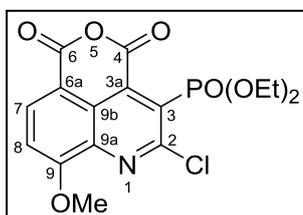
4.3.1.11.3. Síntesis de 2-cloro-9-metoxi-4*H*,6*H*-pirano[3,4,5-*de*]quinolina-4,6-diona (**87**)

A partir de **75** (92 mg, 0.42 mmol). Sólido naranja (Método A: 59 %; Método B: 93 %). HPLC-MS (gradient 30-95 % de A en B, 10 min) $t_R = 3.66$ min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ : 4.24 (s, 3H, OMe), 7.39 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 8-H), 8.34 (s, 1H, 3-H), 8.62 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 7-H).



HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $C_{12}H_6NO_4Cl$ ($[M+H]^+$): 263.9985, Encd: 263.9996.

4.3.1.11.4. Síntesis de (2-cloro-9-metoxi-4,6-dioxo-4*H*,6*H*-pirano[3,4,5-*de*]quinolin-3-il)fosfonato de dietilo (**88**)



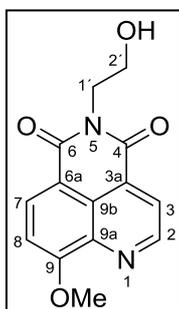
A partir de **78** (61 mg, 0.17 mmol). Sólido naranja (Método A: 42 %; Método B: 90 %). HPLC-MS (gradiente 30-95 % de A en B, 10 min) t_R = 3.39 min. 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 1.40 [t, 6H, J = 7 Hz, $CH_3(OEt)$], 4.24 (s, 3H, OMe), 4.27-4.43 [m, 6H, $CH_2(OEt)$], 7.41 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 8-H), 8.62 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 7-H). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $C_{16}H_{15}NO_7PCl$ ($[M+H]^+$): 400.0275, Encd: 400.0259.

4.3.1.12. Procedimiento general para la síntesis de las imidas 90-95

La correspondiente amina (2-aminoetanol, *N*-butilamina, *N*-boc-etilendiamina, *N,N*-dimetiletilenamina, 0.24 mmol) se añadió a una disolución del correspondiente anhídrido (**85-88**) (0.22 mmol) en EtOH seco (3 ml) y la mezcla se calentó a 120°C en MW durante 1.5 horas. A continuación, se evaporó el disolvente y el crudo de la reacción se purificó mediante cromatografía flash, usando gradiente 5-25% de MeOH en CH_2Cl_2 como eluyente, para dar las imidas deseadas **90-98**.

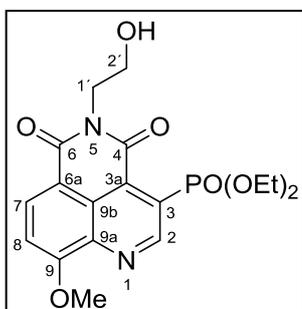
4.3.1.12.1. Síntesis de 5-(2-hidroxietil)-9-metoxi-4*H*-benzo[*de*][2,6]naftiridina-4,6-(5*H*)-diona (**90**)

A partir de **85** (40 mg, 0.17 mmol). Sólido amarillo (31 mg, 67 %). Pf: 231°C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 0.81 min. 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 3.97 (t, 2H, J = 5 Hz, 2'-H), 4.21 (s, 3H, OMe), 4.41 (t, 2H, J = 5 Hz, 1'-H), 7.23 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 8-H), 8.27 (d, 1H, J = 4 Hz, 3-H), 8.53 (d, 1H, J = 8 Hz, 7-H), 9.16 (d, 1H, J = 4 Hz, 2-H).



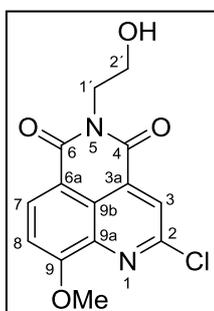
^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 42.9 ($\text{C}_{1'}$), 57.0 (C_{OMe}), 61.5 (C_2), 108.9 (C_8), 114.3 (C_{6a}), 123.2 (C_3), 124.0 (C_{9b}), 129.5 (C_{3a}), 133.8 (C_7), 138.9 (C_{9a}), 150.5 (C_2), 160.8 (C_9), 163.6 (C_6), 164.1 (C_4). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 273.0797, Encd: 273.0797.

4.3.1.12.2. Síntesis de (5-(2-hidroxietil)-9-metoxi-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4H-benzo[de]-[2,6]-naftiridina-3-il)fosfonato de dietilo (**91**)



A partir de **86** (27 mg, 0.073 mmol). Sólido amarillo (14 mg, 47 %). Pf: 174 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 1.17 min. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.30 [t, 6H, J = 7 Hz, $\text{CH}_3(\text{OEt})$], 3.85 (t, 2H, J = 5.5 Hz, 2'-H), 4.11 (s, 3H, OMe), 4.18-4.44 [m, 6H, 1'-H y $\text{CH}_2(\text{OEt})$], 7.23 (d, 1H, J = 8 Hz, 8-H), 8.53 (d, 1H, J = 8 Hz, 7-H), 9.52 (d, 1H, J = 5 Hz, 2-H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 15.4 [$\text{CH}_3(\text{OEt})$], 42.0 ($\text{C}_{1'}$), 56.0 (C_{OMe}), 60.1 (C_2), 62.7 [$\text{CH}_2(\text{OEt})$], 108.9 (C_8), 113.4 (C_{6a}), 122.5 (d, J = 11 Hz, C_{9b}), 124.5 (d, J = 190 Hz, C_3), 132.1 (d, J = 5.5 Hz, C_{3a}), 133.5 (C_7), 139.6 (C_{9a}), 152.3 (d, J = 10 Hz, C_2), 159.6 (C_9), 161.6 (d, J = 5 Hz, C_4), 164.1 (C_6). HRMS (ESI) m/z : Calcd para $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}$ ($[\text{M}+1]^+$): 409.1086, Encd: 409.1099.

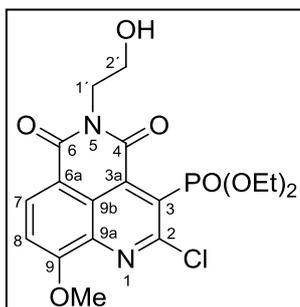
4.3.1.12.3. Síntesis de 2-cloro-5-(2-hidroxietil)-9-metoxi-4H-benzo[de][2,6]naftiridina-4,6-(5H)-diona (**92**)



A partir de **87** (66 mg, 0.25 mmol). Sólido amarillo (52 mg, 68 %). Pf: 240 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 1.93 min. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 3.96 (t, 2H, J = 5 Hz, 2'-H), 4.20 (s, 3H, OMe), 4.41 (t, 2H, J = 5.0 Hz, 1'-H), 7.31 (d, 1H, J = 8 Hz, 8-H), 8.32 (s, 1H, 3-H), 8.56 (d, 1H, J = 8 Hz, 7-H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 43.0 ($\text{C}_{1'}$), 57.1 (C_{OMe}), 61.5 (C_2), 110.2 (C_8), 114.3 (C_{6a}), 123.1 (C_{9b}), 125.2 (C_3), 132.2 (C_{3a}), 133.7 (C_7), 138.6 (C_{9a}),

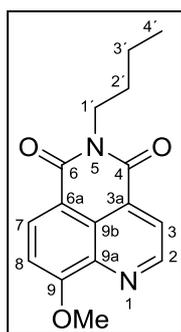
151.5 (C₂), 160.0 (C₉), 163.0 (C₄), 163.3 (C₆). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₄H₁₁N₂O₄Cl ([M+H]⁺): 307.0407, Encd: 307.0421.

4.3.1.12.4. Síntesis de (2-cloro-5-(2-hidroxietil)-9-metoxi-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4*H*-benzo[*de*][2,6]naftiridin-3-il)fosfonato de dietilo (**93**)



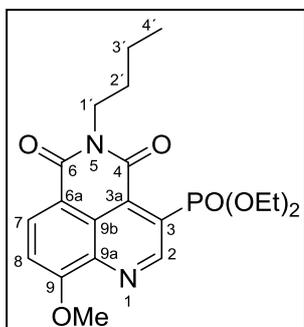
A partir de **88** (67 mg, 0.16 mmol). Sólido amarillo (35 mg, 49 %). Pf: 170 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) *t_R* = 2.08 min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.33 [t, 6H, *J* = 7 Hz, CH₃(OEt)], 3.91 (t, 2H, *J* = 5 Hz, 2'-H), 4.14 (s, 3H, OMe), 4.16-4.33 [m, 4H, CH₂(OEt)], 4.34 (t, 2H, *J* = 5 Hz, 1'-H), 7.28 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 8-H), 8.51 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 7-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 16.4 [CH₃(OEt)], 16.5 [CH₃(OEt)], 43.6 (C_{1'}), 57.2 (C_{OMe}), 61.1 (C_{2'}), 64.0 y 64.1 [CH₂(OEt)], 111.2 (C₈), 114.4 (C_{6a}), 122.4 (d, *J* = 9 Hz, C_{9b}), 127.0 (d, *J* = 193.5 Hz, C₃), 133.8 (C₇), 138.6 (C_{9a}), 140.2 (d, *J* = 5 Hz, C_{3a}), 152.1 (d, *J* = 6 Hz, C₂), 159.2 (C₉), 162.5 (d, *J* = 5 Hz, C₄), 162.7 (C₆). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₈H₂₀N₂O₇PCl ([M+1]⁺): 443.0697, Encd: 443.0689.

4.3.1.12.5. Síntesis de 5-butil-9-metoxi-4*H*-benzo[*de*][2,6]-naftiridina-4,6-(5*H*)-diona- (**94**)



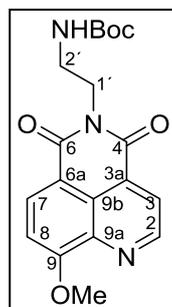
Desde **85** (84.4 mg, 0.37 mmol). Sólido amarillo (68 mg, 65 %). Pf: 122 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) *t_R* = 4.82 min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.90 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, 4'-H), 1.37 (m, 2H, 3'-H), 1.63 (m, 2H, 2'-H), 4.08 (m, 2H, 1'-H), 4.15 (s, 3H, OMe), 7.20 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 8-H), 8.26 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, 3-H), 8.50 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 7-H), 9.14 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, 2-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 13.9 (C_{4'}), 20.5 (C_{3'}), 30.3 (C_{2'}), 40.5 (C_{1'}), 56.9 (OCH₃), 108.8 (C₈), 114.8 (C_{6a}), 123.0 (C₃), 124.1 (C_{9b}), 129.8 (C_{3a}), 133.4 (C₇), 138.9 (C_{9a}), 150.5 (C₂), 160.6 (C₉), 162.8 (C₆), 163.4 (C₄). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₆H₁₆N₂O₃ ([M+H]⁺): 285.1161, Encd: 285.1163.

4.3.1.12.6. Síntesis de (5-butil-9-metoxi-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4*H*-benzo-[*de*]-[2,6]-naftiridina-3-il)fosfonato de dietilo (**95**)



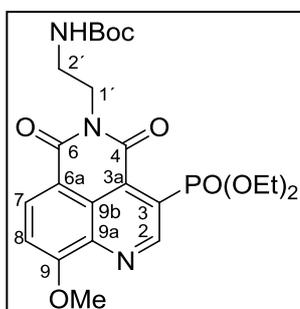
Desde **86** (76 mg, 0.21 mmol). Sólido amarillo (40 mg, 45 %).
 Pf: 124 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 4.67$ min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 0.90 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, 4'-H), 1.36 [t, 6H, $J = 7.5$ Hz, $\text{CH}_3(\text{OEt})$], 1.28-1.44 (m, 2H, 3'-H), 1.63 (m, 2H, 2'-H), 4.11 (m, 2H, 1'-H), 4.17 (s, 3H, OCH_3), 4.36 [p, 4H, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_2(\text{OEt})$], 7.28 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 8-H), 8.57 (d, 1H, $J = 8\text{Hz}$, 7-H), 9.59 (d, 1H, $J = 5$ Hz, 2-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 13.9 ($\text{C}_{4'}$), 16.5 y 16.6 [$\text{CH}_3(\text{OEt})$], 20.5 ($\text{C}_{3'}$), 30.2 ($\text{C}_{2'}$), 40.8 ($\text{C}_{1'}$), 57.1 (OCH_3), 63.8 y 63.8 [$\text{CH}_2(\text{OEt})$], 110.0(C_8), 114.9 (C_{6a}), 123.6 (d, $J = 11$ Hz, C_{9b}), 125.5 (d, $J = 189.5$ Hz, C_3), 133.55 (d, $J = 6$ Hz, C_{3a}), 134.2 (C_7), 140.6 (C_{9a}), 153.54 (d, $J = 10$ Hz, C_2), 160.3 (C_9), 161.9 (d, $J = 5$ Hz, C_4), 162.2 (C_6). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ ($[\text{M}+1]^+$): 421.1450, Encd: 421.1452.

4.3.1.12.7. Síntesis de 5-(2-boc-aminoetil)-9-metoxi-4*H*-benzo[*de*][2,6]naftiridin-4,6-(5*H*)-diona (**96**)



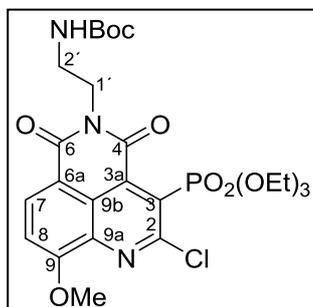
A una disolución del anhídrido **85** (30 mg, 0.13 mmol) en EtOH (3 ml), se le añadió *N*-Boc-etilendiamina (48 μL , 0.19 mmol) y la mezcla se agitó a 120 °C mediante irradiación por MW durante 1.5 horas. A continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente, formándose un precipitado, que se filtró y se secó durante toda la noche a vacío, obteniendo la quinolimida deseada **96** (35 mg, 81 %) como un sólido marrón. Pf: 215 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 3.35$ min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 1.20 (s, 9H, Boc), 3.47 (c, 2H, $J = 6$ Hz, 1'-H), 4.24 (s, 3H, OMe), 4.27 (t, 2H, $J = 6$ Hz, 2'-H), 4.88 (t, 1H, $J = 6$ Hz, NH), 7.21 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 8.27 (d, 1H, $J = 4$ Hz, 3-H), 8.52 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H), 9.14 (d, 1H, $J = 4$ Hz, 2-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (Cl_3CD , 125 MHz) δ : 28.5 (Boc), 39.7 ($\text{C}_{2'}$), 40.4 ($\text{C}_{1'}$), 57.2 (C_{OMe}), 79.5 (Boc), 109.5 (C_8), 114.7 (C_{6a}), 123.4 (C_3), 124.4 (C_{9b}), 129.8 (C_{3a}), 133.9 (C_7), 139.1 (C_{9a}), 150.7 (C_2), 156.4 [$\text{CO}(\text{Boc})$], 160.9 (C_9), 163.4 (C_4), 163.8 (C_6). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 372.1494, Encd: 372.1567.

4.3.1.12.8. Síntesis de (5-butiril-9-metoxi-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4*H*-benzo-[*de*]-[2,6]-naftiridin-3-il)fosfonato de dietilo (**97**)



A una disolución del anhídrido **86** (30 mg, 0.08 mmol) en EtOH seco (3 ml), se le añadió *N*-Boc-etilendiamina (16 μ L, 0.09 mmol) y se agitó a 120°C mediante irradiación por MW durante 1.5 horas. Después, el disolvente se evaporó y el crudo de la reacción se purificó mediante cromatografía flash, usando gradiente 1-15% de MeOH en CH_2Cl_2 como eluyente, obteniendo la imida deseada **97** como un sirupe amarillo (15 mg, 38 %). HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 3.78$ min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 1.26 (s, 9H, Boc), 1.32 – 1.39 (m, 2H, 2'-H), 1.43 [t, 6H, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3(\text{Et})$], 3.49 – 3.56 (m, 2H, 1'-H), 4.23 (s, 3H, OMe), 4.32 – 4.54 [m, 4H, $\text{CH}_2(\text{Et})$], 4.95 (s.a, 1H, NH), 7.34 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 8.65 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H), 9.66 (d, 1H, $J = 5$ Hz, 2-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 16.6 [d, $J = 6.5$ Hz, 2 x $\text{CH}_3(\text{Et})$], 28.3 (9 x $\text{C}_{\text{CH}_3\text{Boc}}$), 39.6 ($\text{C}_{1'}$), 40.4 ($\text{C}_{2'}$), 57.1 (C_{OMe}), 63.8 [d, $J = 6.5$ Hz, 2 x $\text{CH}_2(\text{Et})$], 79.3 (C_{Boc}), 110.0 (C_8), 114.6 (C_{6a}), 123.6 (d, $J = 10.5$ Hz, C_{9b}), 125.0 (C_3), 126.5 (C_7), 133.2 (d, $J = 6$ Hz, C_2), 134.5 (C_{9a}), 140.6 (C_{3a}), 153.6 (d, $J = 9.5$ Hz, C_2), 154.0 (C_9) 156.1 [$\text{CO}(\text{Boc})$], 160.5 (C_4), 162.4 (C_6). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_8\text{P}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 508.1860, Encd: 508.1876.

4.3.1.12.9. Síntesis de [5-(2-boc-aminoetil)-2-cloro-9-metoxi-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4*H*-benzo[*de*][2,6]naftiridin-3-il]fosfonato de dietilo (**98**)

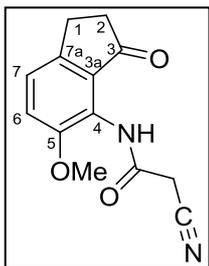


A una disolución del correspondiente anhídrido **88** (120 mg, 0.3 mmol) en EtOH seco (3 ml), se añadió *N*-Boc-etilendiamina (57 μ L, 0.36 mmol) y la reacción se calentó a 120°C mediante irradiación por MW durante 1.5 horas. A continuación, se evaporó el disolvente y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash, usando un gradiente 1-15 % de MeOH en CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener la correspondiente imida **98** (32 mg, 20 %) como un sirupe amarillo. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 4.68$ min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ :

1.24 (s, 9H, Boc), 1.33 [t, 6H, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3(\text{Et})$], 3.45 (m, 2H, 2'-H), 4.13 (s, 3H, OMe), 4.17-4.38 [m, 4H, 1'-H y $\text{CH}_2(\text{Et})$], 4.95 (m, 1H, *NHBoc*), 7.27 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 8.50 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 14.4 [d, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3(\text{Et})$], 26.2 (Boc), 37.4 ($\text{C}_{1'}$), 38.9 ($\text{C}_{2'}$), 55.0 (OMe), 77.2 (Boc), 109.0 (C_8), 112.3 (C_{6a}), 120.4 (d, $J = 9$ Hz, C_{9b}), 124.9 (d, $J = 193$ Hz, C_3), 131.6 (C_7), 136.4 (C_{9a}), 138.0 (d, $J = 5$ Hz, C_{3a}), 150.7 (d, $J = 6$ Hz, C_2), 154.0 [$\text{CO}(\text{Boc})$], 157.0 (C_9), 159.9 (d, $J = 5$ Hz, C_4), 160.2 (C_6). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{ClN}_3\text{O}_8\text{P}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 542.1453, Encd: 542.1457.

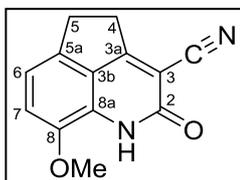
4.3.1.13. Síntesis de las 3-ciano-quinolimidas

4.3.1.13.1. Síntesis de 2-ciano-*N*-(5-metoxi-3-oxo-2,3-dihidro-1*H*-inden-4-il) acetamida (99)



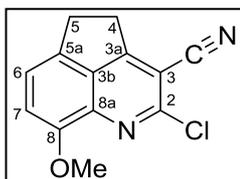
A una disolución de **64** (5.48 g, 30.71 mmol) y ácido cianoacético (2.87 g, 33.73 mmol) en CH_2Cl_2 (150 ml) se añadieron HATU (13.89 g, 36.51 mmol) y DIPEA (14.6 ml, 83.87 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 3 horas. Después de haber comprobado por TLC [CH_2Cl_2 :AcOEt (3:1)] que la reacción no había terminado del todo, se añadieron más HATU (6.95 g, 18.25 mmol) y DIPEA (7.30 ml, 41.90 mmol) y se dejó reaccionar toda la noche. A continuación, la mezcla se evaporó a sequedad, el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (400 ml) y la disolución se lavó sucesivamente con H_2O (100 ml), HCl 2 N (100 ml), NaOH 0.2 N (100 ml) y disolución saturada de NaCl (100 ml); se secó sobre MgSO_4 y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó en columna flash, utilizando como eluyente gradiente de AcOEt en hexano (0-100%). De esta forma se obtuvo **99** como sólido amarillo (6.67 g, 89%). P.f.: 196 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95 % de A en B durante 10 min) $t_R=1.56$ min. ^1H -RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.60 (t, $J = 6$ Hz, 2H, 1-H), 2.99 (t, $J = 6$ Hz, 2H, 2-H), 3.83 (m, 5H, O-Me + $\text{CH}_2\text{-CN}$), 7.42 (m, 2H, 7-H + 6-H), 9.78 (sa, 1H, NH). ^{13}C -RMN (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 23.8 (C_2), 25.4 ($\text{CH}_2\text{-CN}$), 37.1 (C_1), 56.4 (OMe), 115.9 (CN), 119.0 (C_6), 121.2 (C_5), 125.2 (C_7), 131.8 (C_{3a}), 147.0 (C_{7a}), 152.65 (C_5), 161.1 (CONH), 203.8 (C_3). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 244.0847, Encd: 244.0858.

4.3.1.13.2. Síntesis de 8-metoxi-2-oxo-1,2,4,5-tetrahidrociclopenta[de]quinolina-3-carbonitrilo (100)



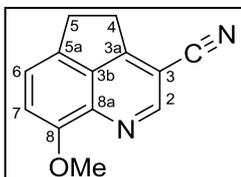
A una disolución de **99** (6.68 g, 27.34 mmol) en CH₃OH (250 ml) se le añadió K₂CO₃ (9.35 g, 67.64 mmol) y se calentó una hora a 70 °C. A continuación, se evaporó el disolvente y el residuo se disolvió en AcOEt (400 ml). La disolución se lavó con H₂O (2x50 ml), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó a sequedad para dar **100** como sólido de color marrón (7.67 g, 91%). P.f.: 240°C. HPLC-MS (gradiente 30-95 % de A en B durante 10 min) *t_R*= 5.18 min. ¹H-RMN (400MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.20 (m, 2H, 5-H), 3.30 – 3.37 (m, 2H, 4-H), 3.86 (s, 3H, OMe), 7.03 (dd, *J*= 8, 1 Hz, 1H, 6-H), 7.22 (d, *J*= 8 Hz, 1H, 7-H). ¹³C-RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 29.5 (C₅), 30.9 (C₄), 56.4 (OMe), 98.7 (C₃), 115.6 (CN), 116.8 (C₇), 117.2 (C₆), 125.2 (C_{3b}), 127.6 (C_{8a}), 138.9 (C_{5a}), 144.0 (C₈), 161.2 (C₂), 169.6 (C_{3a}). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd para C₁₃H₁₀N₂O₂ ([M+H]⁺): 227.0815, Encd: 227.0818.

4.3.1.13.3. Síntesis de 2-cloro-8-metoxi-4,5-dihidrociclopenta[de]quinolin-3-carbonitrilo (101)



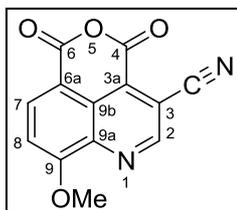
Una disolución de la ciclopentaquinolinona **100** (7.67 g, 33.92 mmol) en POCl₃ (60 ml) se agitó a 110 °C durante 45 min. A continuación, se evaporó el disolvente a vacío y el residuo se trató con CH₂Cl₂ (250 ml) y se enfrió a -5 °C durante 12 h. El precipitado se filtró, se lavó con CH₂Cl₂ frío (10 ml) y se secó a vacío para dar el compuesto **101** como sólido blanco (6.5 g, 79%). P.f.: 281°C. HPLC-MS (gradiente 30-95 % de A en B durante 10 min) *t_R*=5.40 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.36 – 3.47 (m, 2H, 4-H), 3.54 – 3.66 (m, 2H, 5-H), 3.99 (s, 4H, OMe), 7.46 (d, *J*= 8 Hz, 1H, 7-H), 7.54 (dt, *J*= 8, 1 Hz, 1H, 6-H). No fue posible obtener espectro de ¹³C-RMN debido a la baja solubilidad de **101**. HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₃H₉N₂OCl ([M+H]⁺): 245.0476, Encd. 245.0467.

4.3.1.13.4. Síntesis de 8-metoxi-4,5-dihidrociclopenta[de]quinolina-3-carbonitrilo (**102**)



Pd(C) al 10% (74 mg) se añadió lentamente sobre una disolución de la ciclopentaquinolina **101** (370 mg, 1.51 mmol) y Et₃N (420 µl, 1.51 mmol) en AcOEt (250 ml) y la mezcla se hidrogenó a temperatura ambiente y con 15 psi de presión de H₂, durante 12 h. Después, se filtró el catalizador y se lavó con AcOEt. Los filtrados se evaporaron a sequedad para obtener el compuesto **102** (134.6 mg, 90%). P.f.: 202 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95 % de A en B durante 10 min) *t_R*=2.24min. ¹H-RMN (400 MHz, Cl₃CD) δ 3.58 – 3.40 (m, 2H, 5-H), 3.83 – 3.58 (m, 2H, 4-H), 4.15 (s, 3H, OMe), 7.20 (d, J = 8 Hz, 1H, 7-H), 7.41 (dt, J = 8, 1.5 Hz, 1H, 6-H), 8.96 (s, 1H, 2-H). ¹³C-RMN(100 MHz, Cl₃CD) δ 29.1 (C₅), 31.8 (C₄), 56.4 (OMe), 102.0 (CN), 113.2 (C₇), 116.5 (C₃), 122.0 (C₆), 133.9 (C_{3b}), 138.0 (C_{5a} + C_{8a}), 150.4 (C₂), 152.6 (C₈), 162.5 (C_{3b}). HRMS (ESI) m/z: Calcd. para C₁₃H₁₀N₂O ([M+H]⁺): 210.07895, Encd. 210.07931.

4.3.1.13.5. Síntesis de 9-metoxi-4,6-dioxo-4,6-dihidropirano[3,4,5-de]quinolina-3-carbonitrilo (**105**)

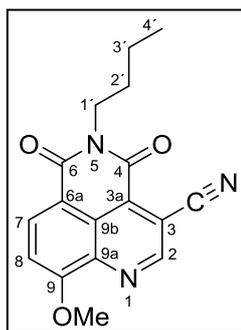


CrO₃ (510 mg, 5.1 mmol) se añadió lentamente a una disolución de la ciclopentaquinolina **102** (134 mg, 0.64 mmol) en mezcla 2:1 de anhídrido acético/ácido acético (3 ml) calentando a 110 °C. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min. Terminado este tiempo, la disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente, se evaporó el disolvente hasta sequedad procurando evaporar bien las trazas de acético y el residuo obtenido se agitó con CH₂Cl₂ (50 ml) a 40 °C durante 10 min. La disolución obtenida, de color verde, se filtró sobre Clarcel®, se evaporó a sequedad y el residuo (124 mg, 83 %) se utilizó sin purificación y caracterización adicional para la reacción posterior.

4.3.1.13.6. Síntesis de las 3-ciano-quinolimidas (106) y (107)

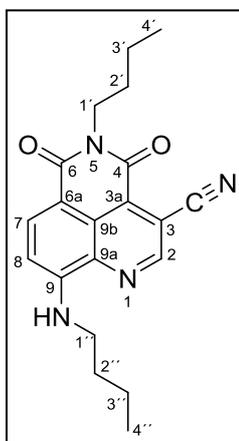
A una disolución del anhídrido **105** (124 mg, 0.48 mmol) en EtOH (5 ml), se añadió n-butilamina (71 μ l, 0.71 mmol) y la mezcla se calentó a 120 °C por un tiempo de 90 min. Posteriormente, se evaporó el disolvente y el residuo obtenido se purificó en cromatografía flash (Biotage®) utilizando un cartucho de 25 g y como eluyente gradiente de AcOEt en hexano (0-100%). De esta forma se obtuvieron la 3-ciano-quinolimidas **106** como producto mayoritario [sólido amarillo (25 mg, 49 %)] y la 9-butilamina-3-ciano quinolimida (**107**) como producto minoritario [sólido de color morado (5.6 g, 3%)].

4.3.1.13.6.1. Síntesis de 5-butil-9-metoxi-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4H-benzo-[de][2,6]-naftiridina-3-carbonitrilo (106)



P.f.: 242 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95 % de A en B durante 10 min) $t_R=5.88$ min. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Cl_3CD) δ 0.89 (dd, $J = 9$ y 6 Hz, 5H, 4'-H), 1.36 (q, $J = 7$ Hz, 4H, 3'-H), 1.63 (dd, $J = 9$ y 5.Hz, 3H, 2'-H), 4.08 (dd, $J = 9$ y 6 Hz, 4-H, 1'-H), 4.19 (s, 3H, OMe), 7.36 (d, $J = 8$ Hz, 2H, 8-H), 8.61 (d, $J = 8$ Hz, 1H, 7-H), 9.19 – 9.22 (m, 1H, 2-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, Cl_3CD) δ 12.7 (C_4), 19.3 (C_3), 29.0 (C_2), 39.8 ($\text{C}_{1'}$), 56.2 (OMe), 107.2 (CN), 110.1 (C_8), 113.5 (C_{6a}), 114.8 (C_3), 121.8 (C_{3b}), 131.2 (C_{3a}), 134.0 (C_7), 138.4 (C_{9a}), 150.8 (C_2), 159.2 (C_9), 159.6 (C_4), 160.3 (C_6). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 309.11134; Encd: 309.11162.

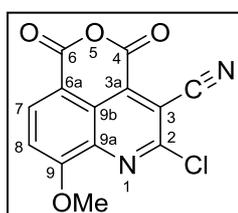
4.3.1.13.6.2. Síntesis de 5-butil-4,6-dioxo-9-(pentilamino)-5,6-dihidro-4H-benzo-[de]-[2,6]naftiridina-3-carbonitrilo (107)



P.f.: 154 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95 % de A en B durante 10 min) t_R = 9.96 min. ^1H NMR (400 MHz, Cl_3CD) δ 0.90 (t, J = 7 Hz, 3H, 4'-H), 0.96 (t, J = 7 Hz, 3H, 4''-H), 1.42 – 1.30 (m, 2H, 3''-H), 1.69 – 1.59 (m, 2H, 2''-H), 1.81 – 1.70 (m, 2H, 1''-H), 3.38 (td, J = 7, 6 Hz, 2H, 2'-H), 4.17 – 3.94 (m, 2H, 1'-H), 6.79 (d, J = 9 Hz, 1H, 6-H), 6.92 (d, J = 7 Hz, 1H, NH), 8.43 (d, J = 8 Hz, 1H, 7-H), 8.95 (s, 1H, 2-H). ^{13}C -RMN (100 MHz, Cl_3CD) δ 12.7 ($\text{C}_{4''}$ + $\text{C}_{4'}$), 19.3 ($\text{C}_{3'}$ + $\text{C}_{3''}$), 29.0 ($\text{C}_{2''}$), 29.8 (C_2), 39.5 ($\text{C}_{1''}$), 41.8 (C_1), 105.4 (C_8), 106.2 (C_6), 107.2 (C_3), 115.2 (CN), 122.0 (C_{3b}), 130.9 (C_{3a}), 135.4 (C_7), 136.1 (C_{9a}), 147.8 (C_2), 148.7 (C_9), 160.0 (C_4), 161.0 (C_5).

HRMS (ESI) m/z: Calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 350.1743; Encd: 351.18277.

4.3.1.13.7. Síntesis de 2-cloro-9-metoxi-4,6-dioxo-4*H*,6*H*-pirano-[3,4,5*de*]-quino-lina-3-carbonitrilo (**108**)



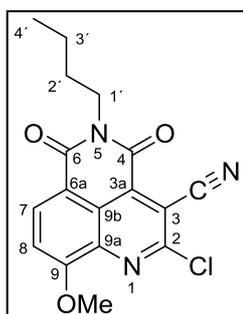
CrO_3 (227 mg, 2.28 mmol) se añadió lentamente a una disolución de la ciclopentaquinolina (**101**) (70 mg, 0.28 mmol) en mezcla 2:1 de anhídrido acético/ácido acético (3 ml) calentando a 110 °C. La mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 min. Terminado este tiempo, la disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente, se evaporó el disolvente hasta sequedad procurando evaporar bien las trazas de acético y el residuo obtenido se agitó con CH_2Cl_2 (50 ml) a 40 °C durante 10 min. La disolución se filtró sobre Clarcel®, se evaporó a sequedad y se obtuvo un residuo (59 mg) que se utilizó sin purificación y caracterización adicional para la reacción siguiente.

4.3.1.13.8. Síntesis de las 3-ciano-quinolimidas (**109**) y (**110**)

A una disolución del anhídrido **108** (59 mg, 69.79 μmol) en EtOH (3 ml), se añadió *n*-butilamina (30.63 μl , 0.31 mmol) y se calentó a una temperatura de 120 °C por un tiempo de 90 min. Posteriormente, se evaporó el disolvente y el residuo obtenido se purificó en cromatografía flash (Biotage®) utilizando un cartucho SNAP KP-

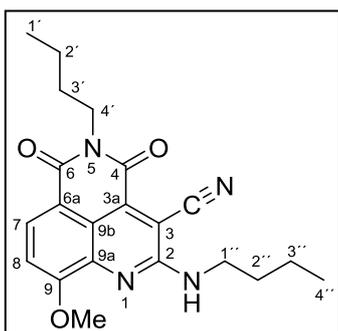
SIL 25 g y como eluyentes gradiente de MeOH en CH₂Cl₂ (0-25%). De esta forma se obtuvieron las 2-cloro-cianoquinolimidas **109** de color amarillo (5 mg, 7 %) y la 5-butil-2-butilamino cianoquinolimidas **110** de color naranja (12 mg, 17 %).

4.3.1.13.8.1. Síntesis de 5-butil-2-cloro-9-metoxi-4,6-dioxo-5,6-diidro-4H-benzo-[de]-[2,6]naftiridino-3-carbonitrilo (**109**).



P.f.: 225 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95 % de A en B durante 10 min) $t_R=6.35$ min. ¹H-RMN (400 MHz, Cl₃CD) δ 0.98 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, 4'-H), 1.44 (dq, *J* = 15 y 7 Hz, 2H, 3'-H), 1.67 – 1.75 (m, 2H, 2'-H), 4.16-4.20 (m, 2H, 1'-H), 4.23 (s, 3H, OMe), 7.43 (d, *J* = 8 Hz, 1H, 8-H), 8.7 (d, *J* = 8 Hz, 1H, 7-H). ¹³C-RMN(100 MHz, Cl₃CD) δ 13.9 (C_{4'}), 20.5 (C_{3'}), 30.1 (C_{2'}), 41.2 (C_{1'}), 57.3 (OMe), 109.8 (C₁₁), 112.3 (C₈), 113.8 (C₃), 114.5 (C_{9a}), 134.9 (C₇), 135.6 (C₁₀), 138.5 (C_{6a}), 151.4 (C₂), 159.5 (C₉), 159.9 (C₄), 161.3 (C₆). HRMS (ESI) *m/z*: Calc. para C₁₇H₁₄N₃O₃Cl ([M+H]⁺): 344.0796; Encd: 344.0791.

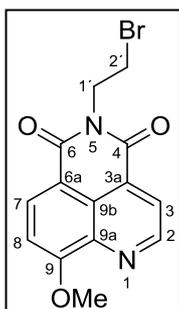
4.3.1.13.8.2. Síntesis de 5-Butil-2-(butilamino)-9-metoxi-4,6-dioxo-5,6-diidro-4H-benzo-[de][2,6]naftiridino-3-carbonitrilo (**110**).



P.f.:237 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95 % de A en B durante 10 min) $t_R=8.70$ min. ¹H-RMN (400 MHz, Cl₃CD) δ 0.92-0.96 (2t, *J* = 7.5 Hz, 6H,4'-H,4''-H), 1.39 (2t, *J* = 7 Hz, 4H, 3'-H, 3''-H), 1.54 – 1.81 (m, 4H, 2'-H, 2''-H), 3.64 (td, *J* = 7 y 5 Hz, 2H, 1''-H), 4.06 (s, 3H, OMe), 4.06 (t, 2H, *J* = 7 Hz, 1'-H) 5.76 (t, *J* = 5 Hz, 1H, NH), 7.11 (d, *J* = 8 Hz, 1H, 8-H), 8.18 (d, *J* = 8 Hz, 1H, 7-H). ¹³C-RMN (100 MHz, Cl₃CD) δ, 14.1 (C_{4''}), 14.0 (C_{4'}), 20.4 (C_{3'}), 20.6 (C_{3''}), 30.3 (C₂), 31.4 (C_{2''}), 40.9 (C_{1'}), 41.9 (C_{1''}), 57.0 (OMe), 96.6 (C₃), 111.4 (C₈), 114.9 (C_{6a}), 115.9 (C₁₁), 117.5 (C_{9b}), 129.1 (C₇), 134.5 (C₁₀), 140.2 (C_{9a}), 155.6 (C₂), 158.6 (C₉), 161.6 (C₄), 162.4 (C₆).

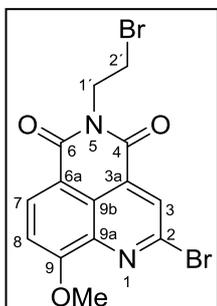
4.3.1.14. Síntesis de las 9-hidroxiquinolinas análogas de sox

4.3.1.14.1. Síntesis de 5-(2-bromoetil)-9-metoxi-4H-benzo[de][2,6]naftiridina-4,6(5H)-diona (**112**)



CBr_4 (30.9 mg, 0.09 mmol) y Ph_3P (24.5 mg, 0.09 mmol) se añadieron a una disolución de 5-(2-hidroxiethyl)-quinolimida **90** (23mg, 0.08 mmol) en DMF anhidro (3 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Después, se evaporó el disolvente y el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (20 ml). La disolución resultante, se lavó sucesivamente con H_2O (5 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó a sequedad. El crudo de reacción, se purificó mediante cromatografía flash (gradiente 150:1 a 50:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) para obtener el bromoderivado **112** (28 mg, 100 %) como un sólido amarillo. Pf: 143 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 3.77$ min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 3.65 (t, 2H, $J = 7$ Hz, 2'-H), 4.23 (s, 3H, OMe), 4.58 (t, 2H, $J = 7$ Hz, 1'-H), 7.29 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 8.35 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 3-H), 8.60 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H), 9.23 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 2-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 27.8 (C_2), 41.3 ($\text{C}_{1'}$), 57.0 (C_{OMe}), 109.0 (C_8), 114.2 (C_{6a}), 123.3 (C_3), 124.2 (C_{9b}), 129.4 (C_{3a}), 134.0 (C_7), 139.0 (C_{9a}), 150.6 (C_2), 161.0 (C_9), 162.6 (C_6), 163.3 (C_4). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3\text{Br}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 334.9953, Encd: 334.9952.

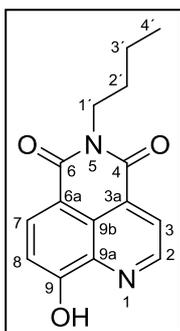
4.3.1.14.2. Síntesis de 2-bromo-5-(2-bromoetil)-9-metoxi-4H-benzo-[de][2,6]-naftiridina-4,6(5H)-diona (**114**)



Se añadió BBr_3 (1M en heptano, 250 μL , 0.25 mmol) a una disolución de 5-(2-hidroxiethyl)-quinolimida **90** (30 mg, 0.1 mmol) en CH_2Cl_2 (3 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7 días. Transcurrido este tiempo, se adicionó MeOH (2ml) y se neutralizó con disolución 1N NaOH. A continuación, la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (20 ml), se lavó con agua (10 ml) y salmuera (10 ml), se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se evaporó a sequedad. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash sobre gel de sílice (gradiente

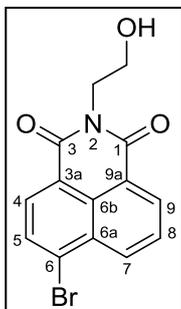
150:1 a 60:1 CH₂Cl₂/MeOH como eluyente), obteniéndose el derivado bromado **114** (13 mg, 32 %) como un sólido amarillo. Pf: 215 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 6.16 min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 3.64 (t, 2H, J = 7 Hz, 2'-H), 4.20 (s, 3H, OMe), 4.57 (t, 2H, J = 7 Hz, 1'-H), 7.31 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 8-H), 8.46 (s, 1H, 3-H), 8.58 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 7-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 27.7 (C_{2'}), 41.4 (C_{1'}), 57.1 (C_{OMe}), 110.1 (C₈), 114.2 (C_{6a}), 123.2 (C_{9b}), 128.6 (C₃), 131.3 (C_{3a}), 133.9 (C₇), 139.3 (C_{9a}), 142.1 (C₂), 160.0 (C₉), 162.1 (C₄), 162.2 (C₆). HRMS (ESI) m/z : Calcd. Para C₁₄H₁₀N₂O₃Br₂ ([M+H]⁺): 412.9058, Encd: 412.9070.

4.3.1.14.3. Síntesis de 5-butil-9-hidroxi-4*H*-benzo[de][2,6]naftiridina-4,6(5*H*)-diona (**115**)



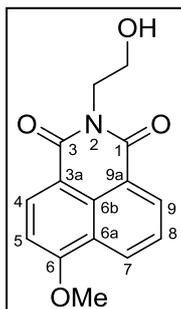
Una disolución de la 5-metoxi-quinolimida **94** (24 mg, 0.08 mmol) en BBr₃ en CH₂Cl₂ (0.5 mmol), se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se adiciono y se neutralizó con una disolución 1N de NaOH. Se extrajo la fase orgánica y se evaporó a sequedad. Después, la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (20 ml) y la fase orgánica se lavó con agua (10 ml) y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, y se evaporó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía flash de fase reversa (gradiente 12:1 a 1:1 CH₃CN/H₂O con 0.05% de TFA como eluyente), obteniéndose el producto del epígrafe **115** (21 mg, 92 %) como un sólido rojo. Pf: 154 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 4.93 min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0.97 (t, 3H, J = 7.5 Hz, 4'-H), 1.43 (h, 2H, J = 7.5 Hz, 3'-H), 1.68 (m, 2H, 2'-H), 4.15 (t, 2H, J = 4 Hz, 1'-H), 7.38 (d, 1H, J = 8 Hz, 8-H), 8.34 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 3-H), 8.54 (d, 1H, J = 8 Hz, 7-H), 9.08 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 2-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 14.0 (C_{4'}), 20.5 (C_{3'}), 30.3 (C_{2'}), 40.5 (C_{1'}), 112.3 (C₈), 113.8 (C_{6a}), 123.4 (C₃), 123.6 (C_{9b}), 130.3 (C_{3a}), 134.3 (C₇), 136.9 (C_{9a}), 149.3 (C₂), 158.0 (C₉), 162.8 (C₆), 163.2 (C₄). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para C₁₅H₁₄N₂O₃ ([M+H]⁺): 271.1004, Encd: 271.1008.

4.3.1.15. Síntesis de 6-bromo-2-(2-hidroxietyl)-1H-benzo[de]isoquinolina-1,3(2H)-diona (117)



A una disolución de 6-bromo-1*H*,3*H*-benzo[de]isocromeno-1,3-diona **116** (200 mg, 0.72 mmol) en EtOH seco (3 ml), se le añadió 2-aminoetanol y la mezcla se calentó a 68°C mediante irradiación por MW durante 10 minutos. Después de enfriarse a temperatura ambiente, se obtuvo un precipitado, que se filtró y se secó a vacío durante toda la noche, para obtener la 6-bromo-1,8-naftalimida **117** como un sólido amarillo (205 mg, 90 %). Pf: 205 °C. HPLC-MS (gradiente 15-95 % de A en B, 10 min) t_R = 8.07 min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 3.99 (t, J = 5 Hz, 2H, CH_2OH), 4.45 (t, J = 5 Hz, 2H, NCH_2), 7.86 (t, 1H, 8-H), 8.06 (d, J = 8 Hz, 1H, 5-H), 8.43 (d, J = 8 Hz, 1H, 4-H), 8.59 (dd, J = 8.5 y 1 Hz, 1H, 7-H), 8.67 (dd, J = 7.5 y 1 Hz, 1H, 9-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 43.0 (C_{NCH_2}), 61.9 ($\text{C}_{\text{CH}_2\text{OH}}$), 122.1 (C_{3a}), 123.0 (C_{9a}), 128.3 (C_8), 129.2 (C_{6b}), 130.8 (C_6), 130.9 (C_{6a}), 131.4 (C_5), 131.7 (C_4), 132.5 (C_9), 133.8 (C_7), 164.7 (C_1 , C_3). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_3\text{Br}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 319.9828, Encd ($[\text{M}+\text{H}]^+$) ($-\text{H}_2\text{O}$): 303.9777

4.3.1.16. Síntesis de 2-(2-hidroxietyl)-6-metoxi-1H-benzo[de]isoquinolina-1,3(2H)-diona (118)³⁶²



A una suspensión de K_2CO_3 (0.78 mmol) en MeOH (3 ml), se le añadió la correspondiente 6-bromo-1,8-naftalimida **117** (0.15 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 24 horas. Después se enfrió a 5 °C durante 1 hora, formándose un precipitado, que se filtró, se lavó con MeOH y se secó toda la noche a vacío, para dar la correspondiente 6-metoxi-1,8-naftalimida **118**. Sólido amarillo (41 mg, 100 %). Pf: 189 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 2.91 min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 3.98 (m, 2H, CH_2OH), 4.14 (s, 3H, OMe), 4.45 (m, 2H, NCH_2), 7.05 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 5-H), 7.71 (dd, 1H, J = 7.5 y 8.5 Hz, 8-H), 8.57 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 4-H), 8.58 (dd, 1H, J = 8.5 y 1.5 Hz, 7-H), 8.61 (dd, 1H, J = 7.5 y 1 Hz, 9-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 42.92 (C_{NCH_2}), 56.4 (C_{OMe}), 62.32 ($\text{C}_{\text{CH}_2\text{OH}}$), 105.5 (C_5), 114.9 (C_{3a}), 122.2 (C_{9a}), 123.7 (C_{6a}), 126.2 (C_8), 129.2 (C_7), 129.6 (C_{9b}), 132.1 (C_9), 134.1 (C_4), 161.3 (C_6), 165.1

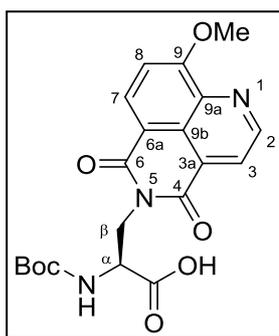
(C₃), 165.6 (C₁). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₅H₁₃NO₄ ([M+H]⁺): 272.0917, Encd: 272.0913.

4.3.1.17. Síntesis de reactivos para el marcaje fluorescente de péptidos y proteínas.

4.3.1.17.1. Procedimiento general para la síntesis de los Boc-aminoácidos **124** y **125**.

Una disolución del ácido (S)-3-amino-2-(*N*-Boc-amino)-propiónico (102 mg, 0.50 mmol) y NaHCO₃ (209 mg, 2.49 mmol) en H₂O (1.5 ml), se añadieron lentamente a una disolución del correspondiente anhídrido **85** u **87** (0.50 mmol) en dioxano (7.5 ml), bajo atmosfera de Ar₂. La suspensión resultante se agitó vigorosamente a reflujo durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se evaporó sequedad y el residuo se disolvió en H₂O (50 ml). La fase acuosa se lavó con éter de etilo (50 ml), se acidificó con una disolución 6 N de HCl y se extrajo con CH₂Cl₂ (3×100ml). La mezcla de las fases orgánicas, se secaron a vacío. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash, utilizando gradiente 2-10% de AcOEt en hexano con 0,5 % de ácido acético como eluyente, dando los correspondientes *N*-Boc-amino ácidos derivados **124** y **125**.

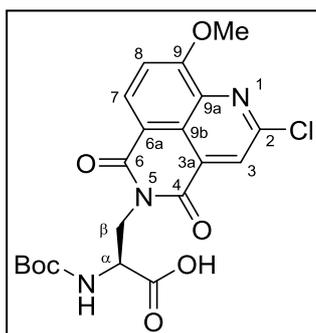
4.3.1.17.1.1. Síntesis del ácido (S)-2-((Boc)amino)-3-(9-metoxi-4,6-dioxo-4*H*-benzo-*de*[2,6]naftiridin-5(6*H*)-il)propanóico (**124**)



Aplicando el procedimiento general a **85** (114 mg, 0.5 mmol), se obtuvo el compuesto **124** como un sólido naranja (77 mg, 37 %). Pf: 205 °C. $[\alpha]_D^{20} = -15.92$ (*c* 1.0, MeOH). HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) *t_R* = 2.64 min. ¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 1.16 [s, 9H, CH₃(Boc)], 4.13 (s, 3H, OMe), 4.35 (s, 3H, α -H y β -H), 7.17 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, NH), 7.52 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 8-H), 8.29 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, 3-H), 8.48 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 7-H), 9.20 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, 2-H). ¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 27.9 [CH₃(Boc)], 40.4 (C _{β}), 50.8 (C _{α}), 56.7 (C_{OMe}), 78.2 [C(Boc)], 109.7 (C₈), 113.8 (C_{6a}), 122.6 (C₃), 123.3 (C_{9b}), 129.0 (C_{3a}), 133.0 (C₇), 138.1 (C_{9a}), 150.5

(C₂), 155.3 [CO(Boc)], 160.3 (C₉), 162.3 (C₆), 163.1 (C₄), 171.7 (CO₂H). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd para C₂₀H₂₁N₃O₇ ([M+1]⁺): 416.1380, Encd: 416.138.

4.3.1.17.1.2. Síntesis del ácido (S)-2-((Boc)amino)-3-(2-cloro-9-metoxi-4,6-dioxo-4H-benzof[de][2,6]naftiridin-5(6H)-il)propanóico (125)

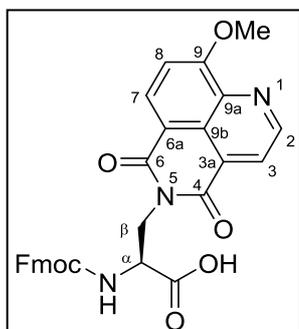


A partir de **87** (113 mg, 0.42 mmol), se obtuvo **125** como un sólido naranja (42 mg, 22 %). Pf: 152 °C. HPLC-MS (gradiente 2-95% de A en B, 10 min) *t_R* = 9.09 min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.16 y 1.18 [2s, 9H, CH₃(Boc)], 4.06 (s, 3H, OMe), 4.30-4.59 (m, 2H, β-H), 4.71(m, 1H, α-H), 5.38 (d, 1H, *J* = 8 Hz, NH), 7.17 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 8-H), 8.18 (s, 1H, 3-H), 8.42 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 7-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 28.1 [CH₃(Boc)], 41.6 (C_β), 52.2 (C_α), 57.1 (C_{OMe}), 80.6 [C(Boc)], 110.2 (C₈), 114.0 (C_{6a}), 123.0 (C_{9b}), 125.3 (C₃), 132.0 (C_{3a}), 133.9 (C₇), 138.5 (C_{9a}), 151.5 (C₂), 156.0 [CO(Boc)], 159.9 (C₉), 162.7 (C₄), 162.9 (C₆), 173.4 (CO₂H). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₂₀H₂₀N₃O₇Cl ([M+1]⁺): 450.0990, Encd: 450.0990.

4.3.1.17.2. Procedimiento general para la síntesis de Fmoc-aminoácidos 126 y 127.

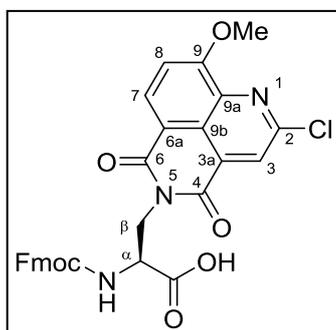
Se añadió TFA (4 ml) a una disolución del correspondiente *N*-Boc-derivado **124** o **125** (0.21 mmol) en dioxano (2 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La disolución se evaporó hasta sequedad, el residuo se disolvió en H₂O (2 ml) y se liofilizó para quitar las trazas de TFA. El crudo de reacción se redisolvió en H₂O (1 ml) con NaHCO₃ (1.06 mmol) midiéndose el pH para asegurarse de que el medio era básico. Una disolución de Fmoc-OSu (77 mg, 0.23 mmol) en dioxano (5 ml) se añadió lentamente a la disolución de aminoácido. La reacción se dejó en agitación durante 3 horas antes de concentrarse para eliminar la mayor parte del dioxano y volver a diluirla a un volumen total de 10 ml en H₂O. La disolución se lavó con éter de dietilo (50 ml), para quitar el exceso de Fmoc-OSu. La fase acuosa se acidificó con disolución 6 N de HCl y se extrajo en CH₂Cl₂ (50 ml). La mezcla de las fases orgánicas, se secó con Na₂SO₄ y se evaporó hasta sequedad. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash sobre sílica gel, utilizando un gradiente 1-10% de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente, para obtener los correspondientes Fmoc-aminoácidos **126** y **127**.

4.3.1.17.2.1. Síntesis del ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(9-metoxi-4,6-dioxo-4H-benzo[de][2,6]naftiridin-5(6H)-il)propanóico (126)



Aplicando el procedimiento general arriba indicado a **124** (87 mg, 0.21 mmol), se obtuvo el compuesto **126** como un sólido amarillo (86 mg, 76 %). Pf: 180 °C. $[\alpha]_D^{20} = -19.74$ (c 0.9, MeOH). HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 5.06$ min. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 3.97-4.23 [m, 3H, CH(Fmoc) y CH_2 (Fmoc)], 4.10 (s, 3H, OMe), 4.41 (s, 3H, α -H y β -H), 7.22 (td, 1H, $J = 7.5$ y 1 Hz, Fmoc), 7.27 (td, 1H, $J = 7.5$ y 1 Hz, Fmoc), 7.39 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.44 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 7.55 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.62 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.77 (br s, 1H, NH), 7.85 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 8.22 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 3-H), 8.39 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H), 9.15 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 2-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 39.9 (C_β), 46.5 [CH(alifático, Fmoc)], 51.3 (C_α), 56.6 (C_{OMe}), 65.8 [CH_2 (alifático, Fmoc)], 109.6 (C_β), 113.7 (C_{6a}), 120.0 [CH(Fmoc)], 122.6 (C_3), 123.3 (C_{9b}), 125.1 y 125.2, 127.0, 127.1 y 127.6 [4 x CH(Fmoc)], 128.9 (C_{3a}), 133.1 (C_7), 138.1 (C_{9a}), 140.6 [C(Fmoc)], 143.7 [C(Fmoc)], 150.4 (C_2), 155.9 [CO(Fmoc)], 160.3 (C_9), 162.3 (C_6), 163.2 (C_4), 171.5 (CO_2H). HRMS (ESI) m/z : Calcd para $\text{C}_{30}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_7$ ($[\text{M}+1]^+$): 538.1536, Encd: 538.1523.

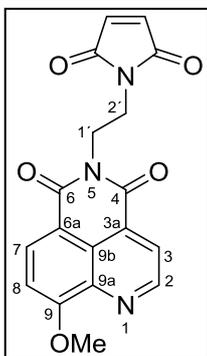
4.3.1.17.2.2. Síntesis del ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-(2-cloro-9-metoxi-4,6-dioxo-4H-benzo[de][2,6]naftiridin-5(6H)-il)propanóico (127)



A partir del anhídrido **125** (120 mg, 0.26 mmol), se obtuvo el compuesto **127** como un sólido amarillo (108 mg, 71 %). Pf: 151 °C. $[\alpha]_D^{20} = -34.09$ (c 1.1, MeOH). HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 6.69$ min. $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 3.89 [t, 3H, $J = 7$ Hz, CH(Fmoc)], 3.96-4.11 [m, 2H, CH_2 (Fmoc)], 4.06 (s, 3H, OMe), 4.33-4.46 (m, 3H, α -H y β -H), 7.22 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.27 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.37-7.40 (m, 3H, NH y Fmoc), 7.45 (m, 2H, 8-H y Fmoc), 7.56 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.85 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Fmoc), 8.10 (s, 1H, 3-H), 8.35 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 ,

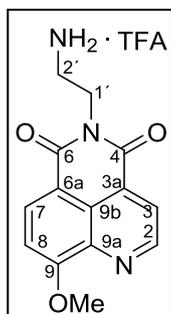
100 MHz) δ : 41.6 (C_{β}), 46.5 [CH (alifático, Fmoc)], 51.9 (C_{α}), 56.7 (C_{OMe}), 65.7 [CH₂ (alifático, Fmoc)], 110.9 (C_8), 113.9 (C_{6a}), 120.1 [CH(Fmoc)], 122.6 (C_{9b}), 123.7 (C_3), 125, 125.2, 127.0 y 127.6 [4 x CH(Fmoc)], 132.6 (C_{3a}), 133.0 (C_7), 137.5 (C_{9a}), 140.6 [C(Fmoc)], 143.6 [C(Fmoc)], 143.8 [C(Fmoc)], 149.7 (C_2), 155.9 [CO(Fmoc)], 159.0 (C_9), 162.0 (C_4), 162.1 (C_6), 171.2 (CO_2H). HRMS (ESI) m/z . Calcd para $C_{30}H_{22}N_3O_7Cl$ ($[M+1]^+$): 572.1146, Encd: 572.1153.

4.3.1.17.3. Síntesis de 5-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etil)-9-metoxi-4H-benzo[de][2,6]naftiridina-4,6(5H)-diona (**130**)



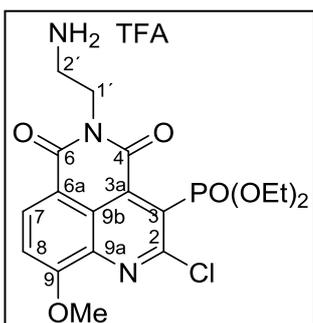
A una disolución de la 5-(2-hidroxietil)-quinolimida **90** (50.0 mg, 0.18 mmol) en THF seco (3 ml), se añadió Ph_3P (43 mg, 0.16 mmol), maleimida (16 mg, 0.16 mmol) y alcohol neopentílico (7 mg, 0.08 mmol) y se agitó a temperatura ambiente. Después de 5 minutos, se añadió gota gota, mediante jeringa, azodicarboxilato de dietilo (25 μ L, 40 % solución en tolueno, 0.16 mmol), durante 5 minutos, y la mezcla se agitó durante 2 días. Una vez terminada la reacción, se evaporó el disolvente a sequedad, y el crudo se purificó mediante cromatografía flash, usando como eluyente un gradiente de 5-15% de EtOAc en hexano, obteniéndose la maleimida deseada **130** (11 mg, 17 %) como un sólido amarillo. Pf: 180 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 2.05 min. 1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 3.98 (m, 2H, 2'-H), 4.22 (s, 3H, OMe), 4.41 (m, 2H, 1'-H), 6.62 [s, 2H, (CH-maleimida)], 7.27 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 8-H), 8.31 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 3-H), 8.55 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 7-H), 9.21 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 2-H). ^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 36.3 (C_2), 39.3 (C_1), 57.0 (C_{OMe}), 108.9 (C_8), 114.3 (C_{6a}), 123.2 (C_3), 124.3 (C_{9b}), 129.4 (C_{3a}), 133.8 (C_7), 134.3 [CH (maleimida)], 139.1 (C_{9a}), 150.5 (C_2), 160.9 (C_9), 163.1 (C_6), 163.8 (C_4), 170.9 [CO(maleimida)]. HRMS (ESI) m/z . Calcd. para $C_{18}H_{13}N_3O_5$ ($[M+H]^+$): 352.0855, Encd: 352.0861.

4.3.1.17.4. Síntesis del trifluoroacetato 5-(2-aminoetil)-9-metoxi-4H-benzo-[de]-[2,6]-naftiridin-4,6-(5H)-diona (133).



A una disolución de la 5-(2-Boc-aminoetil)-quinolimida **96** (30 mg, 0.08 mmol) en CH_2Cl_2 (2 ml), se le añadió TFA (154 μL , 2.02 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida y el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (50 ml), se lavó sucesivamente con H_2O (20 ml) y salmuera (20 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad, para dar **133** (15 mg, 93 %) como un sólido amarillo-marrón. Pf: 137 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 0.40 min. ^1H -RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ : 3.27 (t, 2H, J = 5.5 Hz, 2'-H), 4.10 (s, 3H, OMe), 4.36 (t, 2H, J = 5.5, 1'-H), 7.33 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 8-H), 8.15 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 3-H), 8.38 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 7-H), 8.96 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 2-H). ^{13}C -RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ : 38.9 ($\text{C}_{1'}$), 39.8 ($\text{C}_{2'}$), 57.5 (C_{OMe}), 110.6 (C_8), 115.2 (C_{6a}), 124.1 (C_3), 125.0 (C_{9b}), 130.9 (C_{3a}), 134.9 (C_7), 139.2 (C_{9a}), 151.2 (C_2), 161.6 (C_9), 164.4 (C_6), 165.0 (C_4). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 272.1029, Encd: 272.10298.

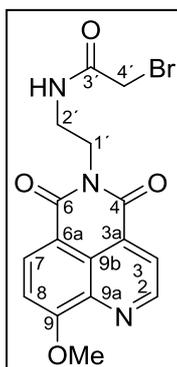
4.3.1.17.5. Síntesis del trifluoroacetato de [5-(2-aminoetil)-2-cloro-9-metoxi-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4H-benzo[de][2,6]naftiridin-3-il]fosfonato de dietilo (134)



A una disolución de la 5-(2-Boc-aminoetil)-quinolimida **98** (14 mg, 0.025 mmol) en CH_2Cl_2 (4 ml), se añadió TFA (71 μL , 0.625 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, se evaporó el disolvente a presión reducida, para obtener el producto desprotegido **134** como un sirupe amarillo (14 mg, 100 %). HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min). t_R = 0.81min. ^1H -RMN (CD_3OD , 500 MHz) δ : 1.29 (t, 6H, J = 7 Hz, Et), 3.25 (t, 2H, J = 6 Hz, 2'-H), 4.11 (s, 3H, OMe), 4.20 (m, 4H, Et), 4.35 (t, 2H, J = 6, 1'-H), 7.52 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 8-H), 8.52 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 7-H). ^{13}C -RMN (CD_3OD , 125 MHz) δ : 18.1 [d, J = 6.5 Hz, $\text{CH}_3(\text{Et})$], 41.0 y 41.2 ($\text{C}_{1'}$ y $\text{C}_{2'}$), 59.1 (C_{OMe}), 66.9 [d, J = 7 Hz, $\text{CH}_2(\text{Et})$], 114.6 (C_8), 116.8 (C_{6a}), 125.3 (d, J = 9.5 Hz, C_{9b}), 127.8 (d, J = 196 Hz,

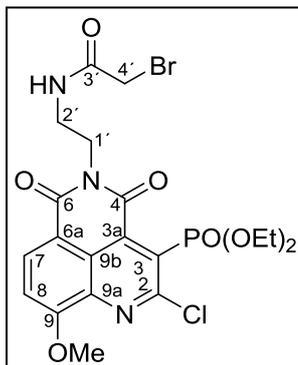
C₃), 136.7 (C₇), 141.4 (C_{9a}), 142.9 (d, *J* = 5 Hz, C_{3a}), 153.6 (d, *J* = 6 Hz, C₂), 162.2 (C₉), 165.1 (C₆), 165.3 (d, *J* = 5 Hz, C₄). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₈H₂₁C₁N₃O₆P ([M+H]⁺): 442.0929, Encd: 442.0941.

4.3.1.17.6. Síntesis de 2-bromo-*N*-(2-(9-metoxi-4,6-dioxo-4*H*-benzo[de][2,6]nafiridin-5(6*H*)-il)etil)acetamida (**135**).



Después, se evaporó el disolvente y se redisolvió en CH₂Cl₂ (50 ml). La disolución se lavó con H₂O (20 ml) y salmuera (20 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó hasta sequedad, para obtener la bromometilacetamida **135** (6.7 mg, 32 %) como un sólido amarillo marrón. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) *t_R* = 1.32 min. ¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ: 3.63 (t, 2H, *J* = 5.5 Hz, 2'-H), 3.71 (s, 2H, CH₂Br), 4.17 (s, 3H, OMe), 4.37 (m, 2H, 1'-H), 6.96 (br s, 1H, NH), 7.23 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 8-H), 8.30 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, 3-H), 8.55 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 7-H), 9.17 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, 2-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 125 MHz,) δ: 27.9 (C₄), 38.0 (C_{1'}), 38.8 (C_{2'}), 55.9 (C_{OMe}), 107.9 (C₈), 113.1 (C_{6a}), 122.2 (C₃), 123.1 (C_{9b}), 128.3 (C_{3a}), 132.9 (C₇), 137.9 (C_{9a}), 149.4 (C₂), 160.0 (C₉), 162.2 (C₆), 163.0 (C₄), 165.1 (CONH). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₆H₁₄BrN₃O₄ ([M+H]⁺): 392.0167, Encd: 392.0220.

4.3.1.17.7. Síntesis de (5-(2-(2-bromoacetamido)etil)-2-cloro-9-metoxi-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4*H*-benzo[de][2,6]nafiridin-3-il) fosfonato de dietilo (**136**)



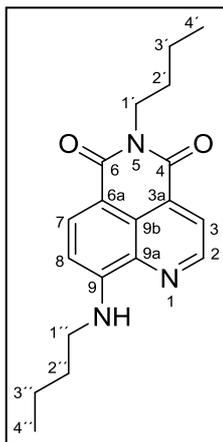
A una disolución **134** (12 mg, 0.021 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (5 ml), se añadió DIPEA (4 μL, 0.021 mmol) y bromuro del ácido bromoacético (2 μL, 0.021 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía flash, usando un gradiente 0-2.5 % de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente, para obtener la bromometilacetamida **136** (4 mg, 30 %) como un sirope amarillo. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) *t_R* = 2.92 min. ¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ: 1.41 [t, 6H, *J* = 7 Hz, CH₃(Et)], 3.70 (t, 2H, 2'-H), 3.84 (s, 2H, CH₂Br), 4.21

4.3.1.18. Marcaje fluorescente del péptido K5 con la bromometil acetamida **136**. Síntesis de K5-136.

El péptido usado en este estudio se adquirió de GL Biochem, (Shanghai, China), este se se marcó en su único residuo de cisteína mediante la bromometil acetamida **136**, añadiendo un exceso 5 a 10 veces de fluoróforo y agitándolos durante toda la noche. Luego, se purificó mediante columnas NAP-5 (GE Healthcare). Péptido K5: GVPSSALREICLLK;

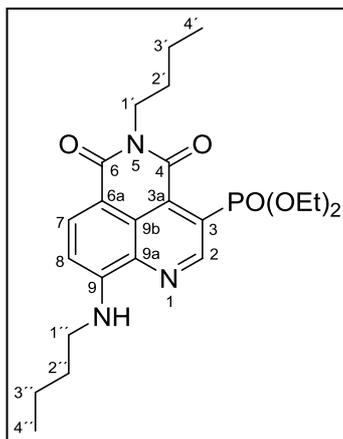
4.3.2. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE 9-AMINO-QUINOLIMIDAS

4.3.2.1. Síntesis de 5-butil-9-(butilamino)-4*H*-benzo[*de*][2,6]naftiridina-4,6(5*H*)-dione (**138**)



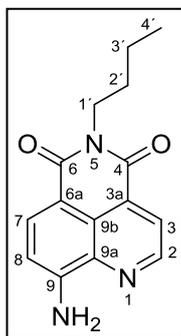
n-Butilamina (161 mg, 1.1 mmol) fué añadida a una disolución de la 9-metoxi-quinolimida compuesto **94** (0.22 mmol) en EtOH (3 ml) y la solución fue calentada a 120 ° mediante irradiación por MW durante 1.5 h. Más tarde, el disolvente fue evaporado y el crudo de reacción fue purificado mediante cromatografía flash, usando un gradiente 1-15 % de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente, para obtener la imida deseada **138** como un sólido naranja (44.2 mg, 62 %). P.f. 95 °C. HPLC-MS (30-95% gradiente de A en B en 10 min) *t_R* = 9.38 min. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.90 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, 4'-H), 0.95 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, 4''-H), 1.35 (sextete, 2H, *J* = 7.5, 3'-H), 1.47 (sextete, 2H, *J* = 7.5 Hz, 3''-H), 1.62 (quintuplete, 2H, *J* = 7.5 Hz, 2'-H), 1.75 (quintuplete, 2H, *J* = 7.5 Hz, 2''-H), 3.36 (dt, 2H, *J* = 7 y 5.5 Hz, 1'-H), 4.14 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, 1'-H), 6.68 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 8-H), 6.89 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz, NH), 8.20 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, 3-H), 8.34 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 7-H), 8.83 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, 2-H) ppm. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ = 14.0 (2xCH₃), 20.5 (C₃+ C_{3'}), 30.4 (C_{2'}), 31.1 (C_{2''}), 40.2 (C_{1'}), 42.8 (C_{1''}), 104.7 (C₈), 107.5 (C_{6a}), 123.0 (C₃), 124.1 (C_{9b}), 129.7 (C_{3a}), 135.1 (C₇), 136.6 (C_{9a}), 147.1 (C₂), 150.2 (C₉), 163.4 (C₆), 163.8 (C₄) ppm. HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. Para C₁₉H₂₄N₃O₂ ([M+H]⁺): 326.1863, Encd: 326.1793.

4.3.2.2. Síntesis de (5-butil-9-(butilamino)-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4H-benzo [de][2,6]-naftiridin-3-il) fosfonato de dietilo (139)



Siguiendo un procedimiento similar al de arriba descrito para la síntesis de **138**, a partir del de la metoxiquinolimida **95** (42 mg, 0.11 mmol), se obtuvo **139** como un sólido rojo (29 mg, 57 %). Pf: 90 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 8.56$ min. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 0.89 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, 4'-H), 0.95 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, 4''-H), 1.35 [t, 6H, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3(\text{OEt})$], 1.35 (m, 2H, 3'-H), 1.46 (sextete, 2H, $J = 7.5$ Hz, 3''-H), 1.61 (m, 2H, 2'-H), 1.74 (m, 2H, 2''-H), 3.36 (t, 2H, $J = 7$ Hz, 1''-H), 4.09 (m, 2H, 1'-H), 4.34 [m, 4H, $\text{CH}_2(\text{OEt})$], 6.73 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 6.94 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz, NH), 8.39 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H), 9.33 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, 2-H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 14.0 (C_4'), 14.0 (C_4''), 16.6 [$\text{CH}_3(\text{OEt})$], 20.4 (C_3'), 20.5 (C_3''), 30.3 (C_2), 31.0 (C_2'), 40.5 (C_1'), 42.9 (C_1''), 63.6 [d, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_2(\text{OEt})$], 105.5 (C_8), 107.6 (C_{6a}), 123.7 (d, $J = 11$ Hz, C_{9b}), 125.2 (d, $J = 189$ Hz, C_3), 133.2 (d, $J = 6$ Hz, C_{3a}), 135.9 (C_7), 138.5 (C_{9a}), 149.9 (C_9), 150.7 (d, $J = 10$ Hz, C_2), 162.5 (d, $J = 5$ Hz, C_4), 162.8 (C_6). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$ ($[\text{M}+1]^+$): 462.2152, Encd: 462.2167.

4.3.2.3. Síntesis de 9-amino-5-butil-4H-benzo[de][2,6]naftiridin-4,6(5H)-diona (140)

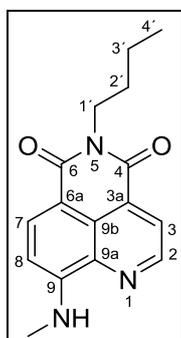


La 9-metoxiquinolimida **94** (50 mg, 0.176 mmol) se disolvió en disolución saturada de amoníaco en EtOH (5ml). La disolución se calentó a 150°C durante 3 horas mediante irradiación por MW. Posteriormente, se evaporó el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía circular, usando CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el derivado deseado **140** (25 mg, 50 %) como un sólido amarillo-anaranjado. Pf: 194 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 5.36$ min. ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 0.90 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, 4'-H), 1.36 (m, 2H, 3'-H), 1.62 (m, 2H, 2'-H), 4.07 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, 1'-H), 5.71 (s, 2H, NH_2), 6.91 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 8-H), 8.22 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 3-H),

8.30 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 7-H), 8.90 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 2-H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 14.2 ($\text{C}_{4'}$), 20.7 ($\text{C}_{3'}$), 30.5 ($\text{C}_{2'}$), 40.4 ($\text{C}_{1'}$), 109.9 (C_8), 110.1 (C_{6a}), 123.4 (C_3), 124.3 (C_{9b}), 129.9 (C_{3a}), 134.4 (C_7), 136.5 (C_{9a}), 148.1 (C_2), 150.3 (C_9), 163.4 (C_6), 163.9 (C_4). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 270.1237, Encd: 270.1230.

4.3.2.4. Síntesis de 5-butil-9-(metilamino)-4H-benzo[de][2,6]naftiridin-4,6(5H)-dione (141)

La 9-metoxi-quinolimida **94** (15 mg, 0.05 mmol), se disolvió en disolución saturada de metilamina en EtOH (2 ml) y la mezcla se agitó a 120 °C mediante irradiación por MW

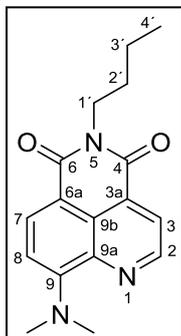


durante 2 horas. A continuación, el disolvente se evaporó y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash, usando CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el derivado deseado **141** (12 mg, 81.5 %) como un sólido naranja. Pf: 89.5 °C. HPLC-MS (30-95% gradiente de A en B, 10 min) $t_R = 6.94$ min. ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 0.90 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, 4'-H), 1.37 (m, 2H, 3'-H), 1.62 (m, 2H, 2'-H), 3.09 (d, 3H, $J = 5.5$ Hz, NHMe), 4.08 (t, 2H, 1'-H), 6.68 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 8-H), 6.93 (s, 1H, NH), 8.22 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 3-H), 8.37 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 7-H), 8.85 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 2-H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 12.9 ($\text{C}_{4'}$), 19.4 ($\text{C}_{3'}$), 28.7 ($\text{C}_{2'}$), 29.2 (NHMe), 39.1 ($\text{C}_{1'}$), 102.3 (C_8), 105.7 (C_{6a}), 120.9 (C_3), 121.8 (C_{9b}), 127.51 (C_{3a}), 132.9 (C_7), 134.5 (C_{9a}), 145.1 (C_2), 148.8 (C_9), 161.2 (C_6), 161.6 (C_4). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 284.1393, Encd: 284.1407.

4.3.2.5. Síntesis de 5-butil-9-(dimetilamino)-4H-benzo[de][2,6]naftiridina-4,6(5H)-diona (142)

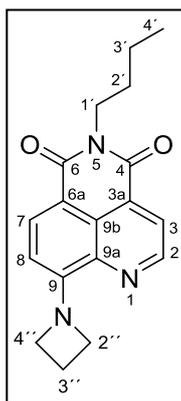
La 9-metoxi-quinolimida **94** (25 mg, 0.09 mmol) se añadió a una disolución saturada de *N,N*-dimetilamina en MeOH (2 ml) y se agitó a 160 °C mediante irradiación por MW durante 3 horas. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash, usando CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el 9-dimetilamino derivado **142** (13 mg, 49 %) como un sólido naranja. Pf: 128 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 7.47$ min. ^1H -RMN (CDCl_3 ,

500 MHz,) δ : 0.90 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, 4'-H), 1.37 (sextete, 2H, $J = 7.5$ Hz, 3'-H), 1.63 (m,



2H, 2'-H), 3.58 [s, 6H, N(CH₃)₂], 4.08 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, 1'-H), 6.93 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 8.20 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 3-H), 8.34 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H), 8.95 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 2-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 14.0 (C_{4'}), 20.6 (C_{3'}), 30.4 (C_{2'}), 40.3 (C_{1'}), 44.5 [N(CH₃)₂], 110.6 (C_{6a}), 112.4 (C₈), 122.3 (C₃), 125.4 (C_{9b}), 129.7 (C_{3a}), 133.3 (C₇), 140.0 (C_{9a}), 146.3 (C₂), 154.2 (C₉), 163.2 (C₆), 164.0 (C₄). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para C₁₇H₂₀N₃O₂ ([M+H]⁺): 298.1550, Encd: 298.1545.

4.3.2.6. Síntesis de 9-(azetidin-1-il)-5-butir-4H-benzo[de][2,6]naftiridin-4,6(5H)-diona (143)

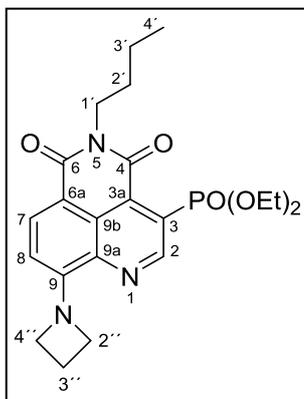


A una disolución de **94** (29 mg, 0.1 mmol) en EtOH (2.5 ml) se le añadió azetidina (42.5 μ l, 0.65 mmol) y se calentó a 120 °C mediante irradiación por MW durante 1.5 horas. A continuación, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía circular, usando CH₂Cl₂ como eluyente, obteniendo el derivado deseado **143** (10 mg, 33 %) como un sólido rojo. Pf: 109 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 8.18$ min. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.90 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, 4'-H), 1.37 (m, 2H, 3'-H), 1.62 (m, 2H, 2'-H), 2.47 (m, 2H, 3''-H), 4.07 (t, 2H, 1'-H), 4.54 (t, 4H, $J = 7.5$ Hz, 2''-y 4''-H), 6.36 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 2-H), 8.12 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 7-H), 8.25 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 3-H), 8.80 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 8-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 101 MHz) δ : 14.0 (C_{4'}), 17.7 (C_{3''}), 20.5 (C_{3'}), 29.8 (C_{2''} y 4''), 30.4 (C_{2'}), 40.2 (C_{1'}), 106.7 (C₈), 107.4 (C_{6a}), 122.4 (C₃), 125.2 (C_{9b}), 128.8 (C_{3a}), 133.6 (C₇), 138.6 (C_{9a}), 146.4 (C₂), 150.9 (C₉), 163.2 (C₆), 164.0 (C₄). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para C₁₈H₂₀N₃O₂ ([M+H]⁺): 310.155, Encd: 310.154.

4.3.2.7. Síntesis de (9-(azetidin-1-il)-5-butir-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4H-benzo[de][2,6]naftiridin-3-il) fosfonato de dietilo (144)

A una disolución de la 9-metoxi-quinolimida **95** (15 mg, 0.035 mmol) en EtOH seco (2.5ml), se le añadió azetidina (1.6 μ L, 0.21 mmol) y la mezcla se calentó a 120°C

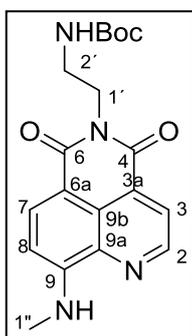
mediante irradiación por MW durante 1.5 horas. A continuación, se evaporó el disolvente



y el residuo se purificó mediante cromatografía circular, usando CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el derivado deseado **144** como un sirupe violeta (6 mg, 38 %). HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 7.21$ min. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 0.95 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, 4'-H), 1.42 [t, 6H, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3(\text{Et})$], 1.63 – 1.76 (m, 4H, 2'- y 3'-H), 2.51 – 2.62 (m, 2H, 3''-H), 4.11 – 4.19 (m, 2H, 1'-H), 4.40 [m, 4H, $\text{CH}_2(\text{Et})$], 4.54 – 4.71 (m, 4H), 6.48 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 8.38 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H), 9.37 (d, 1H, $J = 5$ Hz, 2-H).

HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 446.1839, Encd: 446.1840.

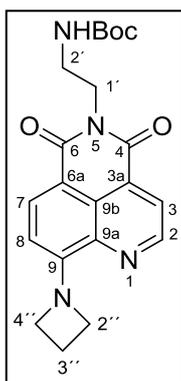
4.3.2.8. Síntesis de 5-(2-Boc-aminoetil)-9-metilamino-4H-benzo[de][2,6]naptiridin-4,6-(5H)-diona (**145**)



La 9-metoxi-quinolimida **96** (70 mg, 0.188 mmol), se disolvió en disolución saturada de metilamina en EtOH (5ml) y se calentó a 120°C mediante irradiación por MW durante 1.5 horas. Después, se evaporó el disolvente y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía circular, usando gradiente 0-20% de AcOEt en CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el metilamino derivado deseado **145** (40 mg, 58 %) como un sólido naranja. Pf: 225°C . HPLC-MS (30-95% gradiente de A en B, 10 min) $t_R = 4.98$ min. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.19 [s, 9H, $\text{CH}_3(\text{Boc})$], 3.04 (d, 3H, $J = 5.5$ Hz, NHMe), 3.39 (m, 2H, 2'-H), 4.20 (t, 2H, $J = 6$ Hz, 1'-H), 4.90 (s, 1H, NHMe), 6.61 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 6.90 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, NHBoc), 8.13 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 3-H), 8.29 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H), 8.78 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 2-H).

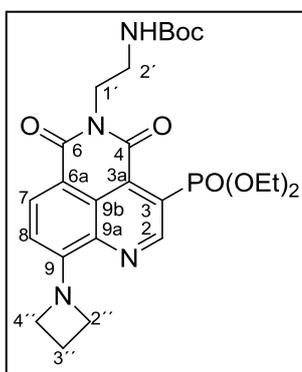
^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 28.3 (Boc), 29.7 ($\text{C}_{2'}$), 39.7 ($\text{C}_{1'}$), 40.0 (NHMe), 79.2 (Boc), 104.4 (C_8), 107.4 (C_{6a}), 123.1 (C_3), 124.0 (C_{9b}), 129.4 (C_{3a}), 135.2 (C_7), 136.6 (C_{9a}), 147.2 (C_2), 151.1 [$\text{CO}(\text{Boc})$], 156.1 (C_9), 163.6 (C_4), 164.1 (C_6). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 371.1713, Encd: 371.1720.

4.3.2.9. Síntesis de 9-(azetidín-1-il)-5-(2-Boc-aminoetil)-4H-benzo[de][2,6]naftiridin-4,6(5H)-diona (146)



A una disolución de la 9-metoxi-quinolimidina **96** (33 mg, 0.088 mmol) en EtOH (2.5ml), se añadió azetidina (30 μ L, 0.444 mmol) y se calentó a 120°C mediante irradiación por MW durante 1.5 horas. A continuación, se evaporó el disolvente y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía circular, usando CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el derivado deseado **146** como un sólido rojo (14 mg, 40 %). Pf: 185 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 6.20 min. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.26 [s, 9H, 3 x $\text{CH}_3(\text{Boc})$], 2.47 (m, 2H, 3''-H), 3.42 (m, 2H, 2'-H), 4.24 (t, 2H, J = 5 Hz, 1'-H), 4.54 (t, 4H, 2'' y 4''-H), 6.34 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 8-H), 8.11 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 3-H), 8.24 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 7-H), 8.79 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 2-H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 17.8 (Boc), 28.5 ($\text{C}_{3''}$), 29.8 ($\text{C}_{2''}$ y $\text{C}_{4''}$), 39.8 ($\text{C}_{2'}$), 55.2 ($\text{C}_{1'}$), 104.9 (Boc), 106.7 (C_8), 107.4 (C_{6a}), 122.5 (C_3), 125.4 (C_{9b}), 128.8 (C_{3a}), 133.8 (C_7), 138.7 (C_{9a}), 146.5 (C_2), 151.1 [$\text{CO}(\text{Boc})$], 156.1 (C_9), 163.5 (C_4), 164.4 (C_6). HRMS (ESI) m/z . Calcd. para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 397.1870, Encd: 397.1886.

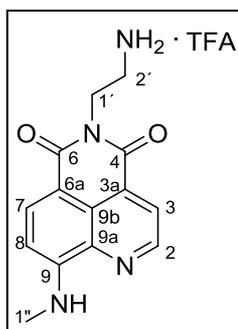
4.3.2.10. Síntesis de 9-(azetidín-1-il)-5-(2-Boc-aminoetil)-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4H-benzo[de][2,6]naftiridin-3-il)fosfonato de dietilo (147)



A una disolución de la 9-metoxi-quinolimidina **97** (15 mg, 0.029 mmol) en EtOH seco (2.5ml), se añadió azetidina (10 μ L, 0.147 mmol) y se calentó a 120°C mediante irradiación por MW durante 1.5 horas. Después, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía circular usando CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el derivado deseado **147** (12 mg, 80 %) como un sólido violeta. Pf: 210 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 6.05 min. ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 1.33 (s, 9H, Boc), 1.42 [t, 6H, J = 7 Hz, $\text{CH}_3(\text{Et})$], 2.57 (quintuplete, 2H, 3''-H), 3.51 (c, 2H, 2'-H), 4.35 (t, 2H, 1'-H), 4.36 – 4.46

[m, 4H, CH₂(Et)], 4.65 (t, 4H, 2' y 4''-H), 6.47 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 8-H), 8.37 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 7-H), 9.37 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz, 2-H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ: 16.7 (d, *J* = 6.5 Hz, C_{CH₃(Et)}), 17.7 (C_{3'}), 28.4 (C_{boc}), 40.0 (C_{1'}), 40.3 (C_{2'}), 63.5 (d, *J* = 6.5 Hz, C_{CH₂(Et)}), 79.1 (C_{4'}), 106.9 (C_{6a}), 107.3 (C₈), 123.8 (C₃), 124.8 (d, *J* = 10.5 Hz, C_{9b}), 131.8 (d, *J* = 6 Hz, C_{3a}), 134.8 (C₇), 140.6 (C_{9a}), 149.8 (d, *J* = 10 Hz, C₂), 150.6 (C₉), 156.1 (C_{3'}), 162.9 (C₆), 163.0 (C₄). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₂₅H₃₂N₄O₇P ([M+H]⁺): 533.2159, Encd: 533.2154.

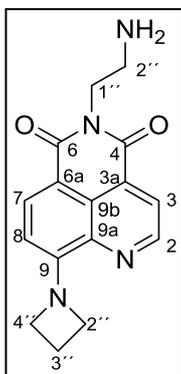
4.3.2.11. Síntesis de 5-(2-aminoetil)-9-(metilamino)-4*H*-benzo[de][2,6]naftiridin-4,6(5*H*)-diona trifluoroacetato (**148**)



A una disolución de la 5-(2-Boc-aminoetil)quinolimidina **145** (16 mg, 0.043 mmol) en CH₂Cl₂ (8 ml), se añadió TFA (53 μL, 0.69 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniendo el intermedio desprotegido **148** como un sólido naranja (16 mg, 100 %). Pf: 216 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) *t_R* = 0.44 min. ¹H-RMN (Acetona-*d*₆, 400 MHz) δ: 3.08 (s, 3H, NHMe), 3.31 (t, 2H, *J* = 5.5 Hz, 2'-H), 4.35 – 4.41 (m, 2H, 1'-H), 6.73 (d, 1H, 8-H), 7.69 (s, 1H, NH), 8.17 (d, 1H, 3-H), 8.27 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 7-H), 8.87 (d, 1H, 2-H). ¹³C-RMN (Acetona-*d*₆, 100 MHz) δ: 35.6 (C_{1'}), 37.1 (C_{2'}), 97.7 (C_{NHMe}), 102.6 (C₈), 104.1 (C_{6a}), 121.0 (C₃), 122.1 (C_{9b}), 126.9 (C_{3a}), 133.3 (C₇), 134.8 (C_{9a}), 145.2 (C₂), 150.0 (C₉), 161.8 (C₆), 162.5 (C₄). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₄H₁₅N₄O₂ ([M+H]⁺): 271.1189, Encd: 271.1185.

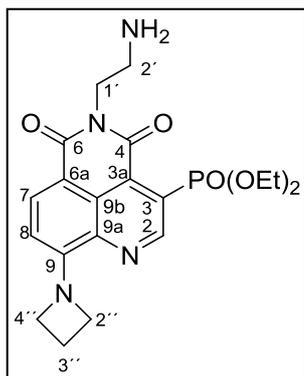
4.3.2.12. Síntesis de 5-(2-aminoetil)-9-(azetidín-1-il)-4*H*-benzo[de][2,6]naftiridin-4,6(5*H*)-diona (**149**)

A una disolución de 5-(2-Boc-aminoetil)quinolimidina **146** (31 mg, 0.027 mmol) en CH₂Cl₂ (5 ml), se le añadió TFA (53 μL, 0.69 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida, obteniendo el intermedio desprotegido **149** (23 mg, 100 %) como un sirope rojo-violeta. HPLC-MS



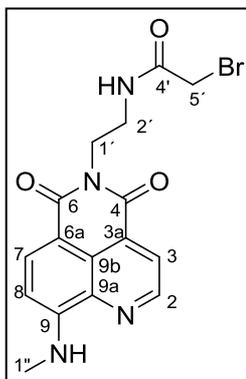
(gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 0.84$ min. $^1\text{H-RMN}$ (MeOD, 300 MHz) δ : 1.90 (m, 2H, 3''-H), 3.50 (t, 2H, $J = 7$ Hz, 2''-H), 3.66 (t, 2H, $J = 6$ Hz, 1''-H), 4.33 (t, 4H, $J = 5.5$ Hz, 2'' y 4''-H), 6.81 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 8.15 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 3-H), 8.23 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H), 8.85 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 2-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (MeOD, 75 MHz) δ : 32.4 ($\text{C}_{3''}$), 38.7 ($\text{C}_{4''}$), 40.1 ($\text{C}_{2''}$), 41.0 ($\text{C}_{2'}$), 60.6 ($\text{C}_{1'}$), 105.8 (C_8), 107.1 (C_{6a}), 124.0 (C_3), 125.4 (C_{9b}), 130.1 (C_{3a}), 134.7 (C_7), 136.3 (C_{9a}), 148.4 (C_2), 152.5 (C_9), 165.0 (C_4), 165.8 (C_6). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 297.1346, Encd: 297.1348.

4.3.2.13. Síntesis de (5-(2-aminoetil)-9-(azetidín-1-il)-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4H-benzo[de][2,6]naftiridin-3-il)fosfonato de dietilo (150)



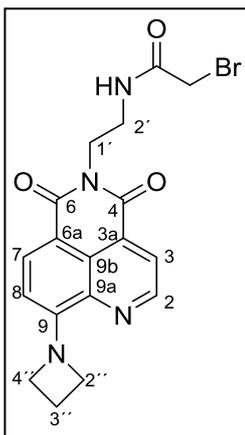
La 5-(2-Boc-aminoetil)quinolimidina **147** (10 mg, 0.018 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (5 ml) y se le añadió TFA (72 μL , 0.93mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Al terminar este periodo, el disolvente se evaporó, para obtener el compuesto deseado **150** (8 mg, 100 %) como un sirupe violeta. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 0.76$ min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1.36 [t, 6H, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3(\text{Et})$], 2.56 (quintuplete, 2H, $J = 8$ Hz, 3''-H), 3.46 (t, 2H, 2'-H), 4.21 – 4.32 [m, 4H, $\text{CH}_2(\text{Et})$], 4.35 (t, 2H, $J = 6$ Hz, 1'-H), 4.59 (m, 2H, 2'' y 4''-H), 6.44 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 8.31 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H), 9.13 (s, 1H, 2-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 16.1 [$\text{C}_{\text{CH}_3(\text{Et})}$], 16.2 ($\text{C}_{3''}$), 29.6 ($\text{C}_{2''}$ y 4''), 38.7 ($\text{C}_{1'}$), 38.9 ($\text{C}_{2'}$), 64.3 [d, $J = 6.5$ Hz, $\text{C}_{\text{CH}_2(\text{Et})}$], 98.7 (C_{6a}), 106.0 (C_8), 107.4 (C_3), 109.9 (C_{9b}), 131.4 (C_{3a}), 135.0 (C_7), 140.6 (C_{9a}), 148.2 (d, $J = 11$ Hz, C_2), 150.7 (C_9), 162.1 (C_6), 162.3 (C_4). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_5\text{P}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 433.1635, Encd: 433.1641.

4.3.2.14. Síntesis de 2-bromo-N-(2-(9-(metilamino)-4,6-dioxo-4H-benzo[de]-[2,6]naftiridin-5(6H)-il)etil)acetamida (151)



A una disolución del derivado desprotegido **148** (16 mg, 0.045 mmol) en CH_2Cl_2 (5 ml), se añadió bromuro del ácido bromoacético (6 μL , 0.07 mmol) y DIPEA (25 μL , 0.025 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Al terminar el proceso, se evaporó el disolvente a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía flash, usando 0-30% de AcOEt en CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el producto deseado **151** (13 mg, 82 %) como un sólido naranja. Pf: 182 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 2.92$ min. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 3.10 (d, 3H, $J = 5.5$ Hz, NHMe), 3.61 (m, 2H, 2'-H), 3.72 (s, 2H, CH_2Br), 4.35 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, 1'-H), 6.68 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 7.01 (s, 1H, NHMe), 7.12 (s, 1H, NH-CO), 8.21 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 3-H), 8.37 (d, 1H, $J = 8.5$, 7-H), 8.84 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 2-H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 29.0 (CH_2Br), 29.7 (NHMe), 38.7 ($\text{C}_{1'}$), 40.4 ($\text{C}_{2'}$), 104.6 (C_8), 107.1 (C_{6a}), 123.2 (C_3), 124.0 (C_{9b}), 129.1 (C_{3a}), 135.5 (C_7), 136.7 (C_{9a}), 147.2 (C_2), 151.3 (C_9), 163.8 (C_6), 164.3 (C_4), 166.1 (NH-CO). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{BrN}_4\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 391.0400, Encd: 391.0397.

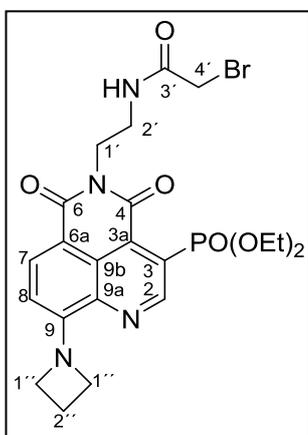
4.3.2.15. Síntesis de *N*-(2-(9-(azetidín-1-il)-4,6-dioxo-4*H*-benzo[de][2,6]naftiridin-5(6*H*)-il) etil)-2-bromoacetamida (**152**)



A una disolución del derivado desprotegido **149** (23 mg, 0.077 mmol) en CH_2Cl_2 (3 ml), se añadió DIPEA (6.5 μL , 0.037 mmol) y bromuro del ácido bromoacético (1.6 μL , 0.018 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Al terminar el proceso, se evaporó el disolvente y el residuo se purificó mediante cromatografía flash, usando gradiente 0-10% de MeOH en CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el derivado deseado **152** (10 mg, 32 %) como un sólido naranja. Pf: 190 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 4.54$ min. ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 2.50 (m, 2H, 3''-H), 3.59 (m, 2H, 2'-H), 3.72 (s, 2H, CH_2Br), 4.31 – 4.37 (m, 2H, 1'-H), 4.53 (t, 4H, 2''-H y 4''-H), 6.35 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 7.17 (sa, 1H, NH), 8.13 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 3-H), 8.24 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-

H), 8.81 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, 2-H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 17.6 ($\text{C}_{3''}$), 28.9 ($\text{C}_{\text{CH}_2\text{Br}}$), 38.5 ($\text{C}_{1'}$), 40.4 ($\text{C}_{2'}$), 106.3 (C_{6a}), 106.6 (C_8), 122.5 (C_3), 125.2 (C_{9b}), 128.1 (C_{3a}), 133.8 (C_7), 138.5 (C_{9a}), 146.3 (C_2), 150.9 (C_9), 163.5 (C_6), 164.4 (C_4), 166.0 (CONH). HRMS (ESI) m/z . Calcd. para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_3\text{Br}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 417.0556, encontrada: 417.0570.

4.3.2.16. Síntesis de (9-(azetidín-1-il)-5-(2-(2-bromoacetamido)etil)-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4H-benzo[de][2,6]naftiridin-3-il)fosfonato de dietilo (150)



A una disolución de **147** (8 mg, 0.018 mmol) en CH_2Cl_2 (3 ml), se le añadió DIPEA (6 μL , 0.037mmol) y Bromuro de Bromo acético (2 μL , 0.018 mmol), y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Una vez terminado, se evaporó el disolvente, y el crudo de la reacción se purificó mediante cromatografía flash, usando una elución 0-2% de MeOH en CH_2Cl_2 , para obtener el derivado deseado **150** (3 mg, 30 %) como un sirope violeta. HPLC-MS (30-95% gradiente de A en B, 10 min) $t_R = 4.54$ min. ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 1.35 [t, 6H, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3(\text{Et})$], 2.52 (quintuplete, 2H, $2''$ -H), 3.62 (c, 2H, $2'$ -H), 3.74 (s, 2H, CH_2Br) 4.33 (t, 2H, $1'$ -H), 4.36 – 4.46 [m, 4H, $\text{CH}_2(\text{Et})$], 4.65 (t, 4H, $2''$ y $4''$ -H), 6.42 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 8-H), 8.33 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H), 9.29 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, 2-H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 16.1 [$\text{C}_{\text{CH}_3(\text{Et})}$], 16.3 ($\text{C}_{2''}$), 28.1 ($\text{C}_{\text{CH}_2\text{Br}}$), 29.7 ($\text{C}_{1'}$), 38.5 ($\text{C}_{1'}$), 40.2. ($\text{C}_{2'}$), 65.0 [d, $J = 6.5$ Hz, $\text{C}_{\text{CH}_2(\text{Et})}$], 99.6 (C_{6a}), 106.6 (C_8), 106.8 (C_3), 111.9 (C_{9b}), 132.2 (C_{3a}), 134.6.0 (C_7), 141.6 (C_{9a}), 149.4 (d, $J = 11$ Hz, C_2), 150.9 (C_9), 162.3 (C_6), 162.6 (C_4) 165.0 (CONH). HRMS (ESI) m/z . Calcd. Para $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6\text{PBr}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 553.08943, encontrada: 553.0826.

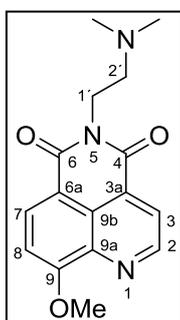
4.3.2.17. Marcaje fluorescente del péptido K5 con las bromometil acetamidas **151** y **152**. Síntesis de los péptidos K5-151 y K5-152.

El péptido usado en este estudio se adquirió de GL Biochem, (Shanghai, China), estos se marcaron en su único residuo de cisteína mediante la correspondiente bromometil acetamida **151** y **152**, añadiendo un exceso 5 a 10 veces de fluoróforo y agitándolos

durante toda la noche. Luego, se purificaron mediante columnas NAP-5 (GE Healthcare).
Péptido K5: GVPSSALREICLLK;

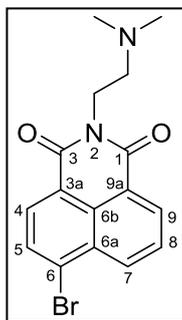
4.3.3. FLUORÓFOROS PET DERIVADOS DE NAFTALIMIDA Y QUINOLIMIDA

4.3.3.1. Síntesis de 5-(2-(dimetilamino)etil)-9-metoxi-4H-benzo[de][2,6]naftiridin-4,6-(5H)-diona (155)



N,N-dimetiletilenamina (0.24 mmol) se añadió a la disolución del anhídrido **86** (180 mg, 0.78 mmol). Sólido amarillo (140 mg, 61 %). Pf: 142 °C. HPLC-MS (30-95% gradiente de A en B, 10 min) t_R = 3.08 min. $^1\text{H-RMN}$ (Cl_3CD , 400 MHz) δ : 2.35 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 2.66 (t, 2H, J = 6.5 Hz, 2'-H), 4.21 (s, 3H, OMe), 4.30 (t, 2H, J = 6.5 Hz, 1'-H), 7.26 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 8-H), 8.33 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 3-H), 8.56 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 7-H), 9.20 (d, 1H, J = 4.4 Hz, 2-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (Cl_3CD , 100 MHz) δ : 38.3 ($\text{C}_{1'}$), 45.8 [$\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 56.9 (C_{OMe}), 57.0 ($\text{C}_{2'}$), 108.8 (C_8), 114.7 (C_{6a}), 123.1 (C_3), 124.2 (C_{9b}), 129.7 (C_{3a}), 133.6 (C_7), 139.0 (C_{9a}), 150.5 (C_2), 160.7 (C_9), 162.9 (C_6), 163.5 (C_4). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 300.1270, Encd: 300.1272.

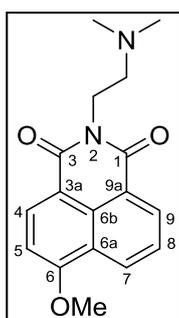
4.3.3.2. Síntesis de 6-bromo-2-(2-(dimetilamino)etil)-1H-benzo[de]isoquinolin-1,3-(2H)-diona (156)



N,N-dimetiletilenamina (70 μl , 0.64 mmol) se añadió a la disolución del anhídrido naftálico **116** (115 mg, 0.41 mmol) en EtOH seco (3 ml) y la mezcla se calentó a 120°C en MW durante 1.5 horas. A continuación, se evaporó el disolvente y el crudo de la reacción se purificó mediante cromatografía flash, usando gradiente 5-25% de MeOH en CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener la naftalimida **156**. Sólido amarillo (115 mg, 77 %). Pf: 79 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 0.45 min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 2.35 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 2.65 [t, 2H, J = 7.5 Hz, $\text{CH}_2(\text{NCH}_3)$], 4.32 (t, 2H, NCH_2), 7.84 (dd, 1H, J = 8.5 y 7.5 Hz, 8-H), 8.03 (d, 1H, J = 8

Hz, 5-H), 8.41 (d, 1H, $J = 8$ Hz, 4-H), 8.56 (dd, 1H, $J = 8.5$ y 1 Hz, 7-H), 8.65 (dd, 1H, $J = 7.5$ y 1 Hz, 9-H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 38.4 (C_{NCH_2}), 45.9 (Me), 57.0 ($\text{C}_{\text{CH}_2\text{NCH}_3}$), 122.3 ($\text{C}_{3\text{a}}$), 123.2 ($\text{C}_{9\text{a}}$), 128.2 (C_8), 129.2 ($\text{C}_{6\text{b}}$), 130.4 (C_6), 130.7 ($\text{C}_{6\text{a}}$), 131.2 (C_5), 131.4 (C_4), 132.2 (C_9), 133.4 (C_7), 163.8 (C_1), 163.8 (C_3). HRMS (ESI) m/z . Calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 349,0302, Encd: 349,0336.

4.3.3.3. Síntesis de 2-(2-(dimetilamino)etil)-6-metoxi-1H-benzo[de]isoquinolin-1,3-(2H)-diona (157)³⁶²

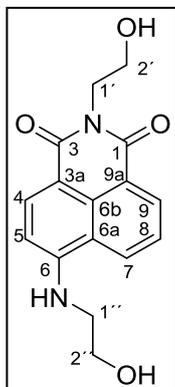


A una suspensión de K_2CO_3 (104 mg, 0.75 mmol) en MeOH (3 ml), se le añadió la correspondiente 6-bromo-1,8-naftalimida **156** (52 mg, 0.15 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 24 horas. Después, se enfrió a 5 °C durante 1 hora, formándose un precipitado, que se filtró, se lavó sucesivamente con MeOH y se secó toda la noche a vacío, para dar **157** (40 mg, 77 %). Sólido amarillo. Pf: 150 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 0.76$ min. ^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 2.36 [s, 6H, $\text{N}(\text{Me})_2$], 2.65 (t, 2H, CH_2NCH_3), 4.13 (s, 3H, OMe), 4.32 (t, 2H, NCH_2), 7.04 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 5-H), 7.70 (dd, 1H, 8-H), 8.55 (d, 2H, 4-H y 7-H), 8.60 (dd, 1H, $J = 7.5$ y 1.5 Hz, 9-H). ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 38.2 (C_{NCH_2}), 45.9 (C_{NCH_2}), 56.4 (C_{NCH_3}), 57.2 (C_{OMe}), 105.4 (C_5), 115.2 ($\text{C}_{3\text{a}}$), 122.5 ($\text{C}_{9\text{a}}$), 123.7 ($\text{C}_{6\text{a}}$), 126.1 (C_8), 128.9 (C_7), 129.6 ($\text{C}_{6\text{b}}$), 131.8 (C_9), 133.7 (C_4), 161.0 (C_{OCH_3}), 164.2 (C_3), 164.8 (C_1). HRMS (ESI) m/z . Calcd. para $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 299,13185, Encd: 299,13913.

4.3.3.4. Síntesis de la 2-(2-hidroxietil)-6-((2-hidroxietil)amino)-1H-benzo[de][2,6]isoquinolin-1,3(2H)-diona (158)

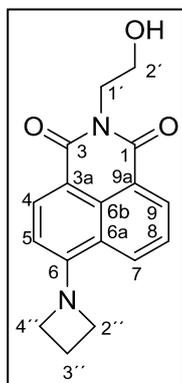
A una disolución de la naftalimida **117** (150 mg, 0.46 mmol) en EtOH (5 ml), se le añadió etanolamina (275 μL , 4.6 mmol) y la mezcla se calentó a 120 °C mediante irradiación por MW durante 1.5 horas. Se evaporó el disolvente y el crudo de la reacción se purificó

mediante cromatografía flash, usando gradiente 0-3 % de MeOH en CH₂Cl₂ como



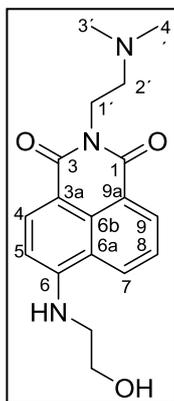
eluyente, para obtener el derivado deseado **158** (50 mg, 36 %) como un sólido anaranjado. Pf: 209 °C. HPLC-MS (5-95% gradiente de A en B, 10 min) t_R = 5.62 min. ¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 3.45 (c, 2H, *J* = 6 Hz, 1''-H), 3.58 (t, 2H, *J* = 7 Hz, 1'-H), 3.71 (t, 4H, *J* = 5.5 Hz, 2'-H), 4.10 (t, 2H, *J* = 7 Hz, 2''-H), 6.75 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 5-H), 7.63 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz, 8-H), 7.72 (s, 1H, NH), 8.20 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 4-H), 8.38 (d, 1H, *J* = 7 Hz, 7-H), 8.66 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 9-H). ¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 41.3 (C_{1'}), 45.6 (C_{1''}), 57.9 (C_{2'}), 58.8 (C_{2''}), 103.7 (C₅), 107.6 (C_{3a}), 120.0 (C_{6a}), 121.8 (C_{9a}), 124.1 (C₈), 128.5 (C₄), 129.3 (C_{6b}), 130.5 (C₉), 134.0 (C₇), 150.7 (C₆), 162.9 (C₁), 163.8 (C₃). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₆H₁₆N₂O₄ ([M+H]⁺): 301.1182, Encd: 301.1176.

4.3.3.5. Síntesis de la 6-(azetidino-1-il)-2-(2-hidroxi-etil)-1H-benzo[de]isoquinolin-1,3-(2H)-diona (**159**)



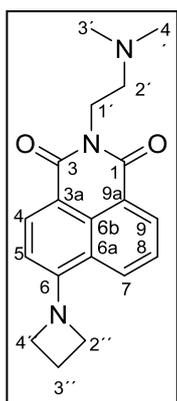
A una disolución de la naftalimida **117** (170 mg, 0.53 mmol) en EtOH (5 ml) se le añadió azetidina (178 μ L, 2.65 mmol) y se calentó a 120 °C mediante irradiación por MW durante 1.5 horas. La reacción se dejó enfriar, generándose un precipitado, que se filtró y se lavó con EtOH varias veces, obteniéndose el derivado deseado **159** (50 mg, 36 %) como un sólido rojo. Pf: 222 °C. HPLC-MS (gradiente 5-95% de A en B, 10 min) t_R = 7.09 min. ¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 2.53 (m, 2H, 3''-H), 3.50 – 3.67 (m, 2H, 1'-H), 4.09 (t, 2H, *J* = 7 Hz, 2'-H), 4.43 (t, 4H, *J* = 7.5 Hz, 2'' y 4''-H), 6.34 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 5-H), 7.52 (t, 1H, *J* = 8 Hz, 8-H), 8.11 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 4-H), 8.24 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, 7-H), 8.33 (d, 1H, *J* = 7 Hz, 9-H). ¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ 16.4 (C_{3''}), 41.3 (C_{1'}), 55.0 (C_{2''} y 4''), 57.9 (C_{2'}), 105.8 (C₅), 108.1 (C_{3a}), 119.9 (C_{6a}), 121.6 (C_{9a}), 123.6 (C₈), 129.7 (C₄), 130.4 (C_{6b}), 130.5 (C₉), 132.5 (C₇), 151.9 (C₆), 162.8 (C₁), 163.7 (C₃). HRMS (ESI) *m/z*: Calcd. para C₁₇H₁₆N₂O₃ ([M+H]⁺): 297.1233, Encd: 297.1222.

4.3.3.6. Síntesis de 2-(2-(dimetilamino)etil)-6-((2-hidroxietil)amino)-1H-benzo[de]isoquinolin-1,3(2H)-diona (160)



A una disolución de la 6-bromo-naftalimida **156** (50 mg, 0.14 mmol) en EtOH (5 ml), se le añadió etanolamina (52 μ L, 0.86 mmol) y la mezcla se calentó a 120 $^{\circ}$ C mediante irradiación por MW durante 3 horas. A continuación, se evaporó el disolvente y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash en fase reversa, usando gradiente 0-30 % de CH₃CN en H₂O como eluyente, para obtener el derivado deseado **160** (11 mg, 20%) como un sirupe amarillo. HPLC-MS (5-95% gradiente de A en B, 10 min) t_R = 4.36 min. ¹H-RMN (MeOD, 500 MHz) δ : 3.59 (t, 1H, J =6 Hz, 2'-H), 3.88 (t, 1H, J =6 Hz, 1'-H), 4.47 (t, 1H, J =6 Hz, CH₂NH), 4.59 [s, 6H, N(CH₃)₂], 4.93 (t, 1H, J =6 Hz, CH₂OH), 6.86 (d, 1H, 5-H), 7.66 (t, 1H, 8-H), 8.40 (d, 1H, J =8.5 Hz, 4-H), 8.54 – 8.57 (m, 2H, 9 y 7-H). ¹³C-RMN (MeOD, 125 MHz) δ : 35.4 [C_{N(CH₃)₂], 43.2 (C_{CH₂NH}), 45.2 (C_{1'}), 56.5 (C_{2'}), 59.3 (C_{CH₂OH}), 103.8 (C₅), 120.5 (C_{3a}), 121.8 (C_{6a}), 124.1 (C_{9a}), 128.2 (C₈), 131.1 (C₇), 133.7 (C_{6b}), 134.8 (C₉), 135.5 (C₄), 151.6 (C₆), 164.3 (C₃), 165.1 (C₁). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para C₁₈H₂₁N₃O₃ ([M+H]⁺): 328.1655, Encd: 328.1661.}

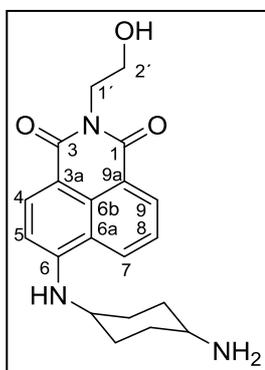
4.3.3.7. Síntesis de 6-(azetidín-1-il)-2-(2-(dimetilamino)etil)-1H-benzo[de]isoquinolin-1,3(2H)-diona (161)



A una disolución de la 6-bromo-naftalimida **156** (65 mg, 0.18 mmol) en EtOH (5 ml), se le añadió azetidina (75 μ L, 1.08 mmol) y la mezcla se calentó a 120 $^{\circ}$ C mediante irradiación por MW durante 1.5 horas. A continuación, se evaporó el disolvente y el crudo de la reacción se purificó mediante cromatografía flash, usando gradiente 1-10 % de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente, para obtener el derivado deseado **161** (50 mg, 85 %) como un sólido amarillo anaranjado. Pf: 152 $^{\circ}$ C. HPLC-MS (gradiente 5-95% de A en B, 10 min) t_R = 5.25 min. ¹H-RMN (CD₃Cl, 400 MHz) δ : 2.38 [s, 6H, N(CH₃)₂], 2.56 (c, 2H, J = 7.5 Hz, 3''-H), 2.65 – 2.70 (m, 2H, 2'-H), 4.31 (m, 2H, 1'-H), 4.48 (t, 4H, J = 7.5 Hz, 2'' y 4''-H), 6.36 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 5-H), 7.48 (dd, 1H, J = 8.5 y 7.5 Hz, 8-H), 8.21 (dd, 1H, J = 8.5 y 1 Hz, 7-H),

8.36 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 4-H), 8.52 (dd, 1H, $J = 7$ y 1 Hz, 9-H). ^{13}C -RMN (CD_3Cl , 100 MHz) δ : 17.1 ($\text{C}_{3'}$), 37.8 ($\text{C}_{1'}$), 45.7 [$\text{C}_{\text{N}(\text{CH}_3)_2}$], 55.4 ($\text{C}_{2''}$ y $4''$), 57.0 ($\text{C}_{2'}$), 106.3 (C_5), 110.2 (C_{3a}), 121.0 (C_{6a}), 122.7 (C_{9a}), 123.8 (C_8), 130.2 (C_7), 130.7 (C_{6b}), 131.2 (C_9), 133.4 (C_4), 152.6 (C_6), 164.1 (C_3), 164.8 (C_1). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 324.1580, Encd: 324.1586.

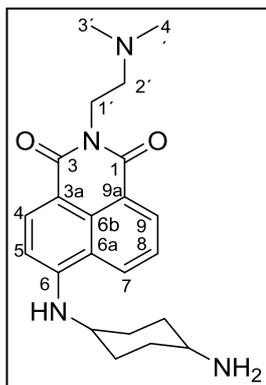
4.3.3.8. Síntesis de 6-((*trans*-4-aminociclohexil)amino)-2-(2-hidroxietyl)-1*H*-benzo[*de*]isoquinolin-1,3(2*H*)-diona (162)



A una disolución de la 6-bromo-naftalimida **117** (110 mg, 0.343 mmol) en EtOH (5 ml), se le añadió DIPEA (28 μL , 0.51 mmol) y 1,4-*trans*-diaminociclohexano (195 mg, 1.71 mmol). La mezcla se agitó a 150 $^\circ\text{C}$ en tubo sellado durante 5 días. Al terminar este proceso, se dejó enfriar, formándose un precipitado que se filtró y se recogió el sobrenante que se evaporó a sequedad, obteniendo el derivado deseado **162** (110 mg, 91 %) como un sólido marrón. Pf: 280 $^\circ\text{C}$. HPLC-MS (gradiente 5-95% de A en B, 10 min) $t_R = 4.61$ min. ^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 1.18 - 1.56 [2m, 4H, 2-, 3-, 5- y 6- H_{axial} (cHx)], 1.80 - 2.07 [2m, 4H, 2-, 3-, 5- y 6- H_{ec} (cHx)], 3.40 - 3.46 [m, 1H, *CH*- NH_2 (cHx)], 3.57 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, 1'-H), 3.61 - 3.65 [m, 1H, *CH*-NH (cHx)], 4.11 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, 2'-H), 6.82 (d, 1H, $J = 9$ Hz, 5-H), 7.30 (d, 1H, $J = 8$ Hz, NH), 7.64 (t, 1H, $J = 8.5$ y 7 Hz, 8-H), 8.23 (d, 1H, $J = 9$ Hz, 4-H), 8.41 (dd, 1H, $J = 7$ y 1 Hz, 9-H), 8.76 (dd, 1H, $J = 8.5$ y 1 Hz, 7-H). ^{13}C -RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ : 30.4 [$\text{C}_{2 \text{ y } 3}$ (cHx)], 34.7 [$\text{C}_5 \text{ y } 6$ (cHx)], 49.9 ($\text{C}_{1'}$), 51.2 [$\text{C}_{1(\text{cHx})}$], 56.0 ($\text{C}_{2'}$), 57.9 [$\text{C}_{4(\text{cHx})}$], 104.1 (C_5), 107.4 (C_{3a}), 120.1 (C_{6a}), 121.8 (C_{9a}), 123.9 (C_8), 128.8 (C_7), 129.6 (C_{6b}), 130.6 (C_9), 134.2 (C_4), 149.8 (C_6), 162.9 (C_3), 163.8 (C_1). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 354.1812, Encd: 354.1811.

4.3.3.9. Síntesis de 6-((*trans*-4-aminociclohexil)amino)-2-(2-(dimetilamino)etyl)-1*H*-benzo[*de*]isoquinolin-1,3(2*H*)-diona (163)

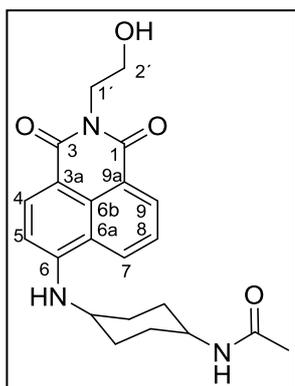
A una disolución de la 6-bromo-naftalimida **156** (110 mg, 0.31 mmol) en EtOH (5 ml), se le añadió DIPEA (26 μ L, 0.46 mmol) y *trans*-1,4-diaminaciclohexano (80 mg, 1.90 mmol) y la mezcla se calentó en tubo cerrado a 120 $^{\circ}$ C durante 2 días. Al terminar el proceso, el



crudo de la reacción se purificó mediante cromatografía flash en fase reversa, usando gradiente 0-15 % de CH_3CN en H_2O como eluyente, para obtener el derivado deseado **166** (38 mg, 32%) como un sólido amarillo oscuro. Pf: 178 $^{\circ}$ C HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 4.5$ min. ^1H -RMN [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400 MHz] δ : 1.58 – 1.77 [2m, 4H, 2-, 3-, 5- y 6- H_{axial} (cHx)], 1.83 – 1.94 [2m, 4H, 2-, 3-, 5- y 6- H_{ec} (cHx)], 2.27 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 2.56 (t, 2H, $J = 7$ Hz, 2'-H), 3.36 – 3.45 [m, 1H, CH-NH_2 (cHx)], 3.75 – 3.86 [m, 1H, CH-NH (cHx)], 4.23 (t, 2H, 1'-H), 6.69 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 5-H), 6.97 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, NH), 7.65 (t, 1H, $J = 8$ Hz, 8-H), 8.37 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 4-H), 8.50 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 9-H), 8.61 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 7-H). ^{13}C -RMN [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 100 MHz] δ : 31.5 [$\text{C}_{2 \text{ y } 3}$ (cHx)], 33.1 [$\text{C}_{5 \text{ y } 6}$ (cHx)], 38.4 ($\text{C}_{1'}$), 46.1 ($\text{C}_{\text{N}(\text{CH}_3)_2}$), 52.5 [$\text{C}_{1(\text{cHx})}$], 58.0 ($\text{C}_{2'}$), 59.5 [$\text{C}_{4(\text{cHx})}$], 105.3 (C_5), 109.9 (C_{3a}), 121.5 (C_{6a}), 123.8 (C_{9a}), 125.1 (C_8), 128.5 (C_7), 131.0 (C_{6b}), 131.5 (C_9), 135.1 (C_4), 150.5 (C_6), 164.2 (C_3), 165.0 (C_1). HRMS (ESI) m/z . Calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{N}_4$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 403.2104, Encd: 403.2091.

4.3.3.10. Síntesis de *N*-(*trans*-4-((2-(2-hidroxietil)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1*H*-benzo[*de*]isoquinolin-6-il)amino)ciclohexil)acetamida (**164**)

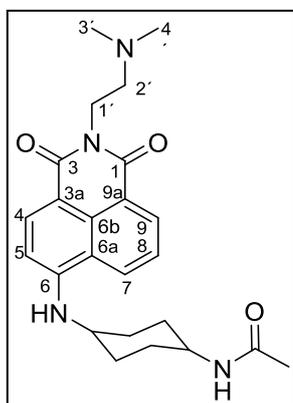
4.3.3.11.



A una disolución de la naftalimida **162** (40 mg, 0.11 mmol) en CH_2Cl_2 (5 ml), se le añadió Ac_2O (1 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Al terminar el proceso, se evaporó a sequedad y se purificó mediante cromatografía flash, usando gradiente 0-5 % de MeOH en CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el derivado deseado **164** (32 mg, 75%) como un sólido naranja. Pf: 116 $^{\circ}$ C. HPLC-MS (gradiente 5-95% de A en B, 10 min) $t_R = 7.29$ min. ^1H -RMN ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ : 1.29 – 1.60, 1.84 – 1.90 y 2.00 – 2.11 [3m, 8H, 2-, 3-, 5- y 6-H (cHx)], 3.07 (c, 1H, $J=7$ Hz, 2'-H), 3.53 – 3.59 [m, 2H, 1- y 4-H(cHx)], 3.61 – 3.69 (m, 2H, 1'-H), 4.28 (s, 3H), 6.89 (d, 1H, $J= 8.5$ Hz, 5-H), 7.39 (d, 1H,

$J = 7.5$ Hz, NH), 7.68 (t, 1H, $J = 8.5$, 8-H), 7.84 (m, 1H, NH), 8.26 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 4-H), 8.44 (dd, 1H, $J = 7.5$ y 1 Hz, 7-H), 8.79 (dd, 1H, $J = 8.5$ y 1 Hz, 9-H). ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 100 MHz,) δ : 23.2 ($\text{C}_{\text{CH}_3\text{CO}}$), 30.9 [C_2 y 3 (cHx)], 31.4 [C_5 y 6 (cHx)], 46.0 ($\text{C}_{1'}$), 47.8 y 51.3 [C_1 y 4 (cHx)], 61.5 ($\text{C}_{2'}$), 104.8 (C_5), 107.6 (C_{3a}), 120.5 (C_{6a}), 122.0 (C_{9a}), 124.5 (C_8), 129.5 (C_4), 130.1 (C_{6b}), 131.2 (C_9), 134.8 (C_7), 150.4 (C_6), 163.4 (C_1), 164.4 (C_3), 168.7 (COMe). HRMS (ESI) m/z . Calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 396.1917, Encd: 396.1918.

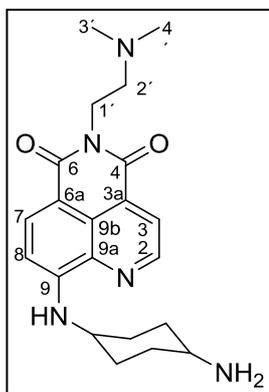
4.3.3.12. Síntesis de *N*-(*trans*-4-((2-(2-(dimetilamino)etil)-1,3-dioxo-2,3-dihidro-1*H*-benzo[de]isoquinolin-6-il)amino)ciclohexil)acetamida (165)



A una disolución de la naftalimida **163** (14 mg, 0.028 mmol) en CH_2Cl_2 y acetona seca [1 ml (9:1)], se le añadió Ac_2O (1 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Al terminar el proceso, la mezcla se evaporó a sequedad y el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía flash, usando gradiente 0-10 % de MeOH en CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el derivado acetilado **165** (12 mg, 80%) como un sólido naranja. Pf: 241 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 1.87$ min. ^1H -RMN (CD_3OD , 500 MHz) δ : 1.40-1.68 [m, 4H, 2-, 3-, 5- y 6- H_{axial} (cHx)], 1.91 (s, 3H, CH_3COcHx), 2.04-2.21 [m, 4H, 2-, 3-, 5- y 6- H_{ec} (cHx)], 2.86 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 3.29 (t, 2H, $J = 6$ Hz, 2'-H), 3.65 – 3.78 [m, 2H, 1- y 4-H (cHx)], 4.44 (t, 2H, $J = 6$ Hz, 1'-H), 6.84 (dd, 1H, $J = 8.5$ y 1 Hz, 5-H), 7.62 (dd, 1H, $J = 8.5$ y 7.5 Hz, 8-H), 8.34 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, 4-H), 8.49 (dd, 1H, $J = 7.5$ y 1 Hz, 9-H), 8.59 (dd, 1H, $J = 8.5$ y 1 Hz, 7-H). ^{13}C -RMN (CD_3OD , 125 MHz) δ : 22.6 (CH_3CO), 31.8 [C_2 y 3 (cHx)], 32.2 [C_5 y 6 (cHx)], 36.9 ($\text{C}_{1'}$), 44.6 [$\text{C}_{\text{N}(\text{CH}_3)_2}$], 52.5 [C_1 y 4 (cHx)], 57.9 ($\text{C}_{2'}$), 105.5 (C_5), 108.8 (C_{3a}), 121.9 (C_{6a}), 123.1 (C_{9a}), 125.3 (C_8), 129.8 (C_7), 131.6 (C_{6b}), 132.4 (C_9), 136.2 (C_4), 152.0 (C_6), 165.7 (C_3), 166.5 (C_1), 172.5 (COCH_3). HRMS (ESI) m/z . Calcd. para $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 423.2390, Encd: 423.2396.

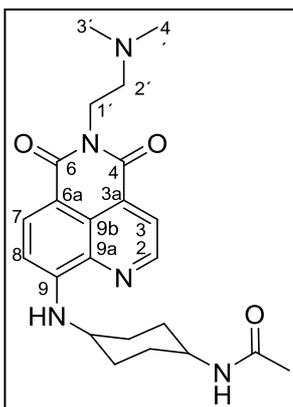
4.3.3.13. Síntesis de 9-((*trans*-4-aminociclohexil)amino)-5-(2-(dimetilamino)etil)-4*H*-benzo[de][2,6]naftiridin-4,6(5*H*)-diona (166)

A una disolución de la 9-metoxiquinolimida **155** (45 mg, 0.40 mmol) en EtOH (5 ml), se le añadió DIPEA (6 μ L, 0.05 mmol) y 1,4-*trans*-diaminociclohexano (33.5 μ L, 0.6 mmol). La mezcla se calentó a 150 $^{\circ}$ C en tubo sellado durante 7 días. Al terminar el proceso, el



crudo de la reacción se purificó mediante cromatografía flash, usando gradiente 0-10 % de MeOH en CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el derivado deseado **166** (137 mg, 90 %) como un sirupe rojizo. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 4.5 min. ^1H -RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ : 1.43 – 1.63 [2m, 4H, 2-, 3-, 5- y 6- H_{ax} (cHx)], 2.05 – 2.14-2.28 [2m, 4H, 2-, 3-, 5- y 6- H_{ec} (cHx)], 2.35 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 2.66 (t, 2H, J = 7 Hz, 2'-H), 2.92 – 3.03 [m, 1H, 1'-H (cHx)], 3.60 – 3.74 [m, 1H, 4-H (cHx)], 4.26 (t, 2H, J = 7 Hz, 1'-H), 6.94 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 8-H), 8.23 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 3-H), 8.30 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 7-H), 8.94 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 2-H). ^{13}C -RMN (CD_3OD , 100 MHz) δ : 31.6 [C_2 y 3 (cHx)], 33.0 [C_5 y 6 (cHx)], 38.5 ($\text{C}_{1'}$), 45.8 ($\text{C}_{\text{N}(\text{CH}_3)_2}$), 50.6 [$\text{C}_{1(\text{cHx})}$], 51.7 [$\text{C}_{4(\text{cHx})}$], 57.8 (C_2'), 106.2 (C_8), 107.7 (C_{6a}), 123.9 (C_3), 125.2 (C_{9b}), 130.4 (C_{3a}), 135.8 (C_7), 137.6 (C_{9a}), 148.4 (C_2), 150.9 (C_9), 164.5 (C_6), 165.0 (C_4).

4.3.3.14. Síntesis de *N*-(*trans*-4-((5-(2-(dimetilamino)etil)-4,6-dioxo-5,6-dihidro-4*H*-benzo[*de*][2,6]naftiridin-9-il)amino)ciclohexil)acetamida (**167**)



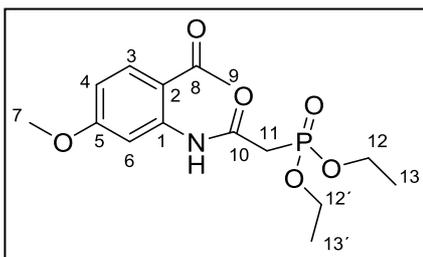
A una disolución de **166** (7 mg, 0.018 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1 ml), se le añadió Ac_2O (1 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Al terminar el proceso, la disolución se evaporó a sequedad y el crudo de la reacción se purificó mediante cromatografía flash, usando gradiente 0-5 % de MeOH en CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el derivado acetilado **167** (5 mg, 65%) como un sólido naranja-rojizo. Pf: 230 $^{\circ}$ C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 5.65 min. ^1H -RMN (CD_3OD , 500 MHz) δ : 1.49 y 1.60 [2td, 4H, 2-, 3-, 5- y 6- H_{axial} (cHx)], 1.94 (s, 3H, CH_3COcHx), 2.01 - 2.26 [m, 4H, 2-, 3-, 5- y 6- H_{ec} (cHx)], 2.58 [s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 2.96 (t, 2H, J = 6.5 Hz, 2'-H), 3.66 – 3.78 [m, 2H, 1- y 4-H (cHx)], 4.36 (t, 2H, J = 6.5 Hz, 1'-H), 6.95 (d, 1H, 8-H), 8.27 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 3-H), 8.35 (d, 1H, J = 8.5 Hz, 7-H), 8.97 (d, 1H, J = 4.5 Hz, 2-H). ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125

MHz) δ 21.1 y 30.5 [$C_{2,3,5}$ y 6 (CH_x)], 30.6 (C_1), 36.3 [$C_{N(CH_3)_2}$], 43.7 [$C_{1(CH_3)}$], 50.4 [C_4 (CH_x)], 56.3 ($C_{2'}$), 104.7 (C_8), 106.0 (C_{6a}), 122.5 (C_3), 125.4 (C_{9b}), 128.2 (C_{3a}), 128.9 (C_7), 134.6 (C_{9a}), 136.3 (C_2), 146.9 (C_9), 149.7 (C_6), 163.8 (C_4), 171.0 (COCH₃). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $C_{23}H_{29}N_5O_3$ ([M+H]⁺): 424.2343, Encd: 424.2340.

4.3.4. ANTENAS DE LANTÁNIDOS

4.3.4.1. Síntesis de derivados de carboestirilo

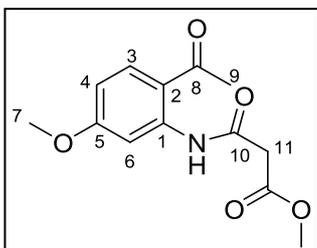
4.3.4.1.1. Síntesis de (2-((2-acetil-6-metoxifenil)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo (169)



A una disolución de la 2-amino-4-metoxiacetofenona **168** (75 mg, 0.45 mmol) y ácido dietilfosfonoacético (81 μ L, 0.494 mmol) en CH_2Cl_2 seco (5 ml), se le añadió HATU (205 mg, 0.54 mmol) y DIPEA (220 μ L, 1.233 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas.

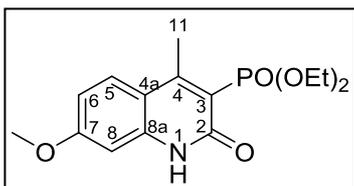
Después de este período, la transformación fue incompleta. Entonces, se añadió más ácido dietilfosfonoacético (40 μ L, 0.24 mmol), HATU (102 mg, 27 mmol) y DIPEA (110 μ L, 0.615 mmol). La mezcla se agitó durante 45 minutos más. A continuación, el disolvente se evaporó a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía flash, usando gradiente 0-5% de MeOH en CH_2Cl_2 como eluyente, obteniendo el producto deseado **169** (124 mg, 80 %) como un sirupe amarillo. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 3.35 min. ¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 400 MHz] δ : 1.17 [m, 6 H, CH₃(Et)], 2.48 (s, 3H, CH₃CO), 3.05 (d, 2H, 11-H), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.96 – 4.10 [m, 4H, CH₂(Et)], 6.61 (dd, 1H, J = 9 y 2.5 Hz, 4-H), 7.92 (d, 1H, J = 9 Hz, 3-H), 8.22 (dd, 1H, J = 2.5 y 1 Hz, 6-H), 12.06 (s, 1H, N-H). ¹³C-RMN [(CD₃)₂CO, 100 MHz] δ : 16.5 [d, J = 6 Hz, $C_{CH_3(Et)}$], 28.4 (C_9), 55.5 (C_{OMe}), 63.2 [d, J = 6.5 Hz, $C_{CH_2(Et)}$], 105.4 (C_6), 109.1 (C_4), 116.2 (C_2), 135.3 (C_3), 143.7 (C_1), 164.5 (d, J = 6 Hz, C_{10}), 165.3 (C_5), 201.8 (C_8).

4.3.4.1.2. Síntesis de 3-((2-acetil-5-metoxifenil)amino)-3-oxopropanoato de metilo (170)



Una disolución de la -amino-4-metoxi-acetofenona **168** (50 mg, 0.3 mmol) y 3-cloro-3-oxopropanoato de metilo (74 μ L, 0.54 mmol) en CH_2Cl_2 seco (5 ml), se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida y el residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 (50 ml). La disolución se lavó sucesivamente con H_2O (50 ml) y salmuera (500 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó a sequedad, para obtener el compuesto deseado **170** (80 mg, 100 %) como un aceite amarillo. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A a B, 10 min) $t_R = 3.54$ min. ^1H -RMN (CD_3Cl , 400 MHz) δ : 2.60 (s, 3H, CH_3CO), 3.53 (s, 2H, 11-H), 3.80 (s, 3H, OMe), 3.88 (s, 3H, CO_2Me), 6.64 (dd, 1H, $J = 9$ y 2.5 Hz, 4-H), 7.82 (d, 1H, $J = 9$ Hz, 3-H), 8.40 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, 6-H), 12.42 (s, 1H, N-H). ^{13}C -RMN (CD_3Cl , 100 MHz) δ : 28.3 (C_9), 45.0 (C_{11}), 52.7 ($\text{C}_{\text{CO}_2\text{Me}}$), 55.7 (C_{OMe}), 104.5 (C_6), 110.2 (C_4), 115.7 (C_2), 133.6 (C_3), 143.2 (C_1), 164.8 (C_{10}), 164.9 (C_5), 167.8 ($\text{C}_{\text{CO}_2\text{Me}}$), 201.1 (C_8). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 266.1023, Encd: 266.1015.

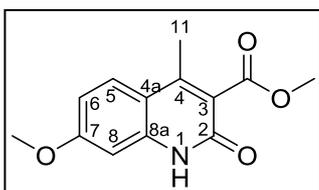
4.3.4.1.3. Síntesis de (7-metoxi-4-metil-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-3-il) fosfonato de dietilo (171)



A una disolución de la acetofenona **169** (45 mg, 0.131 mmol) en DMF seco (3 ml) se añadió NaH (6 mg, 0.235 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 5 horas. Después, se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía flash, usando un gradiente 0-5 % de MeOH en CH_2Cl_2 como eluyente, obteniendo la quinolinona **171** (13 mg, 30 %) como un sólido color beis. Pf: 195 $^\circ\text{C}$. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A a B, 10 min) $t_R = 2.08$ min. ^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ : 1.08 y 1.26 [2t, 6H, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3(\text{Et})$], 2.37 (s, 3H, 11-H), 3.58 – 3.67 [m, 4H, $\text{CH}_2(\text{Et})$], 3.80 (s, 3H, OMe), 6.79 (s, 1H, 8-H), 6.83 (d, $J = 9$ Hz, 1H, 6-H), 7.61 (d, 1H, $J = 9$ Hz, 5-H) ^{13}C -RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) δ : 16.7 y 17.1 [2d, $J = 6.5$ Hz, $\text{CH}_3(\text{Et})$], 18.9 (C_{11}), 55.7 (OMe), 59.5 [d, $J = 5.5$ Hz,

$CH_2(Et)$], 98.6 (C_8), 110.6 (C_6), 114.1 (C_{4a}), 126.7 (C_5), 140.8 (C_4), 148.2 (C_{8a}), 161.3 (C_7), 162.4 (C_2), 166.7 (C_3). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $C_{15}H_{20}NO_5P$ ($[M+H]^+$): 326.1151, Encd: 326.1153.

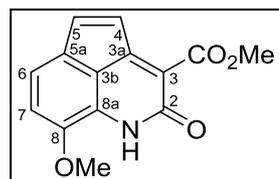
4.3.4.1.4. Síntesis de 7-metoxi-4-metil-2-oxo-1,2-dihidroquinolina-3-carboxilato de metilo (172)



A una disolución de la acetofenona **170** (60 mg, 0.22 mmol) en MeOH (8 ml), se añadió K_2CO_3 (47 mg, 0.33 mmol) y se calentó a 70 °C mediante irradiación de MW durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió y se evaporó a presión reducida. A continuación, el crudo de la reacción se disolvió en CH_2Cl_2 (50 ml) y se lavó con H_2O (20 ml) y salmuera (20 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad, obteniendo el derivado deseado **172** (56 mg, 100 %) como un sólido color beis, utilizándose en el siguiente paso sin purificación adicional. Pf: 188 °C. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A a B, 10 min) t_R = 2.42 min. 1H -RMN [$(CD_3)_2CO$, 400 MHz] δ : 2.27 (s, 3H, 11-H), 3.71 (s, 3H, CO_2Me), 3.76 (s, 3H, OMe), 6.74 (d, 1H, J = 9 Hz, 6-H), 6.86 (s, 1H, 8-H), 7.62 (d, 1H, J = 9 Hz, 5-H). ^{13}C -RMN [$(CD_3)_2CO$, 100 MHz] δ : 14.9 (C_{11}), 50.8 (C_{CO_2Me}), 54.5 (C_{OMe}), 97.7 (C_8), 110.6 (C_6), 112.5 (C_{4a}), 123.7 (C_3), 126.4 (C_5), 139.9 (C_{8a}), 144.4 (C_4), 158.5 (C_2), 161.7 (C_7), 166.3 (C_{CO_2Me}). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $C_{13}H_{13}NO_4$ ($[M+H]^+$): 248.0917, Encd: 248.0917.

4.3.4.2. Síntesis de derivados de dihidrociclopenta[de]quinolin-3-ona

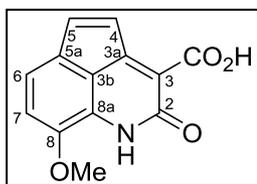
4.3.4.2.1. Síntesis de 8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxilato de metilo (177)³⁶³



A una disolución del éster metílico **73** (162 mg, 0.66 mmol) en tolueno (5 ml), se le añadió 2,3-dicloro-5,6-diaciano-p-benzoquinona (180 mg, 0.79 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 4 horas. A continuación, el crudo de reacción se evaporó a sequedad y se purificó mediante cromatografía flash, utilizando gradiente 0-5% de MeOH en CH_2Cl_2 como eluyente, para obtener el derivado deseado **177** (70 mg,

42%) como un sólido rojizo. Pf: 203 °C HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) $t_R = 2.32$ min. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 3.89 (s, 3H, OMe), 3.91 (s, 3H, CO_2Me), 6.62 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 7-H), 6.82 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, 4-H), 6.96 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 6-H), 7.05 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, 5-H), 9.79 (s, 1H, NH). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 52.5 ($\text{C}_{\text{CO}_2\text{Me}}$), 56.4 (C_{OMe}), 110.8 (C_7), 118.3 (C_{3b}), 119.86 (C_3), 120.1 (C_6), 125.4 (C_{8a}), 126.3 (C_4), 131.5 (C_{5a}), 141.05 (C_5), 147.6 (C_8), 152.7 (C_{3a}), 161.6 (C_2), 164.7 (C_3). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClNO}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 258.0760, Encd: 258.0756.

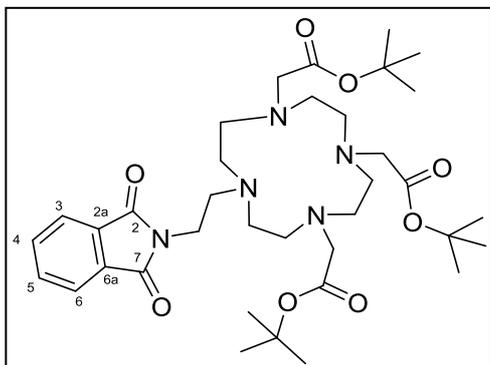
4.3.4.2.2. Síntesis del ácido 8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta-[de]-quinolina-3-carboxílico (178)



Al éster metílico **177** (200 mg, 0.77 mmol), se le añadió una disolución de NaOH 2N (5 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 30 minutos. A continuación, se liofilizó y el residuo se purificó mediante cromatografía flash en fase reversa, usando gradiente 0-10% de CH_3CN en H_2O como eluyente, obteniendo el ácido carboxílico deseado **178** (150 mg, 80 %) como un sólido naranja-rojizo. Pf: 274 °C. HPLC-MS (gradiente 5-95% de A en B, 10 min) $t_R = 7.93$ min. $^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 400 MHz) δ : 3.76 (s, 3H, OMe), 6.59 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, 4-H), 6.62 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 7-H), 6.96 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, 5-H), 6.98 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 6-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O , 100 MHz) δ : 55.8 (C_{OMe}), 109.5 (C_7), 119.0 (C_{3b}), 119.1 (C_3), 120.0 (C_6), 124.4 (C_{8a}), 128.0 (C_4), 130.7 (C_{5a}), 137.0 (C_5), 144.1 (C_{3a}), 150.0 (C_8), 166.2 (C_2), 174.0 (COOH). HRMS (ESI) m/z : Calcd. para $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 244.0604, Encd: 244.0604.

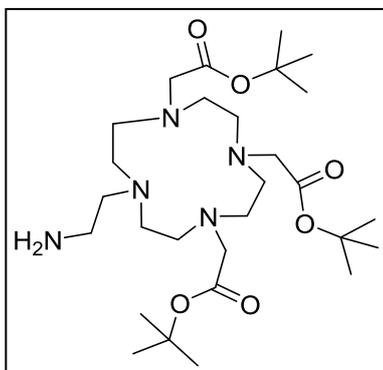
4.3.4.2.3. Síntesis 2,2',2''-(10-(2-(1,3-dioxoisindolin-2-il)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de tri-*tert*-butilo (181)³⁶⁴

Una disolución de 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triacetato de trí-*tert*-butilo (DO3A, **180**) (250 mg, 0.486 mmol), *N*-(2-bromoetilftalimida) **179** (151 mg, 0.58 mmol) y Cs_2CO_3 (315 mg, 0.972 mmol) en CH_3CN seco (10 ml) se calentó a reflujo en atmósfera de Ar_2 durante 16 horas. A continuación, el residuo se disolvió en cloroformo y se formó un precipitado que se filtró. El sobrenadante se evaporó a sequedad para dar **181** (335



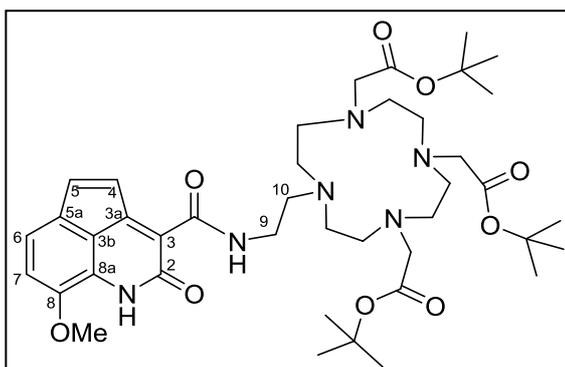
mg, 100 %) como un aceite amarillo. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 1.11 min. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 1.31 – 1.44 [m, 27 H, $\text{CH}_3(\text{Boc})$], 2.52 – 3.45 [m, 24 H, $\text{CH}_2(\text{ciclono})$], $\text{CH}_2\text{-Boc}$ y $\text{CH}_2\text{-ftalimida}$), 3.64 (t, $J = 6.5$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-DO3A}$), 7.80 – 7.83 y 7.84 – 7.88 (2m, 4H, 3-, 4-, 5- y 6-H). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 28.0 ($\text{CH}_3\text{-Boc}$), 51.7 ($\text{CH}_2\text{-ftalimida}$), 52.2 (m, $\text{CH}_2\text{-DO3A}$ y $\text{CH}_2\text{-Boc}$), 56.5 ($\text{CH}_2\text{-Boc}$), 56.7 ($\text{CH}_2\text{-Boc}$), 80.1 [C(Boc)], 80.2 [C(Boc)], 123.2 (C_3 y 6), 132.0 (C_4 y 5), 134.6 (C_{2a} y 6a), 168.2 [$\text{CO}_2(\text{Boc})$], 170.7 [CO(ftalimida)], 170.84 [CO(ftalimida)].

4.3.4.2.4. Síntesis de 2,2',2''-(10-(2-aminoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de tri-*terc*-butilo (**182**)³⁶⁴



A una disolución de **181** (450 mg, 0.65 mmol) en MeOH (20 ml) se le añadió hidrazina monohidrato (64 μL , 1.30 mmol). La reacción se calentó a reflujo durante 4 horas. A continuación, se evaporó el disolvente y se trató con CH_2Cl_2 , generándose un precipitado que se filtró. Los filtrados se lavaron con H_2O (5 ml) y salmuera (5 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron a sequedad, Obteniendo el compuesto deseado **182** (362 mg, 100 %) como un aceite amarillo. HPLC-MS (gradiente 30-95% de A en B, 10 min) t_R = 0.75 min. $^1\text{H-RMN}$ (CD_3Cl , 400 MHz) δ : 1.35 [s, 27H, (CH_3Boc)], 2.41 – 2.98 [m, 20H, $\text{CH}_2(\text{ciclono})$ y $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$], 3.17 – 3.43 (m, 6H, CH_2CO). $^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3Cl , 100 MHz) δ 28.12, 28.21 y 28.24 [$\text{CH}_3(\text{Boc})$], 37.53 ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$), [50.29, 50.65, 51.18 y 55.92 [$\text{CH}_2(\text{ciclono})$], 56.36 ($\text{CH}_2\text{-DO3A}$), 80.61, 81.14 y 81.68 [C(Boc)], 170.84 [CO(Boc)], 170.93 [CO(Boc)], 171.40 [CO(Boc)].

4.3.4.2.5. Síntesis de 2,2',2''-(10-(2-(8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxamido)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de tri-*tert*-butilo (183)

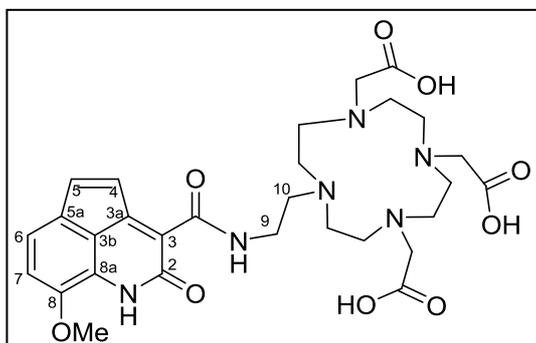


A una disolución de la ciclopentaquinolinona **178** (70 mg, 0.288 mmol) y el derivado de DO3A **182** (176 mg, 0.31 mmol) en DMF (10 ml), se le añadió HBTU (130 mg, 0.345 mmol) y HOBT (53 mg, 0.345 mmol) y DIPEA (60 μ L, 0.345 mmol). La mezcla se agitó en atmósfera de Ar₂ durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, se

evaporó a sequedad y el residuo se purificó mediante cromatografía flash, usando gradiente 0-5 % de MeOH en CH₂Cl₂ como eluyente, obteniendo el derivado deseado **183** (120 mg, 53 %) como un sirupe naranja. HPLC-MS (gradiente 5-95% de A en B, 10 min) $t_R = 7.32$ min. ¹H-RMN [(CD₃)₂CO, 400 MHz] δ : 1.31 [s, 27H, CH₃(Boc)], 1.32 – 1.39 y 1.87 – 1.95 [2m, 20H, CH₂(ciclono) y CH₂-Boc], 2.41 (s, 2H, CH₂-Boc), 3.22 – 3.28 [m, 2H, CH₂(ciclono)], 3.43 – 3.53 (m, 2H, CH₂-NCO), 3.86 (s, 3H, OMe), 6.82 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 7-H), 7.07 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 6-H), 7.11 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, 5-H), 7.55 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, 4-H), 10.03 (t, 1H, $J = 6$ Hz, NH). ¹³C-RMN [(CD₃)₂CO, 125 MHz] δ : 28.2 [CH₃(Boc)], 29.4 y 30.2 [CH₂(ciclono)], 36.6 (CH₂-NCO), 43.4 [CH₂ (ciclono)], 55.4 (CH₂Boc), 56.8 (C_{OMe}), 82.7 y 82.7 [C(Boc)], 112.1 (C₇), 119.6 (C_{3b}), 119.8 (C_{3a}), 121.2 (C₆), 125.6 (C_{8a}), 129.3 (C₄), 132.3 (C_{5a}), 141.4 (C₅), 148.7 (C₈), 154.4 (C₃), 164.8, 164.9 y 165.0 [CO(Boc) y C₂], 174.0 (CONH).

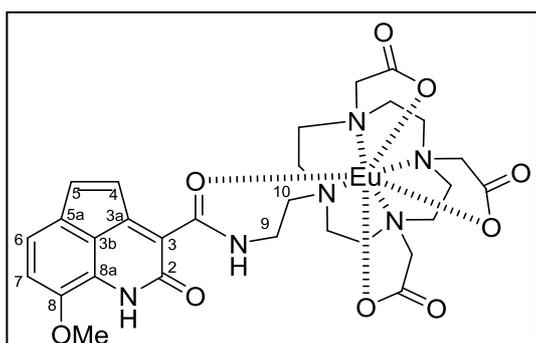
4.3.4.2.6. Síntesis del ácido 2,2',2''-(10-(2-(8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta-[de]quinolina-3-carboxamido)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacético (184)³⁶⁵

Una disolución del éster *tert*-butílico **183** (40 mg, 0.05 mmol) en TFA (2 ml), se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de Ar₂ durante 1.5 horas. A continuación, se evaporó el TFA y el residuo se purificó por HPLC-semipreparativa en uña columna



SunFire Prep C18 OBD de 5 μm (19x150 mm), obteniendo el derivado deseado **184** (8 mg, 25 %) como un sólido naranja claro. HPLC-MS (gradiente 2-30% de A en B, 10 min) t_{R} = 8.80 min. $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 500 MHz) δ : 2.89 – 3.37 [m, 16H, CH_2 (ciclono)], 3.39 – 3.46 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-NCO}$ y CH_2 -ciclono), 3.48 (s, 2H, CH_2CO_2), 3.63 (s, 3H, OMe), 3.65 – 3.71 (m, 4H, CH_2CO_2), 6.33 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 7-H), 6.60 (d, 1H, $J = 5$ Hz, 5-H), 6.64 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, 6-H), 6.73 (d, 1H, $J = 5$ Hz, 4-H). $^{13}\text{C-RMN}$ [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 125 MHz] δ : 35.2 ($\text{CH}_2\text{-NCO}$), 45.6 (CH_2 -ciclono), 47.7 y 48.3 ($\text{CH}_2\text{-CO}_2$), 50.4 y 51.1 (CH_2 -ciclono), 54.2 (C_{OMe}), 55.9 y 56.3 (CH_2 -ciclono), 111.0 (C_7), 115.8 (C_3), 117.5 ($\text{C}_{3\text{b}}$), 121.6 (C_6), 123.0 ($\text{C}_{8\text{a}}$), 126.0 (C_5), 130.1 ($\text{C}_{5\text{a}}$), 141.3 (C_4), 147.5 (C_8), 153.0 ($\text{C}_{3\text{a}}$), 163.3 (C_2), 165.5 (CONH), 169.7 (CO_2H). HRMS (ESI): Calcd. para $\text{C}_{41}\text{H}_{63}\text{N}_6\text{O}_9$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 783.4651, Encd: 783.4664.

4.3.4.2.7. Síntesis de 2,2',2''-(10-(2-(8-metoxi-2-oxo-1,2-dihidrociclopenta[de]quinolina-3-carboxamido)etil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil)triacetato de europio (III) (185)³⁶⁵



A una disolución de **184** en H_2O (310 μl , 10 mmol), se le añadió disolución de EuCl_3 en H_2O (310 μl , 50 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, obteniendo una disolución 5 milimolar del compuesto deseado **185**.

HPLC-MS (gradiente 5-95% de A en B, 10 min) t_{R} = 5.38 min. HRMS (ESI): Calcd. para $\text{C}_{41}\text{H}_{63}\text{N}_6\text{O}_9$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 783.4651, Encd: 783.466

4.4. MÉTODOS FOTOFÍSICOS

4.4.1. Experimentos de fluorescencia

Los espectros de UV-visible se registraron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35, utilizando sub-microcubetas Starna Cells de 100 μl (16.100-Q-10) con 1 cm de paso óptico.

Los espectros de fluorescencia en estado estacionario fueron registrados a temperatura ambiente en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50 B, utilizando sub-microcubetas de 100 μl Starna Cells (16.100F-Q-10) con 0.5 cm de paso óptico para la excitación y 0.1 cm para la emisión. Los espectros de emisión y excitación de los compuestos fueron determinados a 7,5 μM , 12 μM y 44 μM , en disolventes de distinta polaridad. Las señales se recogieron entre 300 y 700 nm (incrementos de 0.5 nm y un tiempo de integración de 0.1 s). Las aperturas de las rendijas se fijaron a 15 nm para la excitación y a 6 o 12 nm para la emisión, dependiendo de la intensidad. Todos los espectros se corrigieron para quitar la fluorescencia de fondo, restando el blanco a la disolución de disolvente.

Para los estudios de la cinética de reacción de **178** con tioles se utilizó un espectrofluorímetro de 64 pocillos Synergy HT, Biotek (λ_{ex} = 360/40, λ_{em} =460/40 y 590/30). Mientras que, para el estudio de las cinéticas de reacción de **185** con tioles se utilizó un espectrofluorímetro Jasco FP-8300, utilizando una cubeta de cuarzo de la casa Starna de dimensiones internas de 10 x 10 mm, que proporcionan un paso óptico de 1 cm. Se utilizó una apertura de rendija de excitación y emisión de 5 nm y se observó en el rango de 350-800 nm, excitando a 320 nm.

4.4.2. Determinación de rendimientos cuántico de fluorescencia.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ) se determinaron en disolventes de polaridad creciente y se calcularon con referencia a un estándar, indicada en cada caso^{366, 367}. Se comparó una disolución 12 μM del fluoróforo correspondiente con una disolución 12 μM de la referencia.

Para el cálculo del rendimiento cuántico se usó la siguiente ecuación:

$$\Phi = \frac{I_x A_r n_x^2 \Phi_r}{A_x I_r n_r^2}$$

donde x y r designan la muestra y la referencia, respectivamente, A es la absorción a la longitud de onda de excitación, I es la intensidad de fluorescencia integrada, y n es el índice de refracción del disolvente.

4.4.3. Ensayos de fotoestabilidad

Los ensayos de fotoestabilidad de los correspondientes cromóforos se realizaron a una concentración de 12 μM en una disolución dioxano (**90** y **118**), iluminándolos en su longitud de onda máxima de absorción (**90**: 372 nm y **118**: 360 nm), mediante luz irradiada por un espectrofluorimetro con una lámpara de Xenon (fijándose las aperturas de las rendijas a 15 nm tanto para la excitación como para la emisión). Durante el tiempo de iluminación (1 h con un intervalo de recogida de 2 seg), la longitud de onda máxima de fluorescencia (**90**: 460nm y **118**: 425 nm) se recogió como función de tiempo.

4.4.4. Determinación de tiempos de vida de fluorescencia.

Los tiempos de vida de fluorescencia se obtuvieron a $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm, $\lambda_{\text{ex}} = 440$ nm y $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm dependiendo del compuesto a estudiar. La suma de los exponenciales del

decaimiento de fluorescencia, se recogieron a $\lambda_{\max}^{\text{em}} - 10 \text{ nm}$, $\lambda_{\max}^{\text{em}}$, y $\lambda_{\max}^{\text{em}} + 10 \text{ nm}$. Los errores estándar se obtuvieron a partir de los elementos diagonales de la matriz de covarianza, disponibles en el análisis global en forma de trazas de decaimiento, registradas a tres longitudes de onda de emisión y entre 5 y 30 ps.

El decaimiento de fluorescencia de las disoluciones, se registró por el método de la sincronización de un solo fotón en un fluorímetro FluoTime 200 (PicoQuant GmbH)³⁶⁸. Dependiendo del derivado de quinolimida, el pulso de excitación utilizado mediante un diodo láser fue de 375 nm, 440 nm, 470 nm o de 485 nm (serie de LDH de PicoQuant GmbH), funcionando con un conductor PDL-800 (PicoQuant) a una repetición del pulso de 20 MHz. Los histogramas de decaimiento de fluorescencia se recogieron en 1320 canales, con tiempo de incremento de 36 ps. Los histogramas de las funciones de respuesta del instrumento (usando un dispersor LUDOX) y los decaimientos de las muestras se recogieron hasta alcanzar 2×10^4 unidades en el pico del canal. Se registraron tres decaimientos de fluorescencia para todas las muestras y se recogieron a $\lambda_{\max}^{\text{em}} - 10 \text{ nm}$, $\lambda_{\max}^{\text{em}}$, y $\lambda_{\max}^{\text{em}} + 10 \text{ nm}$. Los decaimientos de fluorescencia se analizaron individualmente usando un método de deconvolución interactiva mediante los modelos exponenciales llevados a cabo con el software FluoFit (PicoQuant).

4.5. RMN DINÁMICA

Se realizó el estudio completo de RMN para el compuesto **143** mediante el uso combinado de los experimentos de RMN 1D y 2D [^1H - ^1H] y [^1H - ^{13}C] (figuras 85-89). En los espectros RMN de ^1H y de ^{13}C del compuesto **143** en CDCl_3 a temperatura ambiente, la resonancia de 2- y 4-H del anillo de azetidina aparecieron como una amplia señal. Estos datos sugirieron la existencia de un equilibrio dinámico.

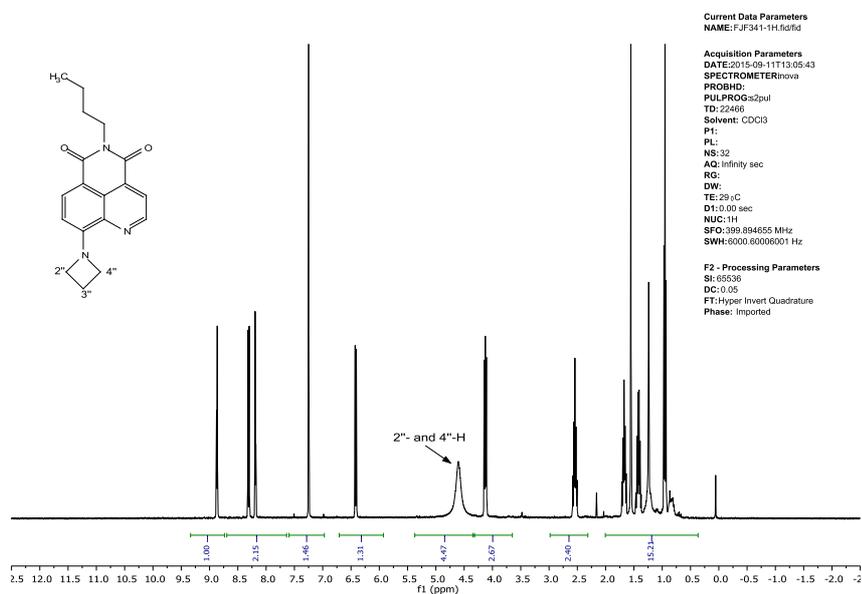


Figura 85. ^1H -RMN(400 MHz, CDCl_3) de la quinolimida **143**

Parte Experimental

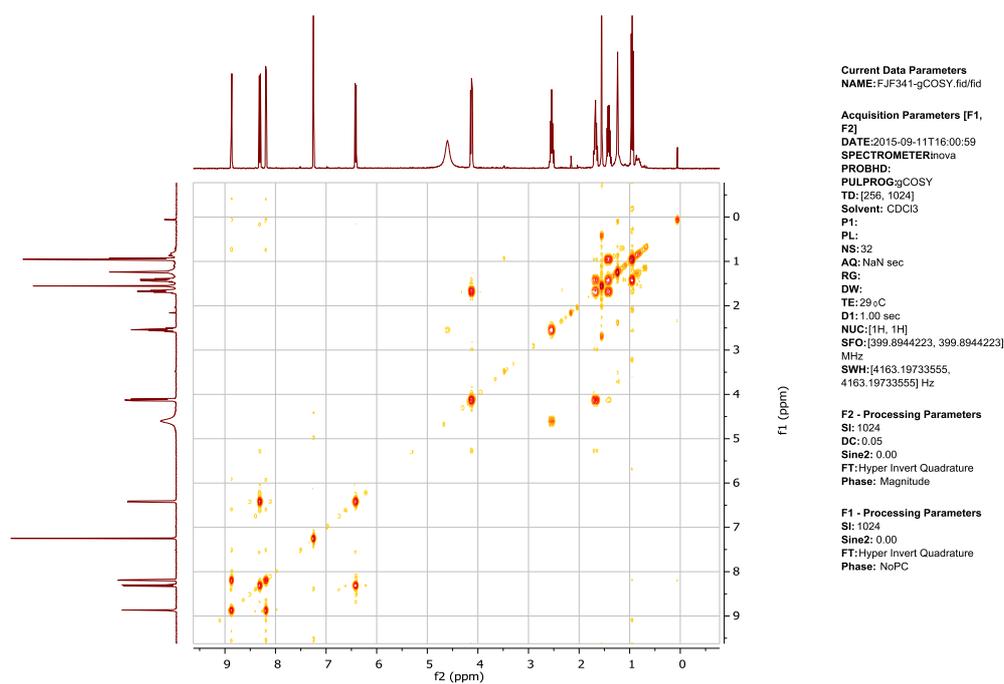


Figura 86. gCOSY (400 MHz, CDCl₃) de la azetidiniil-quinolimida **143**

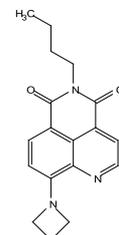
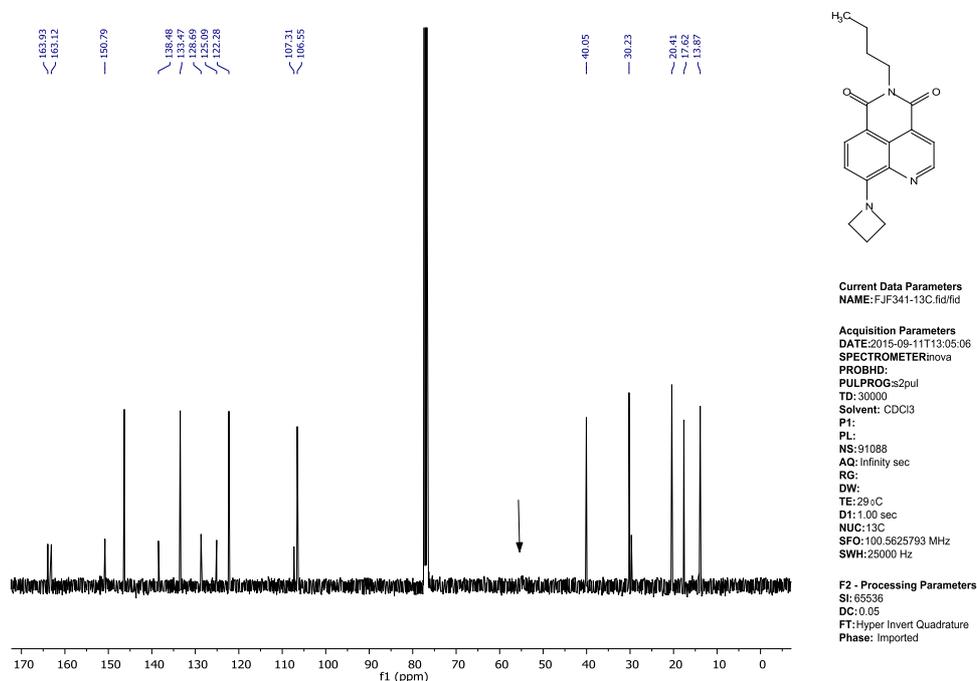


Figura 87. ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃) de **143**

Parte Experimental

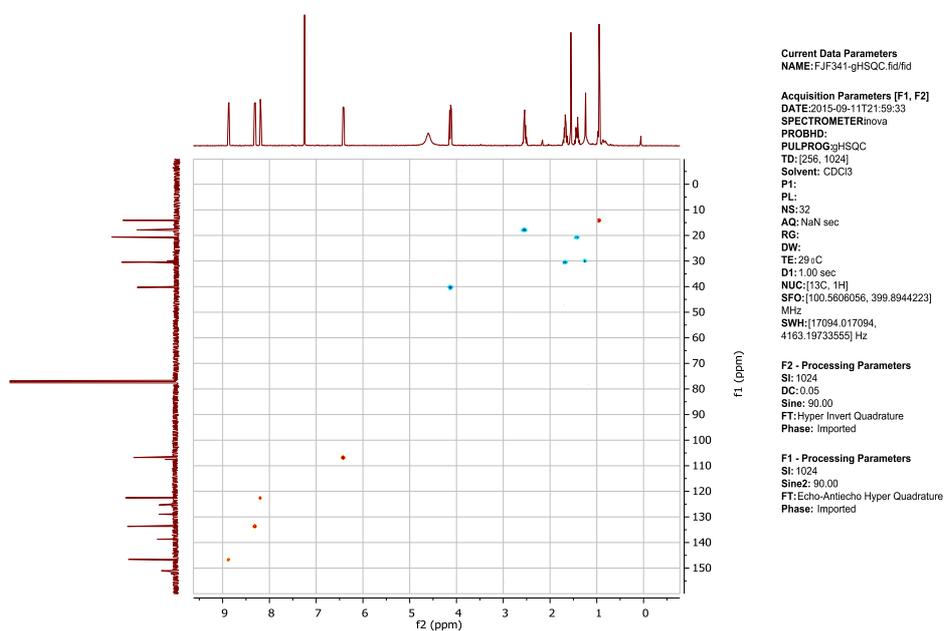


Figura 88. Multiplicidad editada gHSQC (400 MHz, CDCl₃) del compuesto **143** (metilenos: picos cruzados en azul; metilos y metino: picos cruzados en rojo)

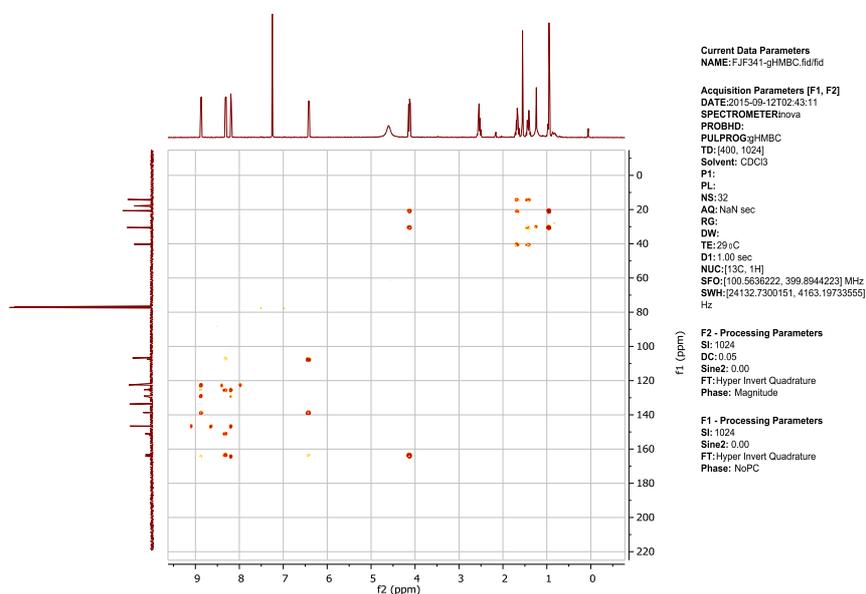


Figura 89. gHMBC (400 MHz, CDCl₃) del compuesto **143**

Parte Experimental

El estudio dinámico del compuesto **143** se realizó mediante el análisis de forma de línea de una serie de experimentos de RMN a temperatura variable de ^1H en CDCl_3 , en un rango de temperatura de 217 a 329 °C (Figura 34), utilizando el programa gNMR³⁶⁹. La temperatura se elevó en intervalos de 14 °C equilibrando la temperatura durante 20 minutos antes de cambiar de intervalo. En un estudio similar con la 9-dimetilamino-quinolimida **142** (figura 90) no se observó ningún intercambio nuclear.

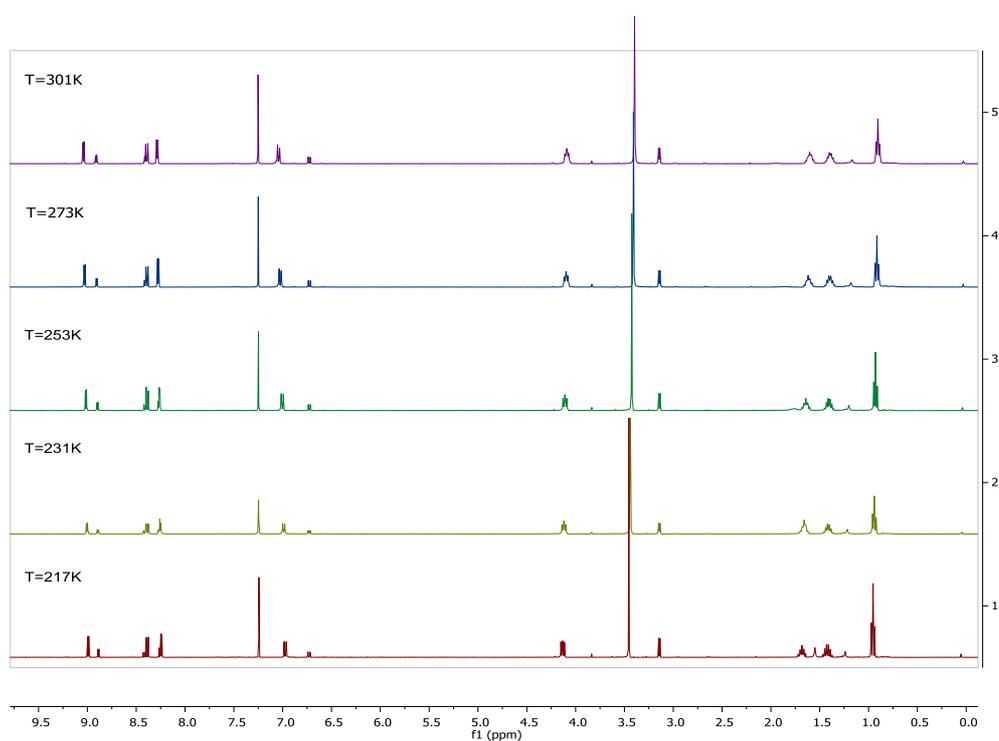


Figura 90. ^1H -RMN a temperatura variable de la 9-dimetilamino-quinolimida **142**

Parte Experimental

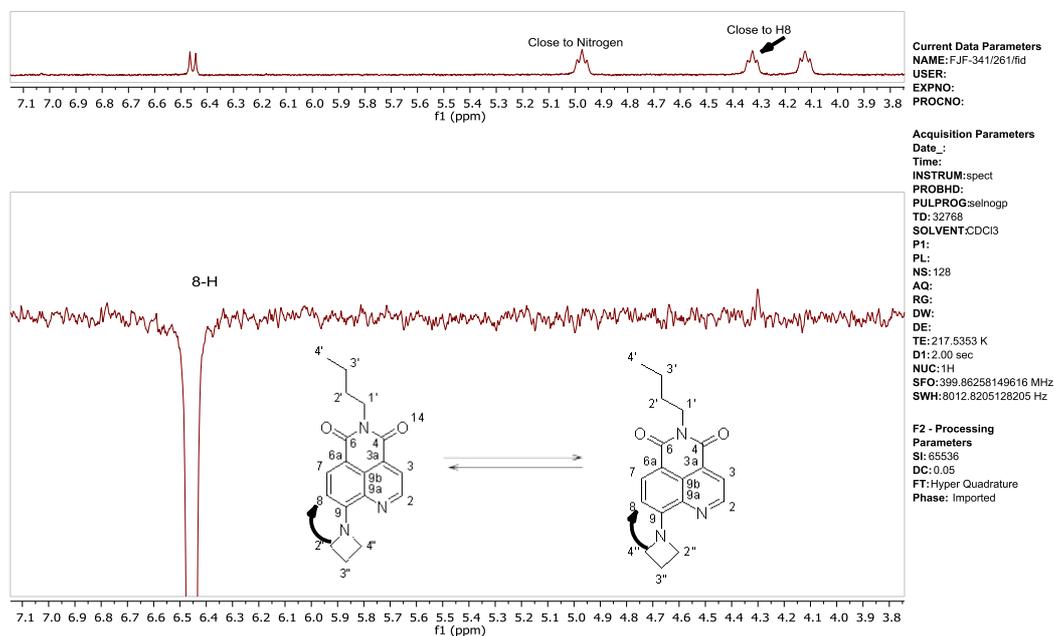


Figura 91. Asignación de rotameros en la azetidín-quinoimida **143** mediante espectro de NOESY- $1D^1H$ -RMN para el compuesto **142**.

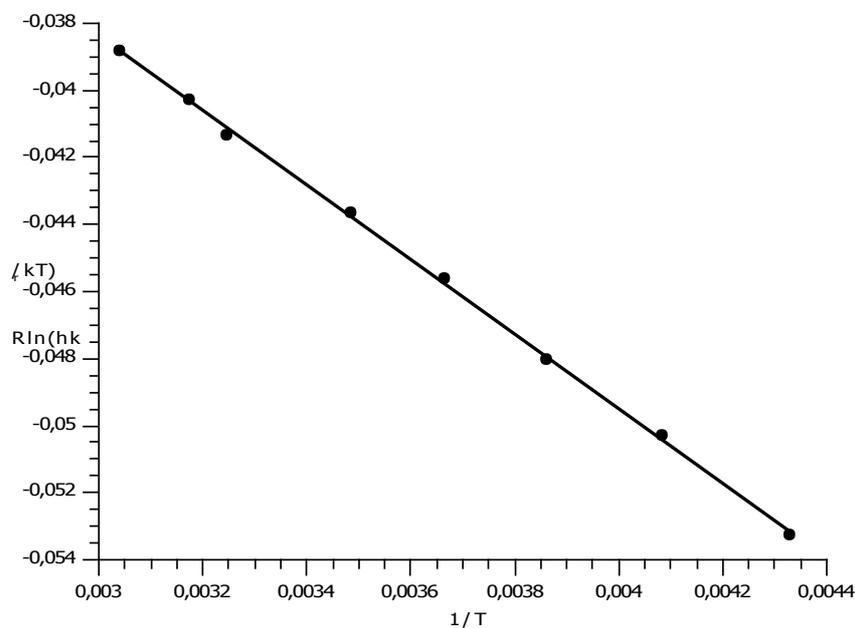


Figura 92. Diagrama de Eyring para el compuesto **143**. $R^2 = 0,999$. $\Delta H^* = -A$ (pendiente) = 11,12 $\pm 0,12$ kcal mol⁻¹ (46.56 kJ.mol⁻¹). $\Delta S^* =$ (y-interceptada) = -0.0050 $\pm 4.2 \cdot 10^{-4}$ Kcal K⁻¹ mol⁻¹.

Los parámetros termodinámicos se calcularon a partir del diagrama Eyring usando la ecuación 1.

$$R \ln \frac{hk_r}{\kappa k T} = -\frac{\Delta H^*}{T} + \Delta S^* \quad (1)$$

Donde K_r representa la constante de la tasa de reacción obtenida de la simulación del intercambio químico, κ el coeficiente de transmisión, k la constante Boltzmann y la ΔH^* y ΔS^* la entalpía y entropía de activación.

4.6. CÁLCULOS SEMIEMPÍRICOS

Los cálculos fueron realizados al nivel computacional PBE0/6-31+G(d,p)^{370, 371} con el paquete de programas Gaussian 09¹⁹⁷. Se confirmó que los cálculos en vacío correspondían a mínimos de energía o estados de transición mediante el cálculo de las frecuencias (no frecuencias imaginarias y una frecuencia imaginaria, respectivamente). El efecto del disolvente fue incorporado mediante un modelo continuo de PCM para una variedad de disolventes parametrizados. Los estados excitados fueron calculados mediante la metodología TD-DFT.

4.6.1. Barreras rotacionales (estado relajado, vacío):

Se obtuvieron dos estructuras para el estado de transición (TS) asociadas a la rotación del grupo amino en la posición 9 de las 9-aminoquinolimidias **138**, **140-143**. La diferencia entre las geometrías de TS es la orientación de los sustituyentes en el átomo del nitrógeno del grupo amino. En el estado de transición TS1, esos sustituyentes apuntan hacia el nitrógeno del anillo de quinolimida, mientras que en el estado de transición TS2 están apuntando en la dirección opuesta. En todos los casos, la barrera energética del estado TS1 es más pequeña que la de TS2 (Tablas 22-24). En el caso la 9-metil-aminoquinolimida (**141**), se encontraron dos mínimos, uno con el grupo metilo que apunta hacia el nitrógeno del anillo de quinolimida y el otro con el grupo metilo que apunta en la dirección opuesta. La última estructura fue la más estable, en 29 kJ/mol

Parte Experimental

Tabla 22. Erel (kJ/mol) de los siguientes estados estacionarios obtenidos en el estudio conformacional

	140	138	141	142	143
Min-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Min-2	–	28.4	28.8	0.0	–
TS-1	48.3	67.8	66.6	26.4	51.7
TS-2	70.5	79.4	79.7	37.3	63.4

Tabla 23. ΔH (kJ/mol) a temperature ambiente

	140	138	141	142	143
Min-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Min-2	–	27.9	29.0	0.2	–
TS-1	48.3	63.3	62.7	22.5	48.5
TS-2	70.5	74.7	75.4	32.7	59.4

Tabla 24. ΔG (kJ/mol) a temperature ambiente

	140	138	141	142	143
Min-1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0
Min-2	–	26.7	30.0	0.0	26.7
TS-1	50.0	67.1	68.1	30.1	67.1
TS-2	70.8	79.7	80.4	39.4	79.7

4.6.2. Momentos dipolares:

La excitación de las 9-aminoquinolimidias, produce un incremento significativo de la magnitud del momento dipolar (Tabla 25) y un cambio de su dirección como se ilustra para la 9-aminoquinolimida 140 en la figura 93.

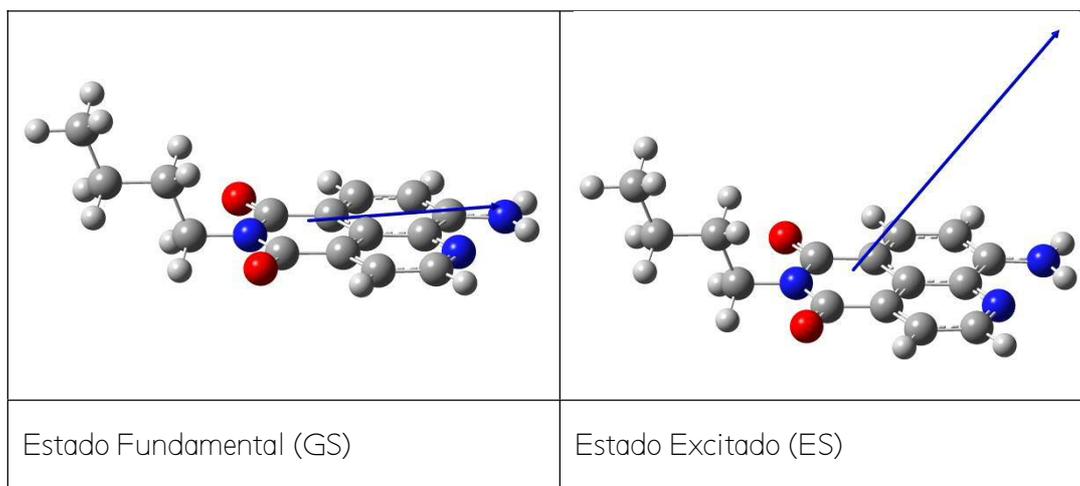


Figura 93. Momento dipolar (indicado con una flecha) de la 9-amino-quinolimide **140** en ambos estados. La longitud de la flecha es proporcional a la magnitud total del momento dipolar.

Tabla 25. Momentos dipolares calculados (debye) de las quinolimidias **138-142** en el estado relajado y en el estado excitado

	140	138	141 (min1)	141 (min2)	142	143
GS	4.7	5.9	5.3	5.6	4.8	6.5
ES	8.2	10.2	9.3	9.2	9.6	10.5

4.7. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

Esta evaluación fue realizada mediante ensayos HTS de citotoxicidad en líneas celulares de cánceres humanos de pulmón de células no pequeñas (A 549), colon (HT 29), mama (MDA-MD-231) y páncreas (PSNI) en la compañía farmacéutica PharmaMar S.A., utilizando doxorubicina como control positivo y de acuerdo con los protocolos de National Cancer Institute (NCI). Se realizó un ensayo colorimétrico, adaptando la reacción de la sulforodamina B para observar mediante una medición cuantitativa el crecimiento y la viabilidad celular, siguiendo la técnica descrita por Skehan, P.A et al³⁷². Las células (A 549, HT 29, MDA-MD-231 y PSNI) fueron cultivadas en multiplaca de 96 pocillos, a una concentración de células de 5×10^3 por cada alícuota de 195 μ l de medio RPMI, en una superficie de crecimiento con un medio libre de drogas durante 18 h. Después, las muestras se añadieron en alícuotas de 5 μ l [disueltas en una mezcla de DMSO/H₂O (3:7)].

Después de 48 h de exposición, las células se fijaron mediante la adición de 50 μ l de ácido tricloroacético frío a una concentración 50% (wt/vol), incubándose a 4°C durante 1 h. Después, los pocillos se lavaron con H₂O deionizada y se secaron. Se añadieron 100 μ l de una solución de SRB (0.4% wt/vol en 1% de ácido acético) en los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. El SRB desanclado se desechó mediante lavado con 1% de ácido acético, los pocillos de la multiplaca se secaron y el colorante unido se solubilizó en medio Tampón TRIS. Las densidades ópticas se leyeron en un espectrofotómetro automatizado multiplaca a una longitud de onda de 490 nm. El análisis de los datos se generó automáticamente mediante el screening de alta resolución LIMS implementado en el laboratorio. Los tres parámetros de respuesta GI₅₀.

Parte Experimental

(inhibición del crecimiento al 50%), LC₅₀ (concentración letal al 50%) y TGI (concentración total inhibitoria) se obtuvieron mediante curvas concentración- respuesta mediante interpolación lineal, de acuerdo con los protocolos del NCI³⁷³

4.8. VALORACIONES *IN VITRO* DE FLUORESCENCIA DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE CDK5

Los ensayos de valoración de fluorescencia, se realizaron en placas de 96 pocillos con 200 μ L de fosfato potásico 50 mM (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{PO}_4$, pH 7.4) 150 mM de NaCl, usando un espectrofluorímetro Clariostar (BMG). Los péptidos marcados fluorescentemente con la bromometilacetamida **151** se excitaron a 480 nm y la señal de emisión se recogió entre 505 y 740 nm, a menos que se indique lo contrario. Los péptidos marcados fluorescentemente con la bromometilacetamida **152** se excitaron a 490 nm y la señal de emisión se recogió entre 515 y 700 nm, a menos que se indique lo contrario. El análisis de los datos se realizó utilizando el software GraFit (Erathicus Ltd). Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.9. CULTIVO CELULAR, INTERNALIZACIÓN Y MICROSCOPIA DE CÉLULAS U87

Los medios de cultivo celular, el suero y los antibióticos se adquirieron de Invitrogen. Se cultivaron células U87 en DMEM + Glutamax suplementado con FCS al 10%, 100 unidades /ml de penicilina (sal de sodio G) y estreptomina 100 µg/ml, a 37°C, en una atmósfera que contenía 5% de CO₂. Se añadieron los péptidos K5 marcados con **136**, **151** o **152** o el péptido Pep1-K5 sobre células U87 cultivadas hasta un 50-60% de confluencia en DMEM, complementado con 10% de glucosa durante 3 horas. Las células se fijaron con formalina en PBS durante 10 min, se lavaron en PBS y se tiñeron los núcleos con Hoechst. Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta con anti-p25 policlonal de conejo (C-19 de Santa Cruz) a una dilución 1: 250 en buffer de bloqueo (BSA al 4%, suero de cabra al 4% y Triton al 0,1%) durante toda la noche, se lavó y luego se incubó con anticuerpos secundarios marcados con Alexa647, a una dilución de 1: 500 durante 1 h. A continuación, se lavaron de nuevo con PBS, y los núcleos se tiñeron con Hoechst. Se volvieron a lavar con agua y se montaron en portaobjetos de vidrio en Mowiol. Las células fluorescentes se observaron con un microscopio Zeiss equipado con una cámara CoolSnap y las imágenes se adquirieron utilizando el software MetaMorph. Los filtros de banda de excitación /dicroico / banda de emisión utilizados para la visualización de las señales fluorescentes fueron los siguientes: Hoechst: 340-380/400/450-490 nm; Los anticuerpos conjugados con Alexa647 se recogieron utilizando los filtros Cy5: 590 - 650/660/662 - 737 nm; La fluorescencia de **136**, **151** y **152** se recogió usando los filtros GFP: 450-490/495</500-550nm.

4.10. ESTUDIOS DE LA AGREGACIÓN DEL PEPTIDO β -AMILOIDE

4.10.1. Valoración espectroscópica del peptido β -amiloide

El péptido $A\beta_{42}$ (fragmento 1-42 de la proteína de β amiloide, Sigma-Aldrich) se incubó a una concentración total de 100 μ M, en tampón SSPE ((150 mM NaCl, 10 mM $Na_2H_2PO_4 \cdot H_2O$, 10 mM Na_2EDTA , pH 7,4, Sigma-Aldrich) a 37 ° C, con agitación continua. El péptido liofilizado se disolvió a pH 12 antes de su uso y se filtró para eliminar los agregados preformados. En estas condiciones, se detectaron fibrillas amiloideas largas y rectas después de 20 h de incubación (figura 40).

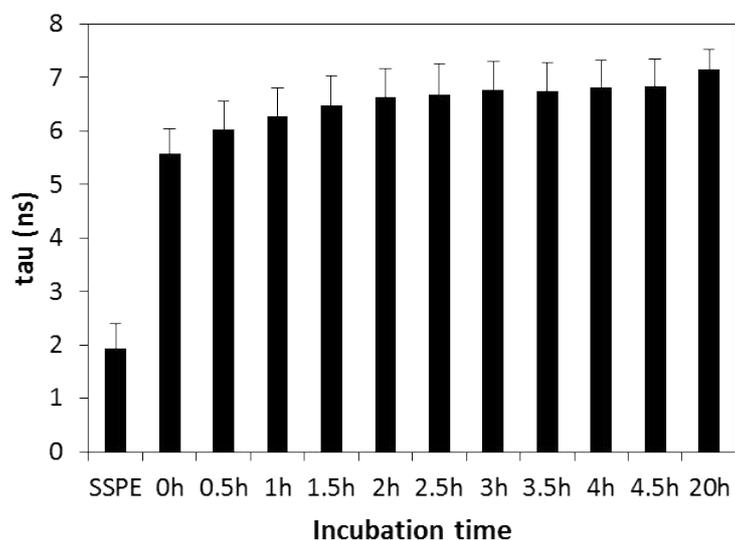


Figura 94. Tiempo de vida de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 485$ nm) a diferentes tiempos de incubación tras la iunereacción con **143** (2 μ M) con el péptido β -amyloid (100 μ M).

La quinolimida **143** se agregó a una concentración total de 2 μM . Los espectros de emisión de estado estacionario ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$) se recogieron en un espectrofluorímetro Jasco FP8300. Los tiempos de vida en fluorescencia resuelta en tiempo se obtuvieron en un espectrómetro de tiempo de la vida de fluorescencia PicoQuant FT200, basado en la sincronización de un solo fotón (SPT) usando un láser pulsado a 485 nm de diodo como fuente de la excitación (PicoQuant LDH-485) que trabajaba a 20 MHz. La variación del tiempo de vida de fluorescencia de **143** con el tiempo de incubación con $\text{A}\beta_{42}$ se muestra en la Figura 94.

4.10.2. FLIM de doble color

Los experimentos FLIM con dos colores se llevaron a cabo en el microscopio confocal invertido (Olympus IX-71, objetivo de inmersión x 100 1.4 NA) de tiempo resuelto MicroTime 200 (figura 97, PicoQuant GmbH, Berlín, Alemania). Para la excitación a $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ se utilizó un diodo láser pulsado (LDH, PicoQuant) con una frecuencia de repetición de 20 MHz. La fluorescencia recogida a través del objetivo atravesó un pinhole de 75 μm tras pasar por un espejo dicróico de 500 DCXR y un filtro de paso largo de 500LP (Chroma). La fluorescencia se separó en dos canales mediante un espejo dicróico 600DCXR y recogió en dos detectores (Perkin Elmer). Se utilizó un filtro de paso de banda 550/40 (Thorlabs) en el canal verde, para recoger la emisión a λ_{550} ; y un filtro 630/60 (Chroma) para recoger la emisión en el canal rojo a λ_{630} . La reconstrucción de imagen, la cuantificación de los fotones y la adquisición de datos se llevaron a cabo con un módulo TimeHarp 200TCSPC (PicoQuant, Berlín, Alemania) Las imágenes se obtuvieron con una resolución de 512×512 con unas dimensiones de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. El análisis de las imágenes se llevó a cabo usando el software SymPhoTime 32 (PicoQuant) ajustando los decaimientos de fluorescencia obtenidos en los píxeles individuales a una función de decaimiento monoexponencial, usando el estimador de máxima verosimilitud (MLE) para la optimización de los parámetros³⁷⁴. Para lograr el mayor número de cuentas posibles en cada píxel se usó una combinación espacial previa de 5×5 píxeles y un agrupamiento de 8 canales temporales en los decaimientos (para una resolución final de 232 ps por canal). La selección de los píxeles correspondientes a los agregados se realizó con el software Fiji (ImageJ2).

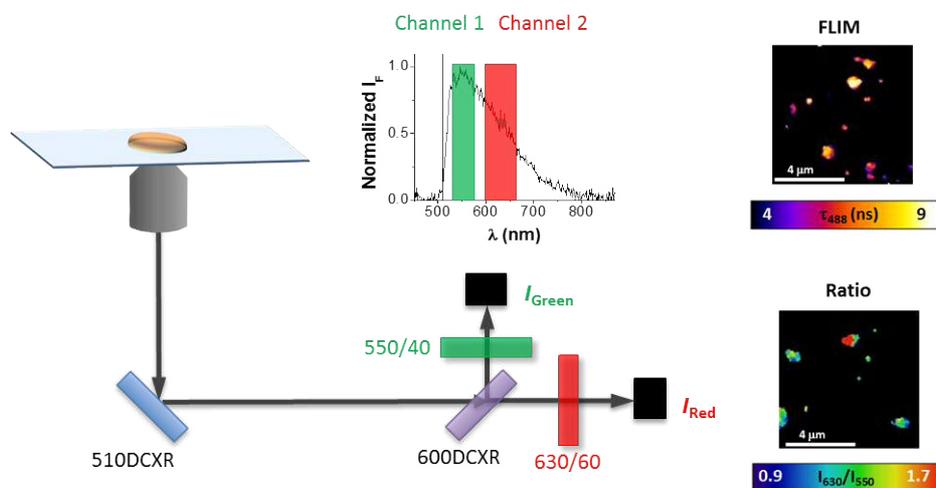


Figura 97. Esquema de la instrumentación para la fluorescencia por imágenes de tiempo de vida (FLIM) y la relación de imagen en dos canales de detección diferentes (verde a 550/40 y rojo a 630/60).

4.11. MICROSCOPIA DE TRANSMISION ELECTRÓNICA (TEM)

En las imágenes de Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) (Figura 40) se muestran los diferentes estados de agregación del péptido β -amiloide. Las imágenes se recogieron utilizando un microscopio de trasmisión electrónica Libra 120 Plus (Carl Zeiss, SMT, Germany) operando a 120 KV y equipado con un filamento LaB6 y una cámara acoplada directamente SSCCD 2 k x 2 k.

4.12. CULTIVO CELULAR Y VISUALIZACIÓN DE FLUORESCENCIA EN MACROFAGOS

La respuesta biológica de los productos fue evaluada en monocito macrofagos RAW 264.7 (ECACC, Sigma P11), Las células se cultivaron en medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) enriquecido con 110 mg/l de piruvato sódico y suplementado con 10% FBS, 100 u/ml de penicilina , 100 µg/ml de estreptomicina y 200 mM de L-glutamina (medio completo). El cultivo celular se mantuvo en atmosfera humidificada a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de aire.

La morfología de las células se estudió mediante un microscopio de epifluorescencia *NIKON TE-2000* y mediante un *microscopio* confocal Láser (CLSM) LEICA TCS SP2 con 7 líneas de laser (457, 477, 488, 496, 514, 543, 633 nm) .

Las células RAW 264.7 se hicieron crecer hasta una densidad de 8×10^4 celulas/ml en medio completo, en placas de 24 pocillos incubándose durante 24 horas. Pasado este tiempo, la mitad de los pocillos en crecimiento se trataron con LPS (Lipolisacaridos de *Escherichia coli*, Sigma Aldrich, Spain) a una concentración de 5 µg/ml durante 2 h para después ser tratados con los fluoróforos indicados en cada caso (5 µM). La otra mitad de los pocillos se trataron directamente con los productos a la misma concentración. Las células se dejaron en presencia de los fluoróforos durante 1 h o 2 h.

Despues de este tiempo, las células se fijaron con glutaraldehido (2.5% v/v en H₂O) durante 15 min. Se lavaron con agua destilada dos veces y se llevaron al servicio de microscopia para ser montadas y observadas al microscopio.

Los productos se compararon con al sensor fluorescente nuclear comercial DAPI (INVITROGEN)

4.13. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON ADN

4.13.1. Estudios de interacción de la naftalimida 165 y la quinolimida 167 con ADN.

Los estudios se realizaron mediante valoraciones a concentración constante de ligando mediante espectrometría UV, Dicroísmo Circular (DC) y excitación de fluorescencia.

El equipo utilizado fue el espectropolarímetro Jasco J-815.

Condiciones experimentales: Buffer fosfato 10 mM, pH = 7.10, T = 25°C, (NaCl 200mM solo en las valoraciones con el oligonucleotido)

Secuencia del oligo R13: 5'-GCGTACGCCAGCG-3'

3'-CGCATGCGGTCGC-5'

En las Figuras 98-101 se recogen los espectros obtenidos para cada fluoróforo.

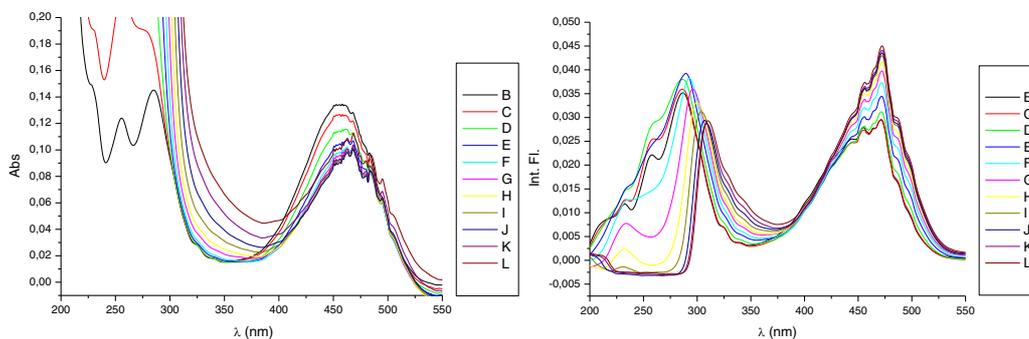


Figura 98. Estudios de interacción entre 165-Fs y ADN observados mediante dicroísmo circular (izquierda) y espectrómetro UV (derecha).

Parte Experimental

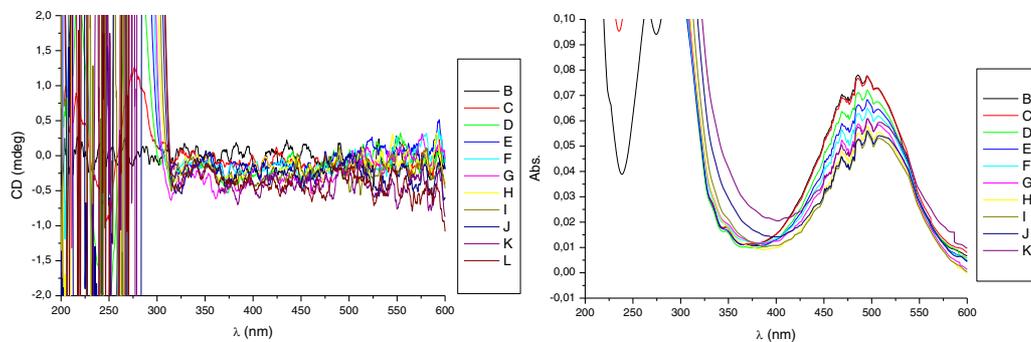


Figura 99. Estudios de interacción entre **167-Fs-ADN** observados mediante dicroísmo circular (izquierda) y espectrómetro UV (derecha).

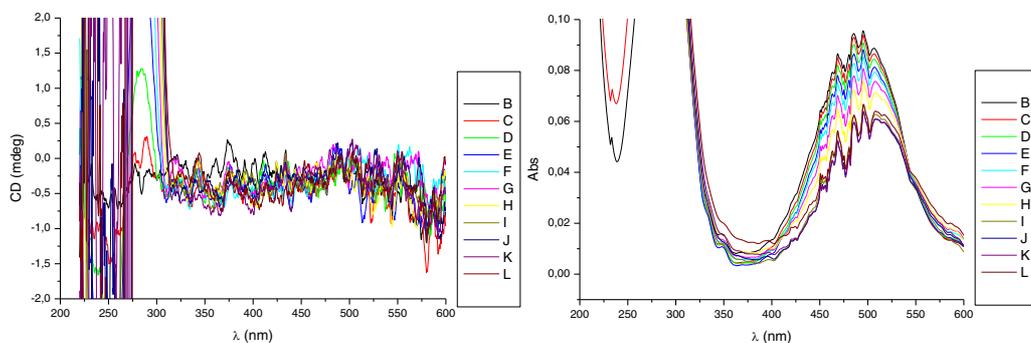


Figura 100. Estudios de interacción entre **165-R13** observados mediante dicroísmo circular (izquierda) y espectrómetro UV (derecha).

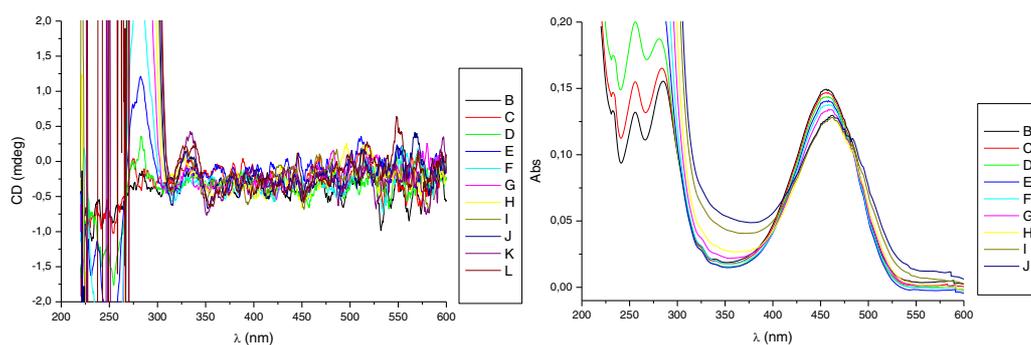


Figura 101. Estudios de interacción entre **167-R13** observados mediante dicroísmo circular (izquierda) y espectrómetro UV (derecha).

5. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Touhami, A. Biosensors and nanobiosensors: Design and applications. In *Nanomedicine*, Seifalian, A.; de Mel, A.; Kalaskar, D. M., Eds. One Central Press Manchester, 2014 pp 374-403.
2. Clark, L. C.; Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29-45.
3. Velasco-Garcia, M. N. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2009**, *20*, 27-33.
4. Kobayashi, H.; Choyke, P. L. Target-cancer-cell-specific activatable fluorescence imaging probes: Rational design and in vivo applications. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 83-90.
5. Coelho, M.; Maghelli, N.; Tolic-Norrelykke, I. M. Single-molecule imaging in vivo: the dancing building blocks of the cell. *Integr. Biol.* **2013**, *5*, 748-758.
6. Ma, F.; Li, Y.; Tang, B.; Zhang, C.-y. Fluorescent biosensors based on single-molecule counting. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1722-1730.
7. Morris, M. C. Spotlight on fluorescent biosensors—Tools for diagnostics and drug discovery. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 99-101.
8. González-Vera, J.; Morris, M. Fluorescent reporters and biosensors for probing the dynamic behavior of protein kinases. *Proteomes* **2015**, *3*, 369.
9. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third ed.; Springer: New York, 2006.
10. Chudakov, D. M.; Matz, M. V.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K. A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.* **2010**, *90*, 1103-1163.
11. Palmer, A. E.; Qin, Y.; Park, J. G.; McCombs, J. E. Design and application of genetically encoded biosensors. *Trends in Biotechnol.* **2011**, *29*, 144-152.
12. Morris, M. C.; Blondel, M. Editorial: Fluorescent biosensors. *Biotechnol. J.* **2014**, *9*, 171-173.
13. Prével, C.; Kurzawa, L.; Van, T. N. N.; Morris, M. C. Fluorescent biosensors for drug discovery new tools for old targets – Screening for inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *88*, 74-88.
14. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH: Weinheim, 2001.
15. Yang, Z.; Cao, J.; He, Y.; Yang, J. H.; Kim, T.; Peng, X.; Kim, J. S. Macro-/micro-environment-sensitive chemosensing and biological imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4563-4601.
16. Klymchenko, A. S.; Mely, Y. Fluorescent environment-sensitive dyes as reporters of biomolecular interactions. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2013**, *113*, 35-58.
17. Klymchenko, A. S. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 366-375.
18. Loving, G. S.; Sainlos, M.; Imperiali, B. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 73-83.
19. Lee, H.-J.; Cho, C.-W.; Seo, H.; Singha, S.; Jun, Y. W.; Lee, K.-H.; Jung, Y.; Kim, K.-T.; Park, S.; Bae, S. C.; Ahn, K. H. A two-photon fluorescent probe for lysosomal zinc ions. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 124-127.
20. Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142-155.

21. J M Beechem, a.; Brand, L. Time-resolved fluorescence of proteins. *Annu. Rev.Biochem.* **1985**, *54*, 43-71.
22. Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: Beyond traditional donor–acceptor combinations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562-4589.
23. Marmé, N.; Knemeyer, J.-P.; Wolfrum, J.; Sauer, M. Highly sensitive protease assay using fluorescence quenching of peptide probes based on photoinduced electron transfer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3798-3801.
24. Weber, G. Intramolecular transfer of electronic energy in dihydro diphosphopyridine nucleotide. *Nature* **1957**, *180*, 1409-1409.
25. Whitby, L. G. A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide. *Biochem. J.* **1953**, *54*, 437-442.
26. Wolfbeis, O. S. The fluorescence of organic natural products In *Molecular luminescence spectroscopy: Methods and applications-Part 1*, Schulman, S. G., Ed. Wiley: New York, 1985; pp 167-317.
27. Aubin, J. E. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J. Histochem. Cytochem.* **1979**, *27*, 36-43.
28. Ballou, B.; Ernst, L. A.; Waggoner, A. S. Fluorescence imaging of tumors in vivo. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 795-805.
29. Cavaluzzi, M. J.; Borer, P. N. Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e13/1-e13/9.
30. Weber, G. Polarization of the fluorescence of macromolecules. II. Fluorescent conjugates of ovalbumin and bovine serum albumin. *Biochem. J.* **1952**, *51*, 155-67.
31. Hudson, E. N.; Weber, G. Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents. *Biochemistry* **1973**, *12*, 4154-61.
32. Tyagi, S.; Kramer, F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308.
33. Stewart, W. W. Synthesis of 3,6-disulfonated 4-aminonaphthalimides. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7615-20.
34. Haugland, R. P.; Spence, M. T. Z.; Johnson, I. D.; Basey, A. *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. 10 th ed.; Molecular Probes: Eugene, 2005.
35. Herschel, J. F. W. On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless. *Phil. Trans. Roy. Soc. (London)* **1845**, *135*, 143–145.
36. Smalley, M. K.; Silverman, S. K. Fluorescence of covalently attached pyrene as a general RNA folding probe. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 152-166.
37. Kano, K.; Fendler, J. H. Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1978**, *509*, 289-299.
38. Kohl, C.; Weil, T.; Qu, J.; Muellen, K. Towards highly fluorescent and water-soluble perylene dyes. *Chem. - Eur. J.* **2004**, *10*, 5297-5310.
39. Davenport, L.; Shen, B.; Joseph, T. W.; Straher, M. P. A novel fluorescent coronenyl-phospholipid analogue for investigations of submicrosecond lipid fluctuations. *Chem. Phys. Lipids* **2001**, *109*, 145-156.
40. Grandberg, I. I.; Denisov, L. K.; Popova, O. A. 7-Aminocoumarins *Chem. Heterocycl. Compd* **1987**, *23*, 117-142.

41. Gee, K. R.; Sun, W.-C.; Bhalgat, M. K.; Upson, R. H.; Klaubert, D. H.; Latham, K. A.; Haugland, R. P. Fluorogenic substrates based on fluorinated umbelliferones for continuous assays of phosphatases and β -galactosidases. *Anal. Biochem.* **1999**, *273*, 41-48.
42. Babiak, P.; Reymond, J.-L. A high-throughput, low-volume enzyme assay on solid support. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 373-377.
43. Salisbury, C. M.; Maly, D. J.; Ellman, J. A. Peptide microarrays for the determination of protease substrate specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14868-14870.
44. Wegener, D.; Wirsching, F.; Riester, D.; Schwienhorst, A. A fluorogenic histone deacetylase assay well suited for high-throughput activity screening. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 61-68.
45. Lavis, L. D.; Chao, T.-Y.; Raines, R. T. Latent blue and red fluorophores based on the trimethyl lock. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1151-1154.
46. Larsen, T. A.; Goodsell, D. S.; Cascio, D.; Grzeskowiak, K.; Dickerson, R. E. The structure of DAPI bound to DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, *7*, 477-91, 1 plate.
47. Crissman, H. A.; Hiron, G. T. Staining of DNA in live and fixed cells. *Methods Cell Biol.* **1994**, *41*, 195-209.
48. Levi, J.; Cheng, Z.; Gheysens, O.; Patel, M.; Chan, C. T.; Wang, Y.; Namavari, M.; Gambhir, S. S. Fluorescent fructose derivatives for imaging breast cancer cells. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 628-634.
49. Chattopadhyay, A. Chemistry and biology of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids: fluorescent probes of biological and model membranes. *Chem. Phys. Lipids* **1990**, *53*, 1-15.
50. Dai, Z.; Dulyaninova, N. G.; Kumar, S.; Bresnick, A. R.; Lawrence, D. S. Visual snapshots of intracellular kinase activity at the onset of mitosis. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1254-1260.
51. Baeyer, A. Ueber eine neue Klasse von Farbstoffen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1871**, *4*, 555-558.
52. Brinkley, M. A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and crosslinking reagents. *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 2-13.
53. Sun, W.-C.; Gee, K. R.; Klaubert, D. H.; Haugland, R. P. Synthesis of fluorinated fluoresceins. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6469-6475.
54. Fleming, G. R.; Knight, A. W. E.; Morris, J. M.; Morrison, R. J. S.; Robinson, G. W. Picosecond fluorescence studies of xanthene dyes. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4306-4311.
55. McHedlov-Petrossyan, N. O.; Rubtsov, M. I.; Lukatskaya, L. L. Ionization and tautomerism of chloro derivatives of fluorescein in water and aqueous acetone. *Dyes Pigm.* **1992**, *18*, 179-198.
56. Graber, M. L.; DiLillo, D. C.; Friedman, B. L.; Pastoriza-Munoz, E. Characteristics of fluoroprobes for measuring intracellular pH. *Anal. Biochem.* **1986**, *156*, 202-212.
57. Minta, A.; Kao, J. P. Y.; Tsien, R. Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8171-8178.
58. Inglese, J.; Johnson, R. L.; Simeonov, A.; Xia, M.; Zheng, W.; Austin, C. P.; Auld, D. S. High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 466-479.
59. Martin, V. V.; Rothe, A.; Gee, K. R. Fluorescent metal ion indicators based on benzoannelated crown systems: a green fluorescent indicator for intracellular sodium ions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1851-1855.

60. Kikuchi, K.; Komatsu, K.; Nagano, T. Zinc sensing for cellular application. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 182-191.
61. Yoon, S.; Miller, E. W.; He, Q.; Do, P. H.; Chang, C. J. A bright and specific fluorescent sensor for mercury in water, cells, and tissue. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 6658-6661.
62. Yang, X.-F.; Ye, S.-J.; Bai, Q.; Wang, X.-Q. A fluorescein-based fluorogenic probe for fluoride ion based on the fluoride-induced cleavage of tert-butyldimethylsilyl ether. *J. Fluoresc.* **2007**, *17*, 81-87.
63. Mitchison, T. J.; Sawin, K. E.; Theriot, J. A.; Gee, T. K.; Mallavarapu, A. Caged fluorescent probes. *Methods Enzymol.* **1998**, *291*, 63-78.
64. Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T. Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4888-4894.
65. Kamiya, M.; Kobayashi, H.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Bernardo, M.; Nagano, T.; Choyke, P. L.; Urano, Y. An enzymatically activated fluorescence probe for targeted tumor imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3918-3929.
66. Lavis, L. D.; Chao, T.-Y.; Raines, R. T. Fluorogenic label for biomolecular imaging. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 252-260.
67. Lee, L. G.; Berry, G. M.; Chen, C. H. Vita blue: a new 633-nm excitable fluorescent dye for cell analysis. *Cytometry* **1989**, *10*, 151-64.
68. Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.
69. Karolin, J.; Johansson, L. B. A.; Strandberg, L.; Ny, T. Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) derivatives in liquids, lipid membranes, and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7801-7806.
70. Lumbierres, M.; Palomo, J. M.; Kragol, G.; Roehrs, S.; Mueller, O.; Waldmann, H. Solid-phase synthesis of lipidated peptides. *Chem. - Eur. J.* **2005**, *11*, 7405-7415.
71. Gabe, Y.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Kojima, H.; Nagano, T. Highly sensitive fluorescence probes for nitric oxide based on boron dipyrromethene chromophore-rational design of potentially useful bioimaging fluorescence probe. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3357-3367.
72. Banks, P.; Gosselin, M.; Prystay, L. Impact of a red-shifted dye label for high throughput fluorescence polarization assays of G protein-coupled receptors. *J. Biomol. Screening* **2000**, *5*, 329-334.
73. Nathans, J. Molecular biology of visual pigments. *Annu. Rev. Neurosci.* **1987**, *10*, 163-194.
74. Buschmann, V.; Weston, K. D.; Sauer, M. Spectroscopic study and evaluation of red-absorbing fluorescent dyes. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 195-204.
75. Cosa, G.; Focsaneanu, K. S.; McLean, J. R. N.; McNamee, J. P.; Scaiano, J. C. Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *73*, 585-599.
76. Smith, J. C. Potential-sensitive molecular probes in membranes of bioenergetic relevance. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1016*, 1-28.
77. Zhou, W.-L.; Yan, P.; Wuskell, J. P.; Loew, L. M.; Antic, S. D. Intracellular long-wavelength voltage-sensitive dyes for studying the dynamics of action potentials in axons and thin dendrites. *J. Neurosci. Methods* **2007**, *164*, 225-239.
78. Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 105-111.

79. Waggoner, A. Fluorescent labels for proteomics and genomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 62-66.
80. Schobel, U.; Egelhaaf, H.-J.; Brecht, A.; Oelkrug, D.; Gauglitz, G. New donor-acceptor pair for fluorescent immunoassays by energy transfer. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1107-1114.
81. Bates, M.; Huang, B.; Dempsey, G. T.; Zhuang, X. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science* **2007**, *317*, 1749-1753.
82. Panchenko, P. A.; Fedorova, O. A.; Fedorov, Y. V. Fluorescent and colorimetric chemosensors for cations based on 1,8-naphthalimide derivatives: design principles and optical signalling mechanisms. *Russ. Chem. Rev.* **2014**, *83*, 155-182.
83. Wang, H.; Yang, L.; Zhang, W.; Zhou, Y.; Zhao, B.; Li, X. A colorimetric probe for copper(II) ion based on 4-amino-1,8-naphthalimide. *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *381*, 111-116.
84. Panchenko, P. A.; Fedorov, Y. V.; Fedorova, O. A.; Jonusauskas, G. Comparative analysis of the PET and ICT sensor properties of 1,8-naphthalimides containing aza-15-crown-5 ether moiety. *Dyes Pigm.* **2013**, *98*, 347-357.
85. Hou, C.; Urbanec, A. M.; Cao, H. A rapid Hg²⁺ sensor based on aza-15-crown-5 ether functionalized 1,8-naphthalimide. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 4903-4905.
86. Prasanna de Silva, A.; Gunaratne, H. Q. N.; Habib-Jiwan, J.-L.; McCoy, C. P.; Rice, T. E.; Soumillion, J.-P. New fluorescent model compounds for the study of photoinduced electron transfer: the influence of a molecular electric field in the excited state. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1728-1731.
87. Prasanna de Silva, A.; Rice, T. E. A small supramolecular system which emulates the unidirectional, path-selective photoinduced electron transfer of the bacterial photosynthetic reaction center. *Chem. Commun.* **1999**, 163-164.
88. Fan, J.; Peng, X.; Wu, Y.; Lu, E.; Hou, J.; Zhang, H.; Zhang, R.; Fu, X. A new PET fluorescent sensor for Zn²⁺. *J. Lumin.* **2005**, *114*, 125-130.
89. Duke, R. M.; Veale, E. B.; Pfeffer, F. M.; Kruger, P. E.; Gunnlaugsson, T. Colorimetric and fluorescent anion sensors: An overview of recent developments in the use of 1,8-naphthalimide-based chemosensors. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3936-3953.
90. Gunnlaugsson, T.; Kruger, P. E.; Lee, T. C.; Parkesh, R.; Pfeffer, F. M.; Hussey, G. M. Dual responsive chemosensors for anions: the combination of fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) and colorimetric chemosensors in a single molecule. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6575-6578.
91. Kluciar, M.; Ferreira, R.; de Castro, B.; Pischel, U. Modular functional integration of a two-input INH logic gate with a fluorophore-spacer-receptor1-spacer-receptor2 conjugate. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6079-6085.
92. Veale, E. B.; Gunnlaugsson, T. Synthesis, photophysical, and DNA binding studies of fluorescent Troger's base derived 4-amino-1,8-naphthalimide supramolecular clefts. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5513-5525.
93. Banerjee, S.; Bright, S. A.; Smith, J. A.; Burgeat, J.; Martinez-Calvo, M.; Williams, D. C.; Kelly, J. M.; Gunnlaugsson, T. Supramolecular approach to enantioselective DNA recognition using enantiomerically resolved cationic 4-amino-1,8-naphthalimide-based Troeger's bases. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 9272-9283.
94. Banerjee, S.; Veale, E. B.; Phelan, C. M.; Murphy, S. A.; Tocci, G. M.; Gillespie, L. J.; Frimannsson, D. O.; Kelly, J. M.; Gunnlaugsson, T. Recent advances in the development of 1,8-naphthalimide based DNA targeting binders, anticancer and fluorescent cellular imaging agents. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 1601-1618.

95. Braña, M. F.; Castellano, J. M.; Roldan, C. M.; Santos, A.; Vazquez, D.; Jimenez, A. Synthesis and mode(s) of action of a new series of imide derivatives of 3-nitro-1,8-naphthalic acid. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1980**, *4*, 61-66.
96. Braña, M. F.; Sanz, A. M.; Castellano, J. M.; Roldan, C. M.; Roldan, C. Synthesis and cytostatic activity of benz[de]isoquinoline-1,3-diones. Structure-activity relationships. *Eur. J. Med. Chem.* **1981**, *16*, 207-212.
97. Chau, M.; Christensen, J. L.; Ajami, A. M.; Capizzi, R. L. Amonafide, a topoisomerase II inhibitor, is unaffected by P-glycoprotein-mediated efflux. *Leuk. Res.* **2008**, *32*, 465-473.
98. Stone, R. M.; Mazzola, E.; Neuberger, D.; Allen, S. L.; Pigneux, A.; Stuart, R. K.; Wetzler, M.; Rizzieri, D.; Erba, H. P.; Damon, L.; Jang, J.-H.; Tallman, M. S.; Warzocha, K.; Masszi, T.; Sekeres, M. A.; Egyed, M.; Horst, H.-A.; Selleslag, D.; Solomon, S. R.; Venugopal, P.; Lundberg, A. S.; Powell, B. Phase III open-label randomized study of cytarabine in combination with amonafide L-malate or daunorubicin as induction therapy for patients with secondary acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1252-1257.
99. Zhang, H.; Wang, K.; Xuan, X.; Lv, Q.; Nie, Y.; Guo, H. Cancer cell-targeted two-photon fluorescence probe for the real-time ratiometric imaging of DNA damage. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 6308-6311.
100. Loving, G.; Imperiali, B. A Versatile amino acid analogue of the solvatochromic fluorophore 4-N,N-dimethylamino-1,8-naphthalimide: A powerful tool for the study of dynamic protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13630-13638.
101. Loving, G.; Imperiali, B. Thiol-reactive derivatives of the solvatochromic 4-N,N-dimethylamino-1,8-naphthalimide fluorophore: A highly sensitive toolset for the detection of biomolecular interactions. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 2133-2141.
102. Venkatraman, P.; Nguyen, T. T.; Sainlos, M.; Bilsel, O.; Chitta, S.; Imperiali, B.; Stern, L. J. Fluorogenic probes for monitoring peptide binding to class II MHC proteins in living cells. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 222-228.
103. Socher, E.; Imperiali, B. FRET-capture: A sensitive method for the detection of dynamic protein interactions. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 53-57.
104. Zhang, L.; Li, S.; Hong, M.; Xu, Y.; Wang, S.; Liu, Y.; Qian, Y.; Zhao, J. A colorimetric and ratiometric fluorescent probe for the imaging of endogenous hydrogen sulphide in living cells and sulphide determination in mouse hippocampus. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5115-5125.
105. Liu, X.-L.; Du, X.-J.; Dai, C.-G.; Song, Q.-H. Ratiometric two-photon fluorescent probes for mitochondrial hydrogen sulfide in living cells. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 9481-9489.
106. Kim, T.; Jeon, H. M.; Le, H. T.; Kim, T. W.; Kang, C.; Kim, J. S. A biotin-guided fluorescent-peptide drug delivery system for cancer treatment. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7690-7693.
107. Lee, M. H.; Han, J. H.; Lee, J.-H.; Choi, H. G.; Kang, C.; Kim, J. S. Mitochondrial thioredoxin-responding off-on fluorescent probe. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17314-17319.
108. Liu, Y.; Ma, H.; Zhang, L.; Cui, Y.; Liu, X.; Fang, J. A small molecule probe reveals declined mitochondrial thioredoxin reductase activity in a Parkinson's disease model. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 2296-2299.
109. Tang, Y.; Kong, X.; Xu, A.; Dong, B.; Lin, W. Development of a two-photon fluorescent probe for imaging of endogenous formaldehyde in living tissues. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 3356-3359.
110. Lee, Y. H.; Tang, Y.; Verwilst, P.; Lin, W.; Kim, J. S. A biotin-guided formaldehyde sensor selectively detecting endogenous concentrations in cancerous cells and tissues. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 11247-11250.

111. Pal, S.; Lohar, S.; Mukherjee, M.; Chattopadhyay, P.; Dhara, K. A fluorescent probe for the selective detection of creatinine in aqueous buffer applicable to human blood serum. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2016**, *52*, 13706-13709.
112. Dai, M.; Zhu, W.; Xu, Y.; Qian, X.; Liu, Y.; Xiao, Y.; You, Y. Versatile nitro-fluorophore as highly effective sensor for hypoxic tumor cells: design, imaging and evaluation. *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 591-597.
113. Cui, L.; Zhong, Y.; Zhu, W.; Xu, Y.; Du, Q.; Wang, X.; Qian, X.; Xiao, Y. A new prodrug-derived ratiometric fluorescent probe for hypoxia: High selectivity of nitroreductase and imaging in tumor cell. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 928-931.
114. Yin, H.; Zhu, W.; Xu, Y.; Dai, M.; Qian, X.; Li, Y.; Liu, J. Novel aliphatic N-oxide of naphthalimides as fluorescent markers for hypoxic cells in solid tumor. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3030-3037.
115. Meng, X.-M.; Wang, S.-X.; Zhu, M.-Z. Quinoline-based fluorescence sensors. In *Molecular Photochemistry. Various Aspects*, Saha, S., Ed. InTech: Shanghai, 2012; pp 3-22.
116. Carter, K. P.; Young, A. M.; Palmer, A. E. Fluorescent sensors for measuring metal ions in living systems. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4564-4601.
117. Frederickson, C. J.; Kasarskis, E. J.; Ringo, D.; Frederickson, R. E. A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. *J. Neurosci. Methods* **1987**, *20*, 91-103.
118. Zalewski, P. D.; Millard, S. H.; Forbes, I. J.; Kapaniris, O.; Slavotinek, A.; Betts, W. H.; Ward, A. D.; Lincoln, S. F.; Mahadevan, I. Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J. Histochem. Cytochem.* **1994**, *42*, 877-884.
119. Zalewski, P. D.; Forbes, I. J.; Betts, W. H. Correlation of apoptosis with change in intracellular labile zinc(II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulfonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for zinc(II). *Biochem. J.* **1993**, *296*, 403-408.
120. Xue, L.; Wang, H.-H.; Wang, X.-J.; Jiang, H. Modulating affinities of di-2-picolyamine (DPA)-substituted quinoline sensors for zinc ions by varying pendant ligands. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 4310-4318.
121. Xue, L.; Li, G.; Liu, Q.; Wang, H.; Liu, C.; Ding, X.; He, S.; Jiang, H. Ratiometric fluorescent sensor based on inhibition of resonance for detection of cadmium in aqueous solution and living cells. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 3680-3690.
122. Kim, H.; Kang, J.; Kim, K. B.; Song, E. J.; Kim, C. A highly selective quinoline-based fluorescent sensor for Zn(II). *Spectrochim. Acta, Part A* **2014**, *118*, 883-887.
123. Velmurugan, K.; Prabhu, J.; Tang, L.; Chidambaram, T.; Noel, M.; Radhakrishnan, S.; Nandhakumar, R. A simple chalcone-based fluorescent chemosensor for the detection and removal of Fe³⁺ ions using a membrane separation method. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 2883-2888.
124. Hu, J.; Li, J.; Qi, J.; Chen, J. Highly selective and effective mercury(II) fluorescent sensors. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 843-848.
125. Prachayasittikul, V.; Prachayasittikul, S.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Des. Devel. Ther.* **2013**, *7*, 1157-1178.
126. Mahanand, D.; Houck, J. C. Fluorometric determination of zinc in biologic fluids. *Clin. Chem.* **1968**, *14*, 6-11.
127. Shults, M. D.; Imperiali, B. Versatile fluorescence probes of protein kinase activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14248-14249.

128. Shults, M. D.; Janes, K. A.; Lauffenburger, D. A.; Imperiali, B. A multiplexed homogeneous fluorescence-based assay for protein kinase activity in cell lysates. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 277-283.
129. Lukovic, E.; Gonzalez-Vera, J. A.; Imperiali, B. Recognition-domain focused chemosensors: Versatile and efficient reporters of protein kinase activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12821-12827.
130. Pearce, D. A.; Jotterand, N.; Carrico, I. S.; Imperiali, B. Derivatives of 8-hydroxy-2-methylquinoline are powerful prototypes for zinc sensors in biological systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5160-5161.
131. Shults, M. D.; Pearce, D. A.; Imperiali, B. Modular and tunable chemosensor scaffold for divalent zinc. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10591-10597.
132. Gonzalez-Vera, J. A.; Lukovic, E.; Imperiali, B. Synthesis of red-shifted 8-hydroxyquinoline derivatives using click chemistry and their incorporation into phosphorylation chemosensors. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7309-7314.
133. Ojha, B.; Das, G. Environment-sensitive amphiphilic fluorophore for selective sensing of protein. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 554-560.
134. Ge, P.; Selvin, P. R. Carbostyryl derivatives as antenna molecules for luminescent lanthanide chelates. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1088-1094.
135. Dai, C.-G.; Liu, X.-L.; Du, X.-J.; Zhang, Y.; Song, Q.-H. Two-input fluorescent probe for thiols and hydrogen sulfide chemosensing and live cell imaging. *ACS Sens.* **2016**, *1*, 888-895.
136. Dong, X.; Heo, C. H.; Chen, S.; Kim, H. M.; Liu, Z. Quinoline-based two-photon fluorescent probe for nitric oxide in live cells and tissues. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 308-311.
137. Moore, E. G.; Samuel, A. P. S.; Raymond, K. N. From antenna to assay: Lessons learned in lanthanide luminescence. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 542-552.
138. Armelao, L.; Quici, S.; Barigelletti, F.; Accorsi, G.; Bottaro, G.; Cavazzini, M.; Tondello, E. Design of luminescent lanthanide complexes: From molecules to highly efficient photoemitting materials. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 487-505.
139. Martin, R. B.; Richardson, F. S. Lanthanides as probes for calcium in biological systems. *Q. Rev. Biophys.* **1979**, *12*, 181-209.
140. Bertini, I.; Kursula, P.; Luchinat, C.; Parigi, G.; Vahokoski, J.; Wilmanns, M.; Yuan, J. Accurate solution structures of proteins from X-ray data and a minimal set of NMR data: Calmodulin-peptide complexes as examples. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5134-5144.
141. Allen, K. N.; Imperiali, B. Lanthanide-tagged proteins: An illuminating partnership. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 247-254.
142. Werts, M. H. V. Making sense of lanthanide luminescence. *Sci. Prog.* **2005**, *88*, 101-131.
143. Carnall, W. T.; Fields, P. R.; Rajnak, K. Electronic energy levels in the trivalent lanthanide aquo ions. I. Pr³⁺, Nd³⁺, Pm³⁺, Sm³⁺, Dy³⁺, Ho³⁺, Er³⁺, and Tm³⁺. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 4424-4442.
144. Thibon, A.; Pierre, V. C. Principles of responsive lanthanide-based luminescent probes for cellular imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 107-120.
145. Dexter, D. L. A theory of sensitized luminescence in solids. *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 836-850.
146. Sato, S.; Wada, M. Relations between intramolecular energy transfer efficiencies and triplet state energies in rare earth β -diketone chelates. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1970**, *43*, 1955-1962.

147. Eliseeva, S. V.; Bunzli, J.-C. G. Lanthanide luminescence for functional materials and biosciences. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 189-227.
148. Haas, Y.; Stein, G. Pathways of radiative and radiationless transitions in europium(III) solutions. Role of solvents and anions. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 3668-3677.
149. Haas, Y.; Stein, G. Pathways of radiative and radiationless transitions in europium(III) solutions. The role of high energy vibrations. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 3677-3681.
150. Stein, G.; Wurzburg, E. Energy gap law in the solvent isotope effect on radiationless transitions of rare earth ions. *J. Chem. Phys.* **1975**, *62*, 208-213.
151. Streck, W.; Wierzchaczewski, M. External heavy atom effect on radiative spin-forbidden transitions. *Chem. Phys.* **1981**, *58*, 185-193.
152. Heffern, M. C.; Matosziuk, L. M.; Meade, T. J. Lanthanide probes for bioresponsive imaging. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4496-4539.
153. Filipescu, N.; Sager, W. F.; Serafin, F. A. Substituent effects on intramolecular energy transfer. II. Fluorescence spectra of europium and terbium β -diketonate chelates. *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 3324-3346.
154. Leonard, J. P.; dos Santos, C. M. G.; Plush, S. E.; McCabe, T.; Gunnlaugsson, T. pH Driven self-assembly of a ternary lanthanide luminescence complex: the sensing of anions using a [small beta]-diketonate-Eu(III) displacement assay. *Chem. Commun.* **2007**, 129-131.
155. Parker, D.; Williams, J. A. G. Modest effectiveness of carbostyryl 124 as a sensitizing chromophore in europium and terbium amide complexes based on 1,4,7,10-tetraazacyclododecane. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 1581-1586.
156. Ge, P.; Selvin, P. R. Carbostyryl derivatives as antenna molecules for luminescent lanthanide chelates. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1088-1094.
157. Kim, S. H.; Ge, P.; Katzenellenbogen, J. A. A new quinoline sensitizer-centered lanthanide chelate and its use for protein labeling on Ni-NTA beads for TR LRET assays. *Chem. Commun.* **2009**, 183-185.
158. Tremblay, M. S.; Halim, M.; Sames, D. Cocktails of Tb³⁺ and Eu³⁺ complexes: A general platform for the design of ratiometric optical probes. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7570-7577.
159. Takalo, H.; Hemmilä, T.; Sutela, T.; Latva, M. Synthesis and luminescence of novel Eu(III) complexing agents and labels with 4-(phenylethynyl)pyridine subunits. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 789-802.
160. Selvin, P. R.; Rana, T. M.; Hearst, J. E. Luminescence resonance energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6029-6030.
161. Alpha, B.; Lehn, J.-M.; Mathis, G. Energy transfer luminescence of europium(III) and terbium(III) cryptates of macrobicyclic polypyridine ligands. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 266-267.
162. Sabbatini, N.; Guardigli, M.; Manet, I.; Ungaro, R.; Casnati, A.; Fischer, C.; Ziesel, R.; Ulrich, G. Synthesis and luminescence of Eu³⁺ and Tb³⁺ complexes with novel calix[4]arene ligands carrying 2,2'-bipyridine subunits. *New J. Chem.* **1995**, *19*, 137-140.
163. Steemers, F. J.; Meuris, H. G.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N.; van der Tol, E. B.; Verhoeven, J. W. Water-soluble neutral calix[4]arene-lanthanide complexes; Synthesis and luminescence properties. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4229-4235.
164. Pazos, E.; Vazquez, M. E. Advances in lanthanide-based luminescent peptide probes for monitoring the activity of kinase and phosphatase. *Biotechnol. J.* **2014**, *9*, 241-252.

165. Sy, M.; Nonat, A.; Hildebrandt, N.; Charbonniere, L. J. Lanthanide-based luminescence biolabelling. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5080-5095.
166. Bryant, J. J.; Lindner, B. D.; Bunz, U. H. F. Water-soluble bis-triazolyl benzochalcogendiazole cycloadducts as tunable metal ion sensors. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1038-1044.
167. Braña, M. F.; Gradillas, A.; Gómez, Á.; Acero, N.; Linares, F.; Muñoz-Mingarro, D.; Abradelo, C.; Rey-Stolle, F.; Yuste, M.; Campos, J.; Gallo, M. A.; Espinosa, A. Synthesis, biological activity, and quantitative structure-activity relationship study of azanaphthalimide and aryl-naphthalimide derivatives. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2236-2242.
168. Castriconi, F.; Paolino, M.; Giuliani, G.; Anzini, M.; Campiani, G.; Mennuni, L.; Sabatini, C.; Lanza, M.; Caselli, G.; De Rienzo, F.; Menziani, M. C.; Sbraccia, M.; Molinari, P.; Costa, T.; Cappelli, A. Synthesis and structure-activity relationship studies in serotonin 5-HT₄ receptor ligands based on a benzo[de][2,6]naphthyridine scaffold. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *82*, 36-46.
169. Warner, J. C.; Nguyen, D.; Gladding, J. A.; Cheruku, S. R.; Loebelenz, J. R.; Norman, J. J.; Thota, S.; Lee, J. W.; Rosenfeld, C. Dihydro-6-azaphenylene derivatives for the treatment of CNS, oncological diseases and related disorders. WO2014052906A1, 2014.
170. Tsantrizos, Y. S.; Bailey, M. D.; Bilodeau, F.; Carson, R. J.; Coulombe, R.; Fader, L.; Halmos, T.; Kawai, S.; Landry, S.; Laplante, S.; Morin, S.; Parisien, M.; Poupart, M.-A.; Simoneau, B. Preparation of 2-(tert-butyloxy)-2-(2-methylquinolin-3-yl)acetic acid derivatives as inhibitors of human immunodeficiency virus replication. WO2009062285A1, 2009.
171. Huang, X.; Fang, Y.; Li, X.; Xie, Y.; Zhu, W. Novel dyes based on naphthalimide moiety as electron acceptor for efficient dye-sensitized solar cells. *Dyes and Pigments* **2011**, *90*, 297-303.
172. Marwah, P.; Marwah, A.; Lardy, H. A. An economical and green approach for the oxidation of olefins to enones. *Green Chemistry* **2004**, *6*, 570-577.
173. Ding, L.; Ying, H. Z.; Zhou, Y.; Lei, T.; Pei, J. Polycyclic imide derivatives: synthesis and effective tuning of lowest unoccupied molecular orbital levels through molecular engineering. *Org Lett* **2010**, *12*, 5522-5.
174. Alexiou, M. S.; Tychopoulos, V.; Ghorbanian, S.; Tyman, J. H. P.; Brown, R. G.; Brittain, P. I. The UV-visible absorption and fluorescence of some substituted 1,8-naphthalimides and naphthalic anhydrides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1990**, 837-42.
175. Zachariasse, K. A.; Grobys, M.; von der Haar, T.; Hebecker, A.; Il'ichev, Y. V.; Jiang, Y. B.; Morawski, O.; Kuehnle, W. Intramolecular charge transfer in the excited state. Kinetics and configurational changes. *J. Photochem. Photobiol., A* **1996**, *102*, 59-70.
176. Fakhari M, A.; Rokita, S. E. A new solvatochromic fluorophore for exploring nonpolar environments created by biopolymers. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2011**, *47*, 4222-4224.
177. An, B.-K.; Gierschner, J.; Park, S. Y. π -Conjugated cyanostilbene derivatives: A unique self-assembly motif for molecular nanostructures with enhanced emission and transport. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 544-554.
178. Luo, J.; Zhang, J. Donor-Acceptor Fluorophores for Visible-Light-Promoted Organic Synthesis: Photoredox/Ni Dual Catalytic C(sp³)-C(sp²) Cross-Coupling. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 873-877.
179. Oshima, J.; Shiobara, S.; Naoumi, H.; Kaneko, S.; Yoshihara, T.; Mishra, A. K.; Tobita, S. Extreme Fluorescence Sensitivity of Some Aniline Derivatives to Aqueous and Nonaqueous Environments: Mechanistic Study and Its Implication as a Fluorescent Probe. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 4629-4637.

180. Oshima, J.; Yoshihara, T.; Tobita, S. Water-induced fluorescence quenching of mono- and dicyanoanilines. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *423*, 306-311.
181. Štefane, B.; Požgan, F.; Sosič, I.; Gobec, S. A microwave-assisted nucleophilic substitution reaction on a quinoline system: the synthesis of amino analogues of nitroxoline. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 1964-1967.
182. Nadaraj, V.; Selvi, S. T. An improved synthesis of 2-amino-3-formylquinoline derivatives under phase transfer condition. *Org. Chem.: Indian J.* **2010**, *6*, 39-42.
183. Syniugin, A. R.; Chekanov, M. O.; Savitskiy, P. V.; Pashenko, A. E.; Zhuk, T. S.; Yarmoluk, S. M.; Fokin, A. A. New method for the synthesis of pyrrolo[2,3-b]dihydroquinolines. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 213-215.
184. Zhang, Y.; Guo, X.; Zheng, M.; Yang, R.; Yang, H.; Jia, L.; Yang, M. A 4,5-quinolamide-based fluorescent sensor for the turn-on detection of Cd²⁺ with live-cell imaging. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2211-2216.
185. Liu, T.; Zhang, X.; Qiao, Q.; Zou, C.; Feng, L.; Cui, J.; Xu, Z. A two-photon fluorescent probe for imaging hydrogen sulfide in living cells. *Dyes and Pigments* **2013**, *99*, 537-542.
186. Yin, J.; Hu, Y.; Yoon, J. Fluorescent probes and bioimaging: alkali metals, alkaline earth metals and pH. *Chem Soc Rev* **2015**, *44*, 4619-4644.
187. Han, J.; Burgess, K. Fluorescent Indicators for Intracellular pH. *Chem Rev* **2010**, *110*, 2709-2728.
188. Wang, R.; Yu, C.; Yu, F.; Chen, L.; Yu, C. Molecular fluorescent probes for monitoring pH changes in living cells. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2010**, *29*, 1004-1013.
189. Lin, H.-J.; Herman, P.; Kang, J. S.; Lakowicz, J. R. Fluorescence lifetime characterization of novel low-pH probes. *Anal. Biochem.* **2001**, *294*, 118-125.
190. Prasanna de Silva, A.; Gunaratne, H. Q. N.; Habib-Jiwan, J.-L.; McCoy, C. P.; Rice, T. E.; Soumillon, J.-P. New fluorescent model compounds for the study of photoinduced electron transfer: the influence of a molecular electric field in the excited state. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1728-31.
191. Sun, Y.; Liang, X.; Wei, S.; Fan, J.; Yang, X. Fluorescent turn-on detection and assay of water based on 4-(2-dimethylaminoethoxy)-N-octadecyl-1,8-naphthalimide with aggregation-induced emission enhancement. *Spectrochim. Acta, Part A* **2012**, *97*, 352-358.
192. Li, G.; Zhu, D.; Xue, L.; Jiang, H. Quinoline-based fluorescent probe for ratiometric detection of lysosomal pH. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5020-5023.
193. Zhu, S.; Lin, W.; Yuan, L. Development of a ratiometric fluorescent pH probe for cell imaging based on a coumarin-quinoline platform. *Dyes Pigm.* **2013**, *99*, 465-471.
194. Chen, Y.; Wang, H.; Wan, L.; Bian, Y.; Jiang, J. 8-Hydroxyquinoline-Substituted Boron-Dipyrromethene Compounds: Synthesis, Structure, and OFF-ON-OFF Type of pH-Sensing Properties. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3774-3781.
195. Adamo, C.; Barone, V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: the PBE0 model. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 6158-6170.
196. Hariharan, P. C.; Pople, J. A. Influence of polarization functions on MO hydrogenation energies. *Theor. Chim. Acta* **1973**, *28*, 213-22.
197. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd,

- J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2009.
198. Jacquemin, D.; Perpète, E. A.; Scalmani, G.; Ciofini, I.; Peltier, C.; Adamo, C. Absorption and emission spectra of 1,8-naphthalimide fluorophores: A PCM-TD-DFT investigation. *Chem. Phys.* **2010**, *372*, 61-66.
 199. Jacquemin, D.; Perpète, E. A.; Scalmani, G.; Frisch, M. J.; Ciofini, I.; Adamo, C. Fluorescence of 1,8-naphthalimide: A PCM-TD-DFT investigation. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *448*, 3-6.
 200. Bard, B.; Martel, S.; Carrupt, P.-A. High throughput UV method for the estimation of thermodynamic solubility and the determination of the solubility in biorelevant media. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *33*, 230-240.
 201. Alsenz, J.; Kansy, M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 546-567.
 202. Di, L.; Fish, P. V.; Mano, T. Bridging solubility between drug discovery and development. *Drug Discovery Today* **2012**, *17*, 486-495.
 203. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-12.
 204. Shoemaker, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 813-823.
 205. Loving, G.; Imperiali, B. A versatile amino acid analogue of the solvatochromic fluorophore 4-N,N-dimethylamino-1,8-naphthalimide: a powerful tool for the study of dynamic protein interactions. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 13630-8.
 206. Sainlos, M.; Imperiali, B. Synthesis of anhydride precursors of the environment-sensitive fluorophores 4-DMAP and 6-DMN. *Nat. Protocols* **2007**, *2*, 3219-3225.
 207. Ueno, K.; Misawa, H. Photochemical reaction fields with strong coupling between a photon and a molecule. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2011**, *221*, 130-137.
 208. Morgan, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, *13*, 261-291.
 209. Peyressatré, M.; Prevel, C.; Pellerano, M.; Morris, M. C. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to Peptide inhibitors. *Cancers* **2015**, *7*, 179-237.
 210. Morgan, D. O. Principles of CDK regulation. *Nature* **1995**, *374*, 131-4.
 211. Lim, S.; Kaldis, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* **2013**, *140*, 3079-3093.
 212. Hydbring, P.; Malumbres, M.; Sicinski, P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 280-292.
 213. Tsai, L.-H.; Delalle, I.; Caviness, V. S., Jr.; Chae, T.; Harlow, E. p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* **1994**, *371*, 419-423.
 214. Kusakawa, G.-I.; Saito, T.; Onuki, R.; Ishiguro, K.; Kishimoto, T.; Hisanaga, S.-I. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17166-17172.

215. Lee, M.-s.; Kwon, Y. T.; Li, M.; Peng, J.; Friedlander, R. M.; Tsai, L.-H. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* **2000**, *405*, 360-364.
216. Tarricone, C.; Dhavan, R.; Peng, J.; Areces, L. B.; Tsai, L.-H.; Musacchio, A. Structure and regulation of the CDK5-p25nck5a complex. *Mol. Cell* **2001**, *8*, 657-669.
217. Shelton, S. B.; Johnson, G. V. W. Cyclin-dependent kinase-5 in neurodegeneration. *J. Neurochem.* **2004**, *88*, 1313-1326.
218. Camins, A.; Verdaguer, E.; Folch, J.; Canudas, A. M.; Pallas, M. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. *Drug News Perspect.* **2006**, *19*, 453-460.
219. Cheung, Z. H.; Ip, N. Y. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol.* **2012**, *22*, 169-175.
220. Lau, L.-F.; Ahlijanian, M. K. Role of cdk5 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurosignals* **2003**, *12*, 209-214.
221. Kanungo, J. Special Issue on "Cdk5 and Brain Disorders": Prologue. *Brain Disord Ther* **2012**, *Suppl 1*, 1-5.
222. Brion, J.-P.; Couck, A.-M. Cortical and brainstem-type Lewy bodies are immunoreactive for the cyclin-dependent kinase 5. *Am. J. Pathol.* **1995**, *147*, 1465-76.
223. Rubio de la Torre, E.; Luzon-Toro, B.; Forte-Lago, I.; Minguez-Castellanos, A.; Ferrer, I.; Hilfiker, S. Combined kinase inhibition modulates parkin inactivation. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 809-823.
224. Nguyen, M. D.; Julien, J.-P. Cyclin-Dependent Kinase 5 in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosignals* **2003**, *12*, 215-220.
225. Meyer, D. A.; Torres-Altora, M. I.; Tan, Z.; Tozzi, A.; Di Filippo, M.; DiNapoli, V.; Plattner, F.; Kansy, J. W.; Benkovic, S. A.; Huber, J. D.; Miller, D. B.; Greengard, P.; Calabresi, P.; Rosen, C. L.; Bibb, J. A. Ischemic stroke injury is mediated by aberrant Cdk5. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 8259-8267, 9 pp.
226. Pozo, K.; Bibb, J. A. The Emerging Role of Cdk5 in Cancer. *Trends in Cancer* **2016**, *2*, 606-618.
227. Liu, R.; Tian, B.; Gearing, M.; Hunter, S.; Ye, K.; Mao, Z. Cdk5-mediated regulation of the PIKE-A-Akt pathway and glioblastoma cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 7570-7575.
228. Yushan, R.; Roodrajeetsing, G.; Wenjie, C.; Yiwu, D.; Tengfei, Z.; Madushi, W. M.; Feifei, L.; Changwen, Z.; Xin, W.; Zuyun, L.; Gang, C.; Suning, H. Insights into the clinical value of cyclin-dependent kinase 5 in glioma: a retrospective study. *World. J. Surg. Oncol.* **2015**, *13*, 223.
229. Morris, M. C.; Depollier, J.; Mery, J.; Heitz, F.; Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotech.* **2001**, *19*, 1173-1176.
230. Kurzawa, L.; Pellerano, M.; Morris, M. C. PEP and CADY-mediated delivery of fluorescent peptides and proteins into living cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 2274-2285.
231. Lee, M. H.; Han, J. H.; Lee, J.-H.; Choi, H. G.; Kang, C.; Kim, J. S. Mitochondrial Thioredoxin-Responding Off-On Fluorescent Probe. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17314-17319.
232. Hettiarachchi, S. U.; Prasai, B.; McCarley, R. L. Detection and Cellular Imaging of Human Cancer Enzyme Using a Turn-On, Wavelength-Shiftable, Self-Immolative Profluorophore. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7575-7578.
233. Cui, L.; Peng, Z.; Ji, C.; Huang, J.; Huang, D.; Ma, J.; Zhang, S.; Qian, X.; Xu, Y. Hydrazine detection in the gas state and aqueous solution based on the Gabriel mechanism and its imaging in living cells. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1485-1487.

234. Kim, T.; Jeon, H. M.; Le, H. T.; Kim, T. W.; Kang, C.; Kim, J. S. A biotin-guided fluorescent-peptide drug delivery system for cancer treatment. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7690-7693.
235. Liu, X.-L.; Du, X.-J.; Dai, C.-G.; Song, Q.-H. Ratiometric Two-Photon Fluorescent Probes for Mitochondrial Hydrogen Sulfide in Living Cells. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 9481-9489.
236. Liu, Y.; Ma, H.; Zhang, L.; Cui, Y.; Liu, X.; Fang, J. A small molecule probe reveals declined mitochondrial thioredoxin reductase activity in a Parkinson's disease model. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 2296-2299.
237. Zhang, H.; Wang, K.; Xuan, X.; Lv, Q.; Nie, Y.; Guo, H. Cancer cell-targeted two-photon fluorescence probe for the real-time ratiometric imaging of DNA damage. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 6308-6311.
238. Grimm, J. B.; English, B. P.; Chen, J.; Slaughter, J. P.; Zhang, Z.; Revyakin, A.; Patel, R.; Macklin, J. J.; Normanno, D.; Singer, R. H.; Lionnet, T.; Lavis, L. D. A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 244-250.
239. Zachariasse, K. A.; Grobys, M.; von der Haar, T.; Hebecker, A.; Il'ichev, Y. V.; Jiang, Y. B.; Morawski, O.; Kühnle, W. Intramolecular charge transfer in the excited state. Kinetics and configurational changes. *J. Photochem. Photobiol., A* **1996**, *102*, 59-70.
240. Zachariasse, K. A.; Grobys, M.; von der Haar, T.; Hebecker, A.; Il'ichev, Y. V.; Morawski, O.; Rueckert, I.; Kuehnle, W. Photoinduced intramolecular charge transfer and internal conversion in molecules with a small energy gap between S1 and S2. Dynamics and structure. *J. Photochem. Photobiol., A* **1997**, *105*, 373-383.
241. Joedicke, C. J.; Luethi, H. P. Time-dependent density functional theory (TDDFT) study of the excited charge-transfer state formation of a series of aromatic donor-acceptor systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 252-264.
242. Saha, S.; Samanta, A. Photophysical and dynamic NMR studies on 4-amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole derivatives: Elucidation of the nonradiative deactivation pathway. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 7903-7912.
243. Alexiou, M. S.; Tychopoulos, V.; Ghorbanian, S.; Tyman, J. H. P.; Brown, R. G.; Brittain, P. I. The UV-visible absorption and fluorescence of some substituted 1,8-naphthalimides and naphthalic anhydrides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1990**, 837-42.
244. Saha, S.; Samanta, A. Influence of the structure of the amino group and polarity of the medium on the photophysical behavior of 4-amino-1,8-naphthalimide derivatives. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 4763-4771.
245. Jacquemin, D.; Perpète, E. A.; Scalmani, G.; Ciofini, I.; Peltier, C.; Adamo, C. Absorption and emission spectra of 1,8-naphthalimide fluorophores: A PCM-TD-DFT investigation. *Chem. Phys.* **2010**, *372*, 61-66.
246. Liu, X.; Qiao, Q.; Tian, W.; Liu, W.; Chen, J.; Lang, M. J.; Xu, Z. Aziridinyl fluorophores demonstrate bright fluorescence and superior photostability by effectively inhibiting twisted intramolecular charge transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 6960-6963.
247. Baranov, M. S.; Solntsev, K. M.; Baleeva, N. S.; Mishin, A. S.; Lukyanov, S. A.; Lukyanov, K. A.; Yampolsky, I. V. Red-shifted fluorescent aminated derivatives of conformationally locked GFP chromophore. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 13234-13241.
248. Haberhauer, G.; Gleiter, R.; Burkhart, C. Planarized intramolecular charge transfer: A concept for fluorophores with both large Stokes shifts and high fluorescence quantum yields. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 971-978.

249. Haberhauer, G. Planarized and twisted intramolecular charge transfer: A concept for fluorophores showing two independent rotations in excited state. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 9288-9296.
250. Grabowski, Z. R.; Rotkiewicz, K.; Rettig, W. Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: Focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3899-4031.
251. Saha, S.; Samanta, A. Photophysical and dynamic NMR studies on 4-amino-7-nitrobenz-2-oxa-1-3-diazole derivatives: Elucidation of the nonradiative deactivation pathway. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 7903-7912.
252. gNMR5.0, I., AmorWay, Letchworth, Herts. SG61ZA, UK, 2004.
253. Benilova, I.; Karran, E.; De Strooper, B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 349-357.
254. Larson, M. E.; Lesne, S. E. Soluble A β oligomer production and toxicity. *J. Neurochem.* **2012**, *120*, 125-139.
255. Hamley, I. W. The amyloid beta peptide: A chemist's perspective role in Alzheimer's and fibrillization. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5147-5192.
256. Sperling, R. A.; Aisen, P. S.; Beckett, L. A.; Bennett, D. A.; Craft, S.; Fagan, A. M.; Iwatsubo, T.; Jack, C. R., Jr.; Kaye, J.; Montine, T. J.; Park, D. C.; Reiman, E. M.; Rowe, C. C.; Siemers, E.; Stern, Y.; Yaffe, K.; Carrillo, M. C.; Thies, B.; Morrison-Bogorad, M.; Wagster, M. V.; Phelps, C. H. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **2011**, *7*, 280-92.
257. Tong, H.; Lou, K.; Wang, W. Near-infrared fluorescent probes for imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5*, 25-33.
258. Xu, M.-m.; Ren, W.-m.; Tang, X.-c.; Hu, Y.-h.; Zhang, H.-y. Advances in development of fluorescent probes for detecting amyloid- β aggregates. *Acta Pharmacol. Sin.* **2016**, *37*, 719-730.
259. Nakamura, A.; Kaneko, N.; Villemagne, V. L.; Kato, T.; Doecker, J.; Dore, V.; Fowler, C.; Li, Q.-X.; Martins, R.; Rowe, C.; Tomita, T.; Matsuzaki, K.; Ishii, K.; Ishii, K.; Arahata, Y.; Iwamoto, S.; Ito, K.; Tanaka, K.; Masters, C. L.; Yanagisawa, K. High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* **2018**, *554*, 249-254.
260. Kreutzler, A. G.; Nowick, J. S. Elucidating the structures of amyloid oligomers with macrocyclic β -hairpin peptides: Insights into Alzheimer's disease and other amyloid diseases. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 706-718.
261. Cui, M. Past and recent progress of molecular imaging probes for β -amyloid plaques in the brain. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 82-112.
262. Amatsubo, T.; Yanagisawa, D.; Morikawa, S.; Taguchi, H.; Tooyama, I. Amyloid imaging using high-field magnetic resonance. *Magn. Reson. Med. Sci.* **2010**, *9*, 95-99.
263. Prasanna de Silva, A.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515-1566.
264. Prasanna de Silva, A.; Moody, T. S.; Wright, G. D. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst* **2009**, *134*, 2385-2393.
265. Daly, B.; Ling, J.; Prasanna de Silva, A. Current developments in fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors and switches. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4203-4211.

266. Aderinto, S. O.; Imhanria, S. Fluorescent and colourimetric 1, 8-naphthalimide-appended chemosensors for the tracking of metal ions: selected examples from the year 2010 to 2017. *Chem. Pap.* **2018**, Ahead of Print.
267. Singharoy, D.; Chowdhury, S.; Mati, S. S.; Ghosh, S.; Chattopadhyay, K.; Bhattacharya, S. C. Photoinduced electron transfer switching mechanism of a naphthalimide derivative with its solvatochromic behaviour: An experimental and theoretical study with in cell investigations. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 16516-16524.
268. Pardo, A.; Martin, E.; Poyato, J. M. L.; Camacho, J. J.; Guerra, J. M.; Weigand, R.; Braña, M. F.; Castellano, J. M. N-Substituted 1,8-naphthalimide derivatives as high efficiency laser dyes. *J. Photochem. Photobiol., A* **1989**, *48*, 259-63.
269. Kamlet, M. J.; Abboud, J. L. M.; Abraham, M. H.; Taft, R. W. Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, π^* , α , and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2877-87.
270. Catalán, J. Toward a generalized treatment of the solvent effect based on four empirical scales: Dipolarity (SdP, a new scale), polarizability (SP), acidity (SA), and basicity (SB) of the medium. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5951-5960.
271. Adamo, C.; Barone, V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: the PBE0 model. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 6158-6170.
272. Hariharan, P. C.; Pople, J. A. Influence of polarization functions on MO hydrogenation energies. *Theor. Chim. Acta* **1973**, *28*, 213-22.
273. Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2005**, *105*, 2999-3093.
274. Witanowski, M.; Stefaniak, L.; Webb, G. A. Nitrogen NMR Spectroscopy. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Academic Press: London, 1981; Vol. 11B.
275. Jung, H. S.; Verwilt, P.; Kim, W. Y.; Kim, J. S. Fluorescent and colorimetric sensors for the detection of humidity or water content. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1242-1256.
276. Niu, C.-G.; Qin, P.-Z.; Zeng, G.-M.; Gui, X.-Q.; Guan, A.-L. Fluorescence sensor for water in organic solvents prepared from covalent immobilization of 4-morpholinyl-1,8-naphthalimide. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 1067-1074.
277. Niu, C.; Li, L.; Qin, P.; Zeng, G.; Zhang, Y. Determination of water content in organic solvents by naphthalimide derivative fluorescent probe. *Anal. Sci.* **2010**, *26*, 671-674.
278. Li, Z.; Yang, Q.; Chang, R.; Ma, G.; Chen, M.; Zhang, W. N-Heteroaryl-1,8-naphthalimide fluorescent sensor for water: Molecular design, synthesis and properties. *Dyes Pigm.* **2010**, *88*, 307-314.
279. Alankar, S.; Vipin, B. G. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists* **2011**, *2*, 21-25.
280. Ramachandram, B.; Saroja, G.; Sankaran, N. B.; Samanta, A. Unusually high fluorescence enhancement of some 1,8-naphthalimide derivatives induced by transition metal salts. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11824-11832.
281. Badugu, R. Fluorescence sensor design for transition metal ions: The role of the PIET interaction efficiency. *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 71-83.
282. Singha, S.; Kim, D.; Roy, B.; Sambasivan, S.; Moon, H.; Rao, A. S.; Kim, J. Y.; Joo, T.; Park, J. W.; Rhee, Y. M.; Wang, T.; Kim, K. H.; Shin, Y. H.; Jung, J.; Ahn, K. H. A structural remedy toward bright dipolar fluorophores in aqueous media. *Chem Sci* **2015**, *6*, 4335-4342.

283. Stevenson, K. A.; Yen, S. F.; Yang, N. C.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D. A substituent constant analysis of the interaction of substituted naphthalene monoimides with DNA. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1677-82.
284. Hsiang, Y. H.; Jiang, J. B.; Liu, L. F. Topoisomerase II-mediated DNA cleavage by amonafide and its structural analogs. *Mol. Pharmacol.* **1989**, *36*, 371-6.
285. Kellmann, A. Intersystem crossing and internal conversion quantum yields of acridine in polar and nonpolar solvents. *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 1195-8.
286. Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. Solvent-dependent fluorescence of pyrene-3-carboxaldehyde and its applications in the estimation of polarity at micelle-water interfaces. *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 2176-80.
287. Seixas de Melo, J. S.; Becker, R. S.; Macanita, A. L. Photophysical behavior of coumarins as a function of substitution and solvent: Experimental evidence for the existence of a lowest lying $1(n,\pi^*)$ state. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 6054-8.
288. Uchiyama, S.; Takehira, K.; Yoshihara, T.; Tobita, S.; Ohwada, T. Environment-sensitive fluorophore emitting in protic environments. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5869-5872.
289. Zhu, H.; Fan, J.; Mu, H.; Zhu, T.; Zhang, Z.; Du, J.; Peng, X. d-PET-controlled "off-on" polarity-sensitive probes for reporting local hydrophilicity within lysosomes. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35627.
290. Yusupov, M. M.; Yusupova, G. Z.; Baucom, A.; Lieberman, K.; Earnest, T. N.; Cate, J. H. D.; Noller, H. F. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **2001**, *292*, 883-896.
291. Martin, R. M.; Leonhardt, H.; Cardoso, M. C. DNA labeling in living cells. *Cytometry, Part A* **2005**, *67A*, 45-52.
292. Dirks, R. W.; Tanke, H. J. Styryl molecules light-up RNAs. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 559-560.
293. Song, G.; Sun, Y.; Liu, Y.; Wang, X.; Chen, M.; Miao, F.; Zhang, W.; Yu, X.; Jin, J. Low molecular weight fluorescent probes with good photostability for imaging RNA-rich nucleolus and RNA in cytoplasm in living cells. *Biomaterials* **2014**, *35*, 2103-2112.
294. Stevens, N.; O'Connor, N.; Vishwasrao, H.; Samaroo, D.; Kandel, E. R.; Akins, D. L.; Drain, C. M.; Turro, N. J. Two color RNA intercalating probe for cell imaging applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7182-7183.
295. O'Connor, N. A.; Stevens, N.; Samaroo, D.; Solomon, M. R.; Marti, A. A.; Dyer, J.; Vishwasrao, H.; Akins, D. L.; Kandel, E. R.; Turro, N. J. A covalently linked phenanthridine-ruthenium(II) complex as a RNA probe. *Chem. Commun.* **2009**, 2640-2.
296. Yu, C. Y. Y.; Zhang, W.; Kwok, R. T. K.; Leung, C. W. T.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z. A photostable AIEgen for nucleolus and mitochondria imaging with organelle-specific emission. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 2614-2619.
297. Ma, X.; Sun, R.; Cheng, J.; Liu, J.; Gou, F.; Xiang, H.; Zhou, X. Fluorescence aggregation-caused quenching versus aggregation-induced emission: A visual teaching technology for undergraduate chemistry students. *J. Chem. Educ.* **2016**, *93*, 345-350.
298. Gao, T.; Wang, S.; Lv, W.; Liu, M.; Zeng, H.; Chen, Z.; Dong, J.; Wu, Z.; Feng, X.; Zeng, W. A self-assembled nanoprobe for long-term cancer cell nucleus-specific staining and two-photon breast cancer imaging. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 3578-3581.
299. Schreer, A.; Tinson, C.; Sherry, J. P.; Schirmer, K. Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Anal. Biochem.* **2005**, *344*, 76-85.

300. Buurma, N. J.; Haq, I. Calorimetric and spectroscopic studies of Hoechst 33258: Self-association and binding to non-cognate DNA. *J.Mol. Biol.* **2008**, *381*, 607-621.
301. Hahn, L.; Buurma, N. J.; Gade, L. H. A Water-soluble tetraazaperopyrene dye as strong G-quadruplex DNA binder. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 6314-6322.
302. Thordarson, P. Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305-1323.
303. Chaires, J. B. Analysis and interpretation of ligand-DNA binding isotherms. *Methods in Enzymol.* **2001**, *340*, 3-22.
304. Long, E. C.; Barton, J. K. On demonstrating DNA intercalation. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 271-3.
305. Wang, K.; Wang, Y.; Yan, X.; Chen, H.; Ma, G.; Zhang, P.; Li, J.; Li, X.; Zhang, J. DNA binding and anticancer activity of naphthalimides with 4-hydroxyl-alkylamine side chains at different lengths. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 937-941.
306. Kochanczyk, T.; Drozd, A.; Krezel, A. Relationship between the architecture of zinc coordination and zinc binding affinity in proteins - insights into zinc regulation. *Metallomics* **2015**, *7*, 244-257.
307. Maret, W. Analyzing free zinc(ii) ion concentrations in cell biology with fluorescent chelating molecules. *Metallomics* **2015**, *7*, 202-211.
308. Auld, D. S. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals* **2001**, *14*, 271-313.
309. Sainsbury, S.; Bernecky, C.; Cramer, P. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 129.
310. C., L. N.; C., F. H.; Christian, B. Illuminating zinc in biological systems. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 38-49.
311. Jiang, P.; Guo, Z. Fluorescent detection of zinc in biological systems: recent development on the design of chemosensors and biosensors. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 205-229.
312. Bush, A. I. Metals and neuroscience. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 184-191.
313. Hane, F. T.; Hayes, R.; Lee, B. Y.; Leonenko, Z. Effect of copper and zinc on the single molecule self-affinity of Alzheimer's amyloid- β peptides. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147488.
314. Algarra, M.; Jiménez-Herrera, C. M.; Esteves da Silva, J. C. G. Recent applications of magnesium chemical sensors in biological samples. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2015**, *45*, 32-40.
315. Hartwig, A. Role of magnesium in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2001**, *475*, 113-121.
316. Yang, L.; Arora, K.; Beard, W. A.; Wilson, S. H.; Schlick, T. Critical Role of Magnesium Ions in DNA Polymerase β 's Closing and Active Site Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8441-8453.
317. Ganga, H. V.; Noyes, A.; White, C. M.; Kluger, J. Magnesium adjunctive therapy in atrial arrhythmias. *Pacing Clin. Electrophysiol.* **2013**, *36*, 1308-18.
318. Del Gobbo, L. C.; Imamura, F.; Wu, J. H. Y.; de Oliveira Otto, M. C.; Chiuve, S. E.; Mozaffarian, D. Circulating and dietary magnesium and risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *98*, 160-173.
319. Sontia, B.; Touyz, R. M. Role of magnesium in hypertension. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *458*, 33-39.
320. Richardson, F. S. Terbium(III) and europium(III) ions as luminescent probes and stains for biomolecular systems. *Chem. Rev.* **1982**, *82*, 541-52.

321. Montgomery, C. P.; Murray, B. S.; New, E. J.; Pal, R.; Parker, D. Cell-penetrating metal complex optical probes: Targeted and responsive systems based on lanthanide luminescence. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 925-937.
322. Moore, E. G.; Samuel, A. P. S.; Raymond, K. N. From antenna to assay: Lessons learned in lanthanide luminescence. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 542-552.
323. Heffern, M. C.; Matosziuk, L. M.; Meade, T. J. Lanthanide probes for bioresponsive imaging. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4496-4539.
324. Thibon, A.; Pierre, V. C. Principles of responsive lanthanide-based luminescent probes for cellular imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 107-120.
325. Bunzli, J.-C. G. Lanthanide light for biology and medical diagnosis. *J. Lumin.* **2016**, *170*, 866-878.
326. Song, X.-Q.; Liu, W.-S.; Dou, W.; Zheng, J.-R.; Tang, X.-L.; Zhang, H.-R.; Wang, D.-Q. Tuning the self-assembly and luminescence properties of lanthanide coordination polymers by ligand design. *Dalton Trans.* **2008**, 3582-3591.
327. Binnemans, K. Interpretation of europium(III) spectra. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *295*, 1-45.
328. Bretonniere, Y.; Cann, M. J.; Parker, D.; Slater, R. Design, synthesis and evaluation of ratiometric probes for hydrogencarbonate based on europium emission. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1624-1632.
329. Fabian, W. M. F.; Niederreiter, K. S.; Uray, G.; Stadlbauer, W. Substituent effects on absorption and fluorescence spectra of carbostyrils. *J. Mol. Struct.* **1999**, *477*, 209-220.
330. Thu Huong, T.; Kim Anh, T.; Thi Khuyen, H.; Thu Hien, P.; Quoc Minh, L. Fabrication and properties of terbium phosphate nanorods. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* **2012**, *3*, 015010.
331. Carnall, W. T.; Fields, P. R.; Rajnak, K. Electronic energy levels of the trivalent lanthanide aquo ions. III. Tb⁺⁺⁺. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 4447-9.
332. Bunzli, J.-C. G.; Eliseeva, S. V. Basics of lanthanide photophysics. In *Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects*, Hänninen, P.; Härmä, H., Eds. Springer GmbH: Berlin Heidelberg, 2011; Vol. 7, pp 1-46.
333. Kumar, P.; Kaushik, R.; Ghosh, A.; Jose, D. A. Detection of moisture by fluorescent OFF-ON sensor in organic solvents and raw food products. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 11314-11318.
334. Song, L.; Wu, Y.-W.; Chai, W.-X.; Tao, Y.-S.; Jiang, C.; Wang, Q.-H. Fluorescence quenching of a europium coordination compound for the detection of trace amounts of water: Uncovering the response mechanism by structural confirmation. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015*, 2264-2271.
335. Haas, Y.; Stein, G. Pathways of radiative and radiationless transitions in europium(III) solutions. Role of solvents and anions. *The Journal of Physical Chemistry* **1971**, *75*, 3668-3677.
336. Haas, Y.; Stein, G. Pathways of radiative and radiationless transitions in europium(III) solutions. The role of high energy vibrations. *The Journal of Physical Chemistry* **1971**, *75*, 3677-3681.
337. Hückel, E. Die freien Radikale der organischen Chemie. *Zeitschrift für Physik* **1933**, *83*, 632-668.
338. Ronald, B.; Frank, W. F., Jr. Charge transport in nanoscale aromatic and antiaromatic systems. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2008**, *20*, 374104.

339. Quinn, J. R.; Foss, F. W.; Venkataraman, L.; Breslow, R. Oxidation Potentials Correlate with Conductivities of Aromatic Molecular Wires. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 12376-12377.
340. Quinn, J. R.; Foss, F. W.; Venkataraman, L.; Hybertsen, M. S.; Breslow, R. Single-Molecule Junction Conductance through Diaminoacenes. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 6714-6715.
341. Jin, Z.; Teo, Y. C.; Teat, S. J.; Xia, Y. Regioselective Synthesis of [3]Naphthylenes and Tuning of Their Antiaromaticity. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 15933-15939.
342. Poole, L. B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, *80*, 148-157.
343. Wang, Y.; Zhu, M.; Jiang, E.; Hua, R.; Na, R.; Li, Q. X. A Simple and Rapid Turn On ES IPT Fluorescent Probe for Colorimetric and Ratiometric Detection of Biothiols in Living Cells. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 4377.
344. Kimura, H.; Nagai, Y.; Umemura, K.; Kimura, Y. Physiological Roles of Hydrogen Sulfide: Synaptic Modulation, Neuroprotection, and Smooth Muscle Relaxation. *Antioxidants & Redox Signaling* **2005**, *7*, 795-803.
345. Jung, H. S.; Chen, X.; Kim, J. S.; Yoon, J. Recent progress in luminescent and colorimetric chemosensors for detection of thiols. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 6019-6031.
346. Carru, C.; Deiana, L.; Sotgia, S.; Pes, G. M.; Zinellu, A. Plasma thiols redox status by laser-induced fluorescence capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS* **2004**, *25*, 882-889.
347. Hwang, C.; Sinsky, A.; Lodish, H. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* **1992**, *257*, 1496-1502.
348. Hong, R.; Han, G.; Fernández, J. M.; Kim, B.-j.; Forbes, N. S.; Rotello, V. M. Glutathione-Mediated Delivery and Release Using Monolayer Protected Nanoparticle Carriers. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 1078-1079.
349. Yin, G.-x.; Niu, T.-t.; Gan, Y.-b.; Yu, T.; Yin, P.; Chen, H.-m.; Zhang, Y.-y.; Li, H.-t.; Yao, S.-z. A Multi-signal Fluorescent Probe with Multiple Binding Sites for Simultaneous Sensing of Cysteine, Homocysteine, and Glutathione. *Angewandte Chemie* **2018**, *130*, 5085-5088.
350. Liu, Z.; Zhou, X.; Miao, Y.; Hu, Y.; Kwon, N.; Wu, X.; Yoon, J. A Reversible Fluorescent Probe for Real-Time Quantitative Monitoring of Cellular Glutathione. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 5812-5816.
351. Heng, S.; Zhang, X.; Pei, J.; Abell, A. A Rationally Designed Reversible 'Turn-Off' Sensor for Glutathione. *Biosensors* **2017**, *7*, 36.
352. Krezel, A.; Bal, W. Coordination chemistry of glutathione. *Acta biochimica Polonica* **1999**, *46*, 567-580.
353. Baloun, J.; Adam, V.; Trnkova, L.; Beklova, M.; Svobodova, Z.; Zeman, L.; Kizek, R. Complexes of glutathione with heavy metal ions as a new biochemical marker of aquatic environment pollution. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2010**, *29*, 497-500.
354. Dai, Z.; Tian, L.; Ye, Z.; Song, B.; Zhang, R.; Yuan, J. A Lanthanide Complex-Based Ratiometric Luminescence Probe for Time-Gated Luminescence Detection of Intracellular Thiols. *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 11658-11664.
355. Dai, Z.; Tian, L.; Song, B.; Ye, Z.; Liu, X.; Yuan, J. Ratiometric Time-Gated Luminescence Probe for Hydrogen Sulfide Based on Lanthanide Complexes. *Analytical Chemistry* **2014**, *86*, 11883-11889.

356. McMahon, B. K.; Gunnlaugsson, T. Selective Detection of the Reduced Form of Glutathione (GSH) over the Oxidized (GSSG) Form Using a Combination of Glutathione Reductase and a Tb(III)-Cyclen Maleimide Based Lanthanide Luminescent 'Switch On' Assay. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 10725-10728.
357. Kumar, K.; Chang, C. A.; Tweedle, M. F. Equilibrium and kinetic studies of lanthanide complexes of macrocyclic polyamino carboxylates. *Inorganic Chemistry* **1993**, *32*, 587-593.
358. Raghunand, N.; Howison, C.; Sherry, A. D.; Zhang, S.; Gillies, R. J. Renal and systemic pH imaging by contrast-enhanced MRI. *Magnetic Resonance in Medicine* **2003**, *49*, 249-257.
359. De Leon-Rodriguez, L. M.; Lubag, A. J. M.; Malloy, C. R.; Martinez, G. V.; Gillies, R. J.; Sherry, A. D. Responsive MRI Agents for Sensing Metabolism in Vivo. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42*, 948-957.
360. Lowe, M. P.; Parker, D.; Reany, O.; Aime, S.; Botta, M.; Castellano, G.; Gianolio, E.; Pagliarin, R. pH-Dependent Modulation of Relaxivity and Luminescence in Macrocyclic Gadolinium and Europium Complexes Based on Reversible Intramolecular Sulfonamide Ligation. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 7601-7609.
361. Bui, A. T.; Grichine, A.; Duperray, A.; Lidon, P.; Riobé, F.; Andraud, C.; Maury, O. Terbium(III) Luminescent Complexes as Millisecond-Scale Viscosity Probes for Lifetime Imaging. *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 7693-7696.
362. Liang, B.; Wang, B.; Ma, Q.; Xie, C.; Li, X.; Wang, S. A lysosome-targetable turn-on fluorescent probe for the detection of thiols in living cells based on a 1,8-naphthalimide derivative. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2018**, *192*, 67-74.
363. Zhao, C.; Whalen, D. L. Transition State Effects in the Acid-Catalyzed Hydrolysis of 5-Methoxyacenaphthylene 1,2-Oxide: Implications for the Mechanism of Acid-Catalyzed Hydrolysis of Cyclopenta[cd]pyrene 3,4-Oxide. *Chemical Research in Toxicology* **2006**, *19*, 217-222.
364. de la Reberdière, A.; Lachaud, F.; Chuburu, F.; Cadiou, C.; Lemerrier, G. Synthesis of a new family of protected 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid derivatives with thioctic acid pending arms. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53*, 6115-6118.
365. Congreve, A.; Parker, D.; Gianolio, E.; Botta, M. Steric control of lanthanide hydration state: fast water exchange at gadolinium in a mono-amide 'DOTA' complex. *Dalton Transactions* **2004**, 1441-1445.
366. Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples. *Nature Protocols* **2013**, *8*, 1535.
367. Rurack, K.; Spieles, M. Fluorescence Quantum Yields of a Series of Red and Near-Infrared Dyes Emitting at 600–1000 nm. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 1232-1242.
368. vandeVen, M.; Ameloot, M.; Valeur, B.; Boens, N. Pitfalls and Their Remedies in Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy and Microscopy. *Journal of Fluorescence* **2005**, *15*, 377-413.
369. *gNMR*, *gNMR5.0*; IvorySoft: Letchworth, Herts. SG61ZA, UK, 2004.
370. Adamo, C.; Barone, V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. *The Journal of Chemical Physics* **1999**, *110*, 6158-6170.
371. Hariharan, P. C.; Pople, J. A. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theoretica chimica acta* **1973**, *28*, 213-222.

372. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1990**, *82*, 1107-1112.
373. Shoemaker, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6*, 813.
374. Maus, M.; Cotlet, M.; Hofkens, J.; Gensch, T.; De Schryver, F. C.; Schaffer, J.; Seidel, C. A. M. An Experimental Comparison of the Maximum Likelihood Estimation and Nonlinear Least-Squares Fluorescence Lifetime Analysis of Single Molecules. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 2078-2086.



Programa de Doctorado en Química Médica

**NUEVOS FLUORÓFOROS CON
APLICACIÓN EN EL DESARROLLO DE
BIONSENSORES FLUORESCENTES
DE PROTEÍNAS**

Tesis Doctoral presentada por

Francisco José Fueyo González

2018