

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ángela Martínez Peragón
D.L.: GR 622-2014
ISBN: 978-84-9028-848-1

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor:
D.L.: En trámite
ISBN: En trámite

La doctorando ÁNGELA MARTÍNEZ PERAGÓN y los directores de la tesis JUAN MANUEL CUERVA CARVAJAL, JOSÉ JUSTICIA LADRÓN DE GUEVARA y JOSÉ MARÍA ÁLVAREZ PEZ, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, Julio 2013

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: Juan Manuel Cuerva Carvajal

Fdo.: Ángela Martínez Peragón

Fdo.: José Justicia Ladrón de Guevara

Fdo.: José María Álvarez Pez



Los doctores JUAN MANUEL CUERVA CARVAJAL, JOSÉ JUSTICIA LADRÓN DE GUEVARA, y JOSÉ MARÍA ÁLVAREZ PEZ,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “*Desarrollo de reacciones de formación de enlaces carbono-carbono mediadas por complejos de titanio(III) y estudio físico-químico de nuevos derivados xanténicos*” ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica y en el Departamento de Química-Física de la Universidad de Granada, bajo su dirección, por la licenciada Ángela Martínez Peragón y autorizan su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral con mención de Doctor Internacional.

Granada, Julio 2013.

Fdo.: Dr. Juan Manuel Cuerva Carvajal

Fdo.: Dr. José Justicia Ladrón de Guevara

Fdo.: Dr. José María Álvarez Pez



Esta Tesis Doctoral se ha organizado en dos bloques distintos. El Bloque A contiene los capítulos I y II y el Bloque B contiene el capítulo III.

En la Introducción del Bloque A se recoge una revisión general de las aplicaciones de distintos complejos de titanoceno(III). También se resume la reactividad de distintos complejos de paladio y níquel. Por último se muestra la importancia de la combinación de la química radicalaria y la química de los metales de transición en el desarrollo de nuevos métodos de síntesis.

El primer capítulo se ha titulado "**REACCIONES DE ALILACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS CATALIZADAS POR EL SISTEMA MULTIMETÁLICO [Ti]/[Ni]**". En primer lugar, se presenta una introducción centrada en reacciones de alilación de compuestos carbonílicos mediadas por distintos metales de transición en bajo estado de oxidación. A continuación se recogen los resultados obtenidos en el estudio realizado empleando el sistema multimetálico [Ti]/[Ni] sobre reacciones de alilación de compuestos carbonílicos así como las conclusiones derivadas del mismo.

El segundo capítulo se ha titulado "**NUEVAS REACCIONES DE ADICIÓN TIPO BARBIER QUIMIOSELECTIVAS CATALIZADAS POR COMPLEJOS DE TITANIO(III)**". En primer lugar se presenta una introducción sobre la reactividad del complejo de titanoceno(III) comúnmente usado. A continuación se muestran los resultados obtenidos al llevar a cabo reacciones típicas de la química de titanoceno(III) con un nuevo complejo, mostrando las diferencias de reactividad. Posteriormente se comentarán las conclusiones extraídas de este estudio.

En la Introducción del Bloque B se recoge una revisión general de las aplicaciones de la fluoresceína y sus derivados. También se resumen las técnicas y

metodologías empleadas para la determinación de las propiedades físico-químicas de compuestos fluorescentes.

El tercer capítulo se ha titulado "**SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS XANTÉNICOS FLUORESCENTES Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**". En primer lugar se presenta una breve introducción acerca de los derivados xanténicos denominados Tokyo Green y los primeros alquixantenos sintetizados, así como una breve descripción de algunos compuestos empleados como detectores de iones. A continuación se presentarán los resultados obtenidos de un estudio físico-químico exhaustivo con distintos alquixantenos y arilxantenos midiendo propiedades como absorbancia, fluorescencia y tiempo de vida. Entre ellos, se destacará el denominado Granada Green, con el que se llevaron a cabo experimentos en células vivas. Posteriormente se comentarán las conclusiones derivadas de este trabajo.

Por último, se presenta una Parte Experimental con la descripción de los protocolos experimentales llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, así como la caracterización de los nuevos compuestos obtenidos.

This memory has been organized in two different sections. Section A contains Chapters I and II; and Section B contains Chapter III.

The first part of Section A is a general overview of the titanocen(III) complex chemistry. Additionally, the reactivity of different palladium and nickel complexes have been included to illustrate the benefits that the combination of titanium(III) chemistry with transition metal mediated chemistry could solve synthetic problems.

A first chapter titled: **"REACCIONES DE ALILACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS CATALIZADAS POR EL SISTEMA MULTIMETÁLICO [Ti]/[Ni]"** has been organized as follows: an introduction about the allylation reaction of carbonyl compounds mediated by different low-valent transition metals. Second, we have shown the results obtained for the allylation reaction of carbonyl compounds using the multimetallic system [Ti]/[Ni] and the conclusions for this experimental work.

A second chapter titled: **"NUEVAS REACCIONES DE ADICIÓN TIPO BARBIER QUIMIOSELECTIVAS CATALIZADAS POR COMPLEJOS DE TITANIO(III)"** has been organized as follows: an introduction about the reactivity of bis(ciclopentadienyl)titanium(III) complex. Next, the results obtained using a new titanocen(III) carboxylate, showing differences between them and the conclusions for this experimental work.

The first part of Section B is a general overview about some applications of fluorescein and its derivatives. We have also explained the technology and methodology used in order to measure the physico-chemical properties of fluorescent compounds.

Chapter III is the last one and it is called **"SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS XANTÉNICOS FLUORESCENTES Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS"**

and it has been organized as follow: an introduction about Tokyo Green compounds and the first example of 9-alkyl substituted xanthenone as a fluorescent compound. Second, the results obtained in the study of a new family of 9-alkyl and aryl substituted xanthenones: absorption and fluorescent porperties, and half life time. Next, we have shown the conclusions for this experimental work.

The last part of this memory is an Experimental Section, describing experimental protocols and the NMR of new compounds.

ÍNDICE

BLOQUE A

INTRODUCCIÓN	1
1. COMPLEJOS DE TITANOCENO(III) Y QUÍMICA DE RADICALES LIBRES	3
1.1. Reacciones de apertura homolítica de epóxidos catalizadas por titanoceno(III)	8
1.2. Reacciones de haluros activados catalizadas por titanoceno(III)	10
1.3. Reacciones de compuestos carbonílicos catalizadas por titanoceno(III)	20
1.4. Reducción de radicales carbonados con titanoceno(III) y agua	24
2. COMPLEJOS ALIL-METAL EN SÍNTESIS ORGÁNICA	29
2.1. Complejos η^3 -alil-paladio	32
2.2. Complejos η^3 -alil-níquel	37
3. COMBINACIÓN DE QUÍMICA DE RADICALES LIBRES CON LA CATÁLISIS CON METALES DE TRANSICIÓN	41
CAPÍTULO I	47
REACCIONES DE ALILACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS CATALIZADAS POR EL SISTEMA MULTIMETÁLICO [Ti]/[Ni]	
ANTECEDENTES	49
1. REACCIONES DE ALILACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS MEDIADAS POR COMPLEJOS DE PALADIO	51
2. REACCIONES DE ALILACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS MEDIADAS POR COMPLEJOS DE NÍQUEL	62
OBJETIVOS	69

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONS	95
CAPÍTULO II	99
NUEVAS REACCIONES DE ADICIÓN TIPO BARBIER QUIMIOSELECTIVAS CATALIZADAS POR COMPLEJOS DE TITANIO(III)	
ANTECEDENTES	101
1. REACCIONES DE ACOPLAMIENTO PINACOLÍNICO PROMOVIDAS POR TITANOCENO(III)	103
2. REACCIONES DE DESOXIGENACIÓN Y REDUCCIÓN DE EPÓXIDOS MEDIADAS POR TITANOCENO(III)	108
3. REACCIONES DE ADICIÓN INTERMOLECULAR Y CICLACIÓN MEDIADAS POR TITANOCENO(III)	110
4. REACCIONES TIPO BARBIER DE PRENILACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS	116
OBJETIVOS	123
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	127
CONCLUSIONS	145

BLOQUE B

INTRODUCCIÓN	149
1. FLUORESCENCIA. APLICACIONES, LIMITACIONES Y DERIVADOS	151
2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL: CONTAJE DE FOTONES INDIVIDUALES CORRELACIONADOS EN EL TIEMPO	163
2.1. Fuentes de luz y detectores instrumentos de TCSPC	166
2.2. Integral de convolución. Análisis de los decaimientos	168
3. REACCIONES DE TRANSFERENCIA PROTÓNICA EN EL ESTADO EXCITADO	171
3.1. Reacciones ESPT en presencia de un aceptor/dador protónico	179
3.2. Reacciones ESPT de la fluoresceína	183
3.3. Identificabilidad del sistema compartimental	192
CAPÍTULO III	193
SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS XANTÉNICOS FLUORESCENTES Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	
ANTECEDENTES	195
1. DERIVADOS XANTÉNICOS SIN GRUPO CARBOXÍLO: FAMILIA TOKYO GREEN	197
2. PRIMEROS ESTUDIOS FOTOQUÍMICOS DE 9-ALQUILXANTENOS	205
3. DERIVADOS XANTÉNICOS PARA LA DETECCIÓN DE IONES	209
OBJETIVOS	223

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	229
1. SÍNTESIS Y CARACTERÍSTICAS FOTOQUÍMICAS DE NUEVOS 9-ALQUILXANTENOS	231
2. SÍNTESIS DE NUEVOS 9-ARILXANTENOS Y SU APLICACIÓN COMO SONDAS FLUORESCENTES EN CÉLULAS VIVAS: GRANADA GREEN	258
CONCLUSIONS	277
EXPERIMENTAL SECTION	281

BLOQUE A
INTRODUCCIÓN

1. COMPLEJOS DE TITANOCENO(III) Y QUÍMICA DE RADICALES LIBRES

Los radicales libres son especies capaces de reaccionar de forma controlada con numerosos grupos funcionales, por lo que se han en una herramienta muy útil en Química Orgánica para la formación de enlaces C-C.

La química de radicales libres representa una interesante alternativa a las reacciones que involucran especies iónicas, debido a ventajas tales como su alta quimioselectividad y las condiciones de reacción suaves que requiere.¹ Además, estos radicales pueden ser fácilmente reducidos al carbanión u oxidados al carbocatión correspondiente mediante el empleo de cantidades estequiométricas de un reductor u oxidante, respectivamente.

El titanio es el séptimo metal más abundante de la Tierra y uno de los metales de transición más económicos y más respetuosos con el medio ambiente. Una metodología muy extendida en reacciones radicalarias consiste en el empleo de complejos de titanio en bajo estado de oxidación como agentes de transferencia monoeléctronica. Así por ejemplo, el cloruro de bis(ciclopentadienil)titanio(III), caracterizado por Green en 1972,² ha encontrado multitud de aplicaciones gracias a sus características particulares.³

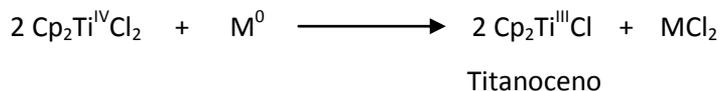
¹ *Radicals Reactions in Organic Synthesis*, Ed.: S. Z. Zard, Oxford University Press, Oxford, **2003**.

² M. L. H. Green, C. R. Lucas, *J. Chem. Soc.* **1972**, 1000-1003.

³ "Dichlorobis(cyclopentadienyl)titanium" D. Miguel, A. G. Campaña, J. Justicia, J. M. Cuerva, *e-EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* **2012**.

Bloque A. Introducción

A dicho complejo se le conoce también con el nombre de cloruro de titanoceno y se genera *in situ* por agitación de Cp_2TiCl_2 comercial con metales reductores como Mn, Zn o Mg (Esquema 1).⁴



Esquema 1

Por otro lado, se ha observado que cuando se utiliza THF como disolvente este complejo se encuentra como una mezcla en equilibrio entre la especie mononuclear I y su correspondiente dímero II (Figura 1).

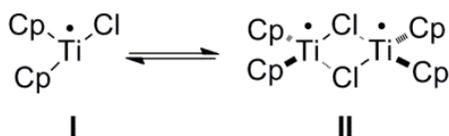


Figura 1

Tanto I como II poseen electrones desapareados, lo que les confiere un carácter reductor monoeléctrico suave.^{5,6} Además, I posee una vacante de coordinación que le permite coordinarse a heteroátomos y llevar a cabo procesos de transferencia monoeléctrica de esfera interna. Ambas características hacen del titanoceno un agente capaz de promover diversos procesos radicalarios con una amplia variedad de sustratos.

⁴ a) D. J. Sekutowski, G. D. Stucky, *Inorg. Chem.* **1975**, *14*, 2192-2199; b) R. S. P. Coutts, P. C. Wiles, R. L. Martin, *J. Organomet. Chem.* **1973**, *47*, 375-382; c) D. W. Stephan, *Organometallics* **1992**, *11*, 996-999; d) D. J. Sekutowski, T. R. Jungs, G. D. Stucky, *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 1848-1855.

⁵ R. J. Enemaerke, J. Larsen, T. Skrydstrup, K. Daasbjerg, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7853-7864.

⁶ R. J. Enemaerke, J. Larsen, T. Skrydstrup, K. Daasbjerg, *Organometallics*. **2004**, *23*, 1866-1874.

Un gran avance en el uso de complejos de Ti(III) en procesos radicalarios es la posibilidad de emplearlos en cantidades subestequiométricas. Para ello es necesario reutilizar las especies finales de Ti(IV) procedentes de la oxidación de Ti(III). La utilización de un regenerador de Cp_2TiCl_2 y un metal corrector cerrarían el ciclo catalítico. Ésto ha impulsado el desarrollo de diversos agentes regeneradores de Ti(IV):

- El uso de clorosilanos y de clorohidrato de 2,4,6-colidinio (**III**, Figura 2) permite la regeneración del complejo inicial de Ti(IV) a partir de especies alcoxi-Ti(IV).^{7,8}
- La regeneración de Cp_2TiCl_2 a partir de otros derivados de Ti(IV) como Cp_2TiClH o $\text{Cp}_2\text{TiClOAc}$ sólo es posible gracias al derivado aprótico cloruro de 2,4,6-trimetil-1-trimetilsililpiridinio **IV** (Figura 2), generado a partir de la mezcla 2,4,6-colidina/Cl-TMS, que fue desarrollado por nuestro grupo de investigación.⁸

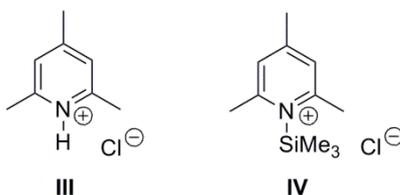


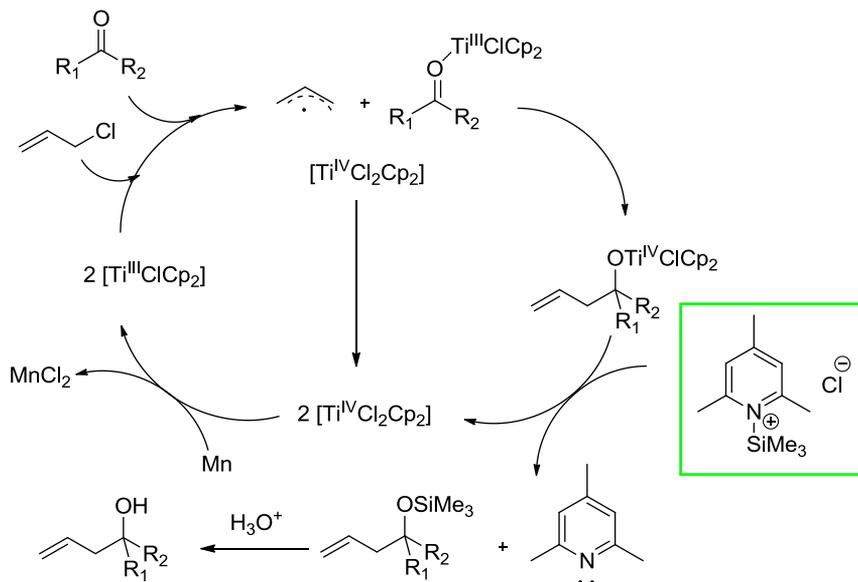
Figura 2

En el Esquema 2 se muestra un ejemplo de cómo funciona el ciclo catalítico empleando dicho regenerador aprótico aplicado al caso de una alilación tipo Barbier de cetonas, que se comentará más adelante.⁹

⁷ A. Gansäuer, M. Pierobon, H. Bluhm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 101-103.

⁸ A. F. Barrero, A. Rosales, J. M. Cuerva, J. E. Oltra, *Org. Lett.* **2003**, 5, 1935-1938.

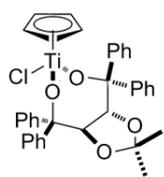
Bloque A. Introducción



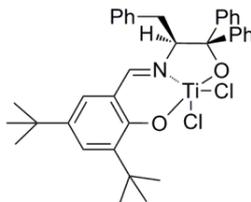
La posibilidad de emplear cantidades subestequiométricas del complejo metálico ha permitido el desarrollo de versiones enantioselectivas, ya que la mayoría de los complejos de Ti(IV) quirales empleados tienen elevado coste y en determinados casos son difíciles de sintetizar. Algunos ejemplos como los complejos de Duthaler y Hafner, Riant, Halterman, Kagan o Brintzinger se muestran en la Figura 3.¹⁰

⁹ R. E. Estevez, J. Justicia, B. Bazdi, N. Fuentes, M. Paradás, D. Choquesillo-Lazarte, J. M. García-Ruiz, R. Robles, A. Gansäuer, J. M. Cuerva, J. E. Oltra, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 2774-2791.

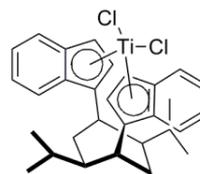
¹⁰a) A. Hafner, R. O. Duthaler, R. Marti, G. Rihs, P. Rothe-Streit, F. Schwarzenbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2321-2336; b) A. Bensari, J.-L. Renaud, O. Riant, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3863-3865; c) Z. Chen, R. L. Halterman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2276-2277; d) E. Cesarotti, H. B. Kagan, R. Goddard, C. Krüger, *J. Organomet. Chem.* **1978**, *162*, 297-309; e) F. R. W. P. Wild, L. Zsolnai, G. Huttner, H. H. Brintzinger, *J. Organomet. Chem.* **1982**, *232*, 233-247.



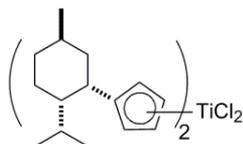
Duthaler y Hafner



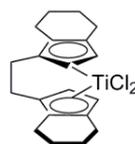
Riant



Halterman



Kagan



Brintzinger

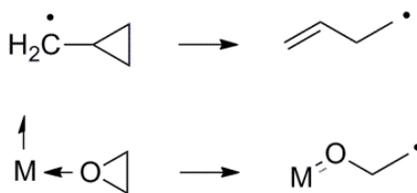
Figura 3

A continuación se presentan los ejemplos más representativos de reacciones radicalarias, en las cuales se emplean complejos de titanoceno(III) como catalizador.

1.1. Reacciones de apertura homolítica de epóxidos catalizadas por titanio(III)

Los epóxidos se pueden preparar fácilmente a partir de sustratos de partida accesibles como alquenos, dioles o compuestos carbonílicos. Su síntesis enantioselectiva también se puede abordar gracias a distintos métodos de epoxidación, destacando los desarrollados por Jacobsen, Sharpless o Shi.^{11,12}

El proceso de apertura homolítica de epóxidos empleando complejos de titanio(III) fue descrito por Rajanbabu y Nugent entre 1989 y 1994: un exceso de Cp_2TiCl es capaz de romper el enlace C-O del epóxido, generando un carbono radical, de manera análoga a lo que ocurre en la formación de radicales homoalílicos a partir de un radical ciclopropilmetilo (Esquema 3).¹³



Esquema 3

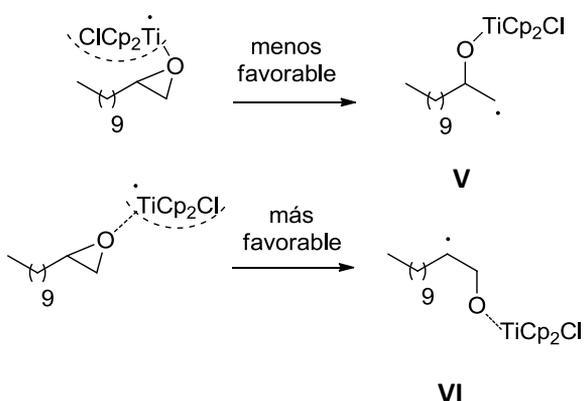
La regioselectividad de este proceso viene dada tanto por la estabilidad relativa de los radicales que se forman, como por las interacciones estéricas entre

¹¹ *Comprehensive Organic Transformations*, Vol 2, Ed. R. C. Larock, Wiley, New York 1999.

¹² a) M. B. Smith, J. March, en *Advanced Organic Chemistry*, ed. Wiley-VCH, Weinheim; b) K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K. S. Jeong, H. L. Kwong, K. Morikawa, Z. M. Wang, D. Xu, X. L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2768–2771; c) Y. Tu, Z. X. Wang, Y. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9806–9807; d) W. Zhang, J. L. Loebach, S. R. Wilson, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 2801–2803.

¹³ a) W. A. Nugent, T. V. Rajanbabu, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 8591–8562; b) T. V. Rajanbabu, W. A. Nugent, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4525–4527; c) T. V. Rajanbabu, W. A. Nugent, M. S. Beattie, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6408–6409; d) T. V. Rajanbabu, W. A. Nugent, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 986–997.

los ligandos del complejo metálico con el sustrato.^{14,15} Generalmente se obtendrá el radical en la posición más sustituida. La quimioselectividad vendrá determinada por la modulación en las propiedades redox que ejercen los ligandos ciclopentadienilo del complejo de titanio y por su volumen estérico (Esquema 4).¹⁶



Esquema 4

El correspondiente β-titanoxirradical **V** o **VI** generado puede ser empleado en:

- Procesos de desoxigenación o reducción.
- Reacciones de formación de enlace C-C mediante su adición inter o intramolecular a distintos grupos funcionales.

En el Capítulo II de esta memoria se explicarán con más detalle reacciones en las que el β-titanoxirradical puede verse implicado.

¹⁴ H. Zipse, *Top. Curr. Chem.* **2006**, 263, 163-189.

¹⁵ A. Gansäuer, A. Barchuk, F. Keller, M. Schmitt, S. Grimme, M. Gerenkamp, C. Mück-Lichtenfeld, K. Daasbjerg, H. Svith, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1359-1371.

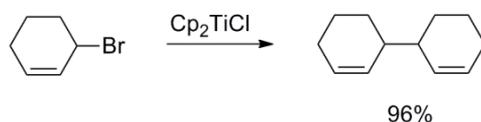
¹⁶ A. Gansäuer, H. Bluhm, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2771-2788.

1.2. Reacciones de haluros activados catalizadas por titanoceno(III)

El cloruro de bis(ciclopentadienil)titanio(III) es capaz de reaccionar con sustratos activados (haluros alílicos, propargílicos o bencílicos) obteniéndose las correspondientes especies dímeras a través de un acoplamiento tipo Würtz. En presencia de compuestos carbonílicos se pueden llevar a cabo reacciones de adición tipo Barbier. Por otro lado, cuando se emplean α -halocetonas o α -haloésteres tienen lugar reacciones tipo Reformatsky.

▪ Reacciones de acoplamiento tipo Würtz

La dimerización tipo Würtz de haluros alílicos puede ser promovida por diversos metales.¹⁷ En 1990, los trabajos de Yanlong y col. mostraron que el Ti(III) también es capaz de catalizar esta transformación (Esquema 5).¹⁸



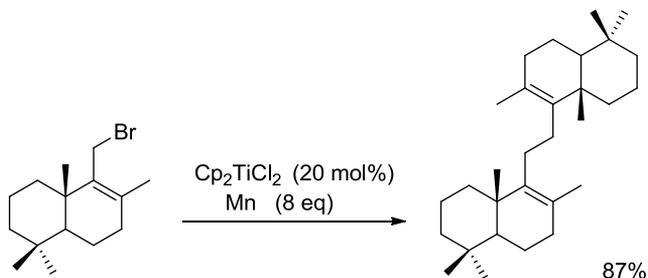
Esquema 5

En este contexto, en 2005, se llevó a cabo el homoacoplamiento de haluros alílicos terpénicos catalizado por cloruro de bis(ciclopentadienil)titanio(III), siendo

¹⁷ R. Baker, *Chem. Rev.* **1973**, 73, 487-530.

¹⁸ Q. Yanlong, L. Guisheng, Y. Huang, *J. Organomet. Chem.* **1990**, 381, 29-34.

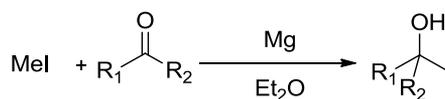
esta reacción la etapa clave en la síntesis de distintos terpenoides simétricos, como β -onoceradieno (Esquema 6).¹⁹



Esquema 6

▪ Reacciones de alilación tipo Barbier

En 1899, Phillipe Barbier desarrolló la reacción de acoplamiento entre una cetona y un haluro de alquilo empleando cantidades estequiométricas de magnesio, obteniendo el correspondiente alcohol terciario (Esquema 7).²⁰



Esquema 7

Posteriormente, los trabajos pioneros del Prof. Reetz demostraron que los complejos de tipo alilitanio son de gran interés como especies alilantes, debido a su

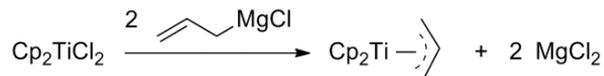
¹⁹ A. F. Barrero, M. M. Herrador, J. F. Quílez del Moral, P. Arteaga, J. F. Arteaga, M. Piedra, E. M. Sánchez, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2301-2304.

²⁰ P. Barbier, *Compt. Rend.* **1899**, *128*, 110-111.

Bloque A. Introducción

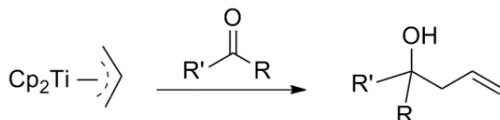
alta quimio, regio, diastereo y enantioselectividad.²¹ Dependiendo del estado de oxidación del centro metálico pueden existir como complejos η^3 ó η^1 -alilitanio.

Los complejos η^3 -alil-titanio(III) se obtienen fácilmente por reacción de Cp_2TiCl_2 con alilmagnesianos (Esquema 8).²²



Esquema 8

Los grupos de Sato y Teuben demostraron que las especies η^3 -alilitanio se comportan como agentes nucleófilos.²³ Así, en presencia de electrófilos, como grupos carbonilo, tiene lugar la formación de un nuevo enlace C-C, obteniéndose los correspondientes alcoholes homoalílicos (Esquema 9).



Esquema 9

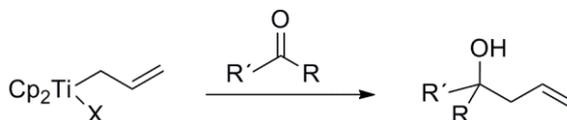
Por otro lado, los complejos de η^1 -alil-titanoceno(IV) se pueden preparar por transmetalación del grupo alilo desde una especie alil-organometálica, como

²¹ a) M. T. Reetz, R. Steinbach, J. Westerman, R. Peter, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, 92, 1044-1045; b) M. T. Reetz, *Top. Curr. Chem.* **1982**, 106, 1-54.

²² a) H. A. Martin, F. Jellinek, *J. Organomet. Chem.* **1967**, 8, 115-128; b) H. A. Martin, F. Jellinek, *J. Organomet. Chem.* **1968**, 12, 149-161.

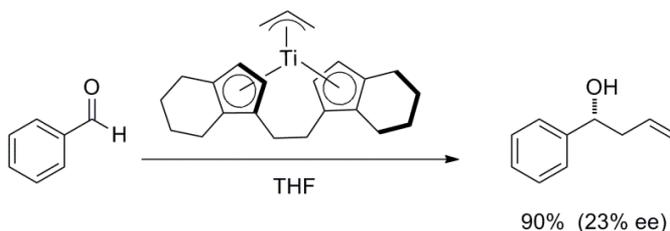
²³ a) F. Sato, S. Iijima, M. Sato, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 243-246; b) E. Klei, J. H. Teuben, H. J. De Liefde Meijer, *J. Organomet. Chem.* **1982**, 224, 327-339.

organolitios, magnesianos o derivados de zinc.²⁴ Estos complejos presentan un comportamiento similar frente a carbonilos, generando también los correspondientes alcoholes homoalílicos (Esquema 10).



Esquema 10

En 1989, el grupo de Collins desarrolló la versión asimétrica de esta reacción empleando complejos de η^3 -alil-titanoceno(III) con ligandos quirales, obteniendo mezclas enantioenriquecidas de alcoholes homoalílicos, aunque con bajos excesos enantioméricos (Esquema 11).²⁵



Esquema 11

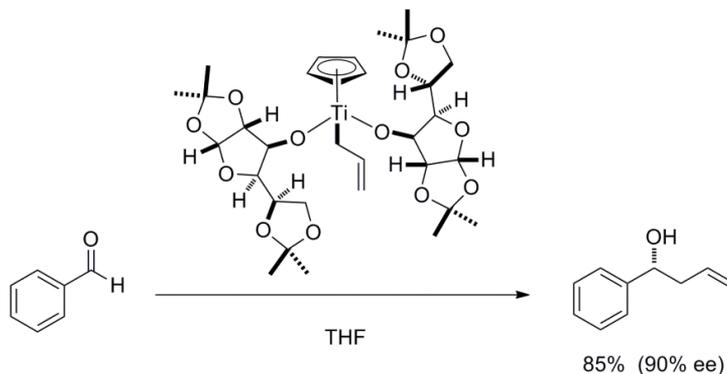
Hafner, Duthaler y col. mejoraron la enantioselectividad del proceso empleando complejos η^1 -alil-titanoceno(IV) con ligandos alcóxido quirales (Esquema

²⁴ a) F. Sato, H. Urabe, S. Okamoto, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2835-2886; b) T. Takeda, I. Miura, Y. Horikawa, T. Fujiwara, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1495-1498.

²⁵ S. Collins, B. A. Kuntz, Y. Hong, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4154-4158.

Bloque A. Introducción

12).^{10a,26} Una desventaja de estos protocolos es el empleo de cantidades estequiométricas de los complejos quirales de titanio, lo que limita su aplicación en síntesis.



Esquema 12

En nuestro grupo de investigación se desarrollaron nuevos procesos de alilación tipo Barbier de compuestos carbonílicos catalizados por complejos de Ti(III), empleando la mezcla 2,4,6-colidina y Me_3SiCl como regenerador de Cp_2TiCl_2 (Esquema 13). También se estudió, de forma preliminar, la versión enantioselectiva de esta transformación.⁹

²⁶ M. Riediker, R. O. Duthaler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 494-495.



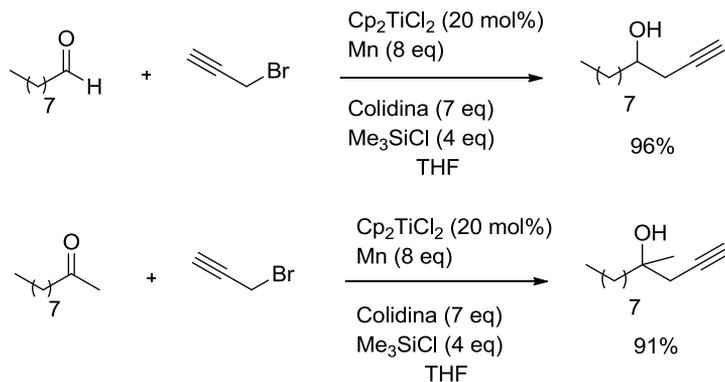
Esquema 13

▪ Reacciones de propargilación, crotilación y prenilación

Mediante una metodología similar a la desarrollada para las reacciones de alilación de grupos carbonilo, nuestro grupo de investigación demostró en 2009 que el complejo de Ti(III) también puede catalizar la reacción entre haluros propargílicos y compuestos carbonílicos. Se pueden emplear tanto aldehídos como cetonas como sustratos de partida. En todos los casos se obtuvo exclusivamente el alcohol homopropargílico, sin observar trazas de la formación de alcohol alenílico (Esquema 14).²⁷

²⁷ J. Justicia, I. Sancho-Sanz, E. Álvarez-Manzaneda, J. E. Oltra, J. M. Cuerva, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2295-2300.

Bloque A. Introducción



Esquema 14

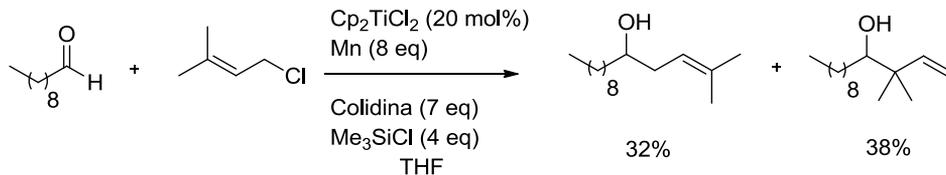
De la misma manera, este complejo también es capaz de catalizar la reacción entre haluros de crotilo y compuestos carbonílicos generando el correspondiente regioisómero γ y, con una alta diastereoselectividad hacia el estereoisómero *anti* (Esquema 15).²⁸



Esquema 15

Aunque las reacciones entre compuestos carbonílicos y haluros de prenilo promovidas por Cp_2TiCl se tratarán con detalle en el Capítulo II, cabe destacar que se obtiene como producto mayoritario el regioisómero γ (Esquema 16).⁹

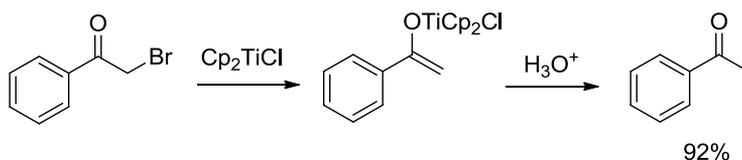
²⁸ I. Sancho-Sanz, D. Miguel, A. Millán, R. E. Estévez, J. L. Oller-López, E. Álvarez-Manzaneda, R. Robles, J. M. Cuerva, J. Justicia, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 732-735.



Esquema 16

▪ **Reacciones de adición tipo Reformatsky**

El complejo Cp_2TiCl también es capaz de promover la reducción de compuestos tipo α -halo-carbonilo¹⁸ (Esquema 17).

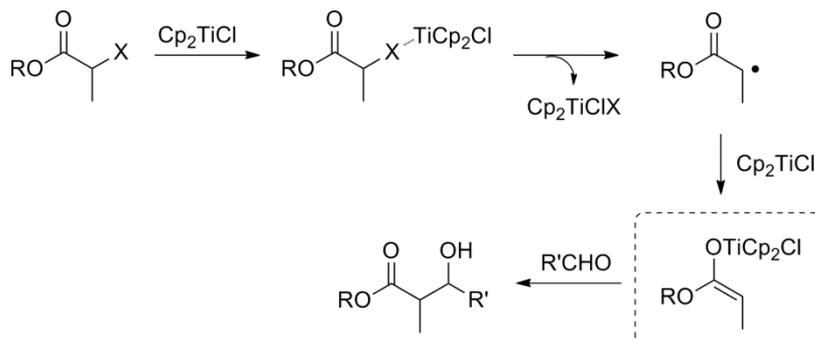


Esquema 17

En 2003, Little y col. propusieron que el enolato formado como intermedio podía ser atrapado por una especie electrófila presente en el medio. Así, desarrollaron un método de adición tipo Reformatsky de α -haloésteres sobre aldehídos alifáticos promovido por Ti(III) (Esquema 18).²⁹

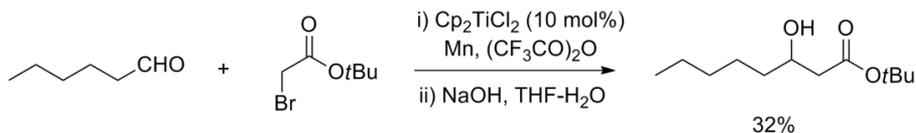
²⁹ J. D. Parrish, D. R. Shelton, R. D. Little, *Org. Lett.* **2003**, 5, 3615-3617.

Bloque A. Introducción



Esquema 18

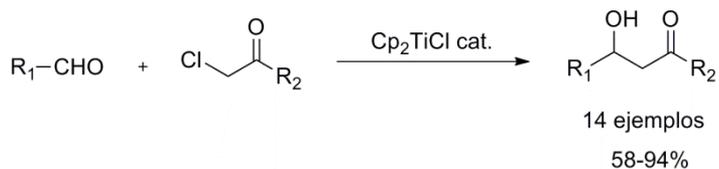
Más tarde, el grupo de Cozzi desarrolló una versión catalítica de este tipo de transformación (Esquema 19).³⁰ Sin embargo, ésta quedaba limitada al acoplamiento de α -haloésteres con aldehídos alifáticos o aromáticos, obteniéndose rendimientos bajos o moderados.



Esquema 19

³⁰ L. Sgreccia, M. Bandini, S. Morganti, A. Quintavalla, A. Umani-Ronchi, P. G. Cozzi, *J. Organomet. Chem.* **2007**, 692, 3191-3197.

Recientemente nuestro grupo de investigación ha extendido este método de acoplamiento tipo Reformatsky a α -halocetonas y aldehídos catalizado por titanoceno(III), generando de manera suave, en medio neutro y regioselectivamente los correspondientes aldoles con buenos rendimientos (Esquema 20).³¹



Esquema 20

³¹ R. E. Estévez, M. Paradas, A. Millán, T. Jiménez, R. Robles, J. M. Cuerva, J. E. Oltra, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1616-1619.

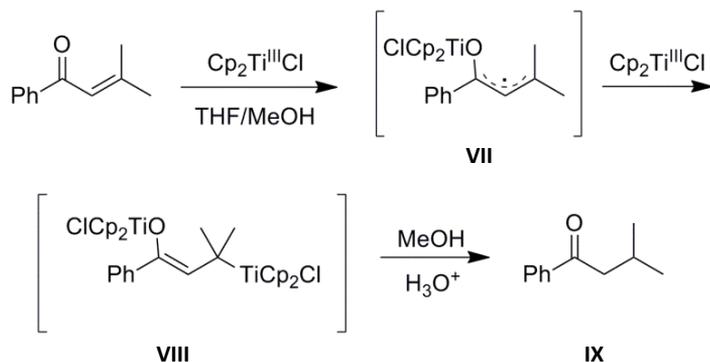
1.3. Reacciones de compuestos carbonílicos catalizadas por titanoceno(III)

El cloruro de bis(ciclopentadienil)titanio(III) es capaz de reaccionar con compuestos carbonílicos aromáticos o α,β -insaturados dando lugar a los correspondientes alcoholes, procedentes de procesos de reducción o productos derivados de acoplamiento tipo Michael, en presencia de los aceptores adecuados. Además, este complejo también promueve reacciones de acoplamiento pinacólico, que se comentarán en el Capítulo II.

▪ Reacciones de reducción

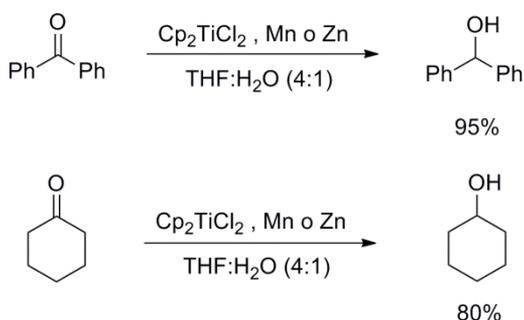
En 2002, el grupo de Doris describió la reducción selectiva de dobles enlaces de cetonas α,β -insaturadas mediadas por titanoceno(III).³² La transferencia monoeléctrica de esfera interna desde el Cp_2TiCl al grupo carbonilo genera un radical intermedio **VII** que, por reacción con un segundo equivalente de Cp_2TiCl , da lugar al enolato **VIII** de titanio(IV). Tras la protonación se obtiene el subsecuente producto de reducción **IX** (Esquema 21).

³² L. Moisan, C. Hardouin, B. Rousseau, E. Doris, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2013-2015.



Esquema 21

En este aspecto, también en nuestro laboratorio se han estudiado los procesos de reducción, utilizando tanto cetonas aromáticas como alifáticas cíclicas. El complejo de titanoceno(III) se empleó junto con mezclas THF:H₂O (Esquema 22) o incluso utilizando H₂O pura como disolvente.^{33,34} La versión catalítica de esta reacción se desarrolló en este mismo trabajo, empleando clorhidrato de 2,4,6-colidinio como agente regenerador.



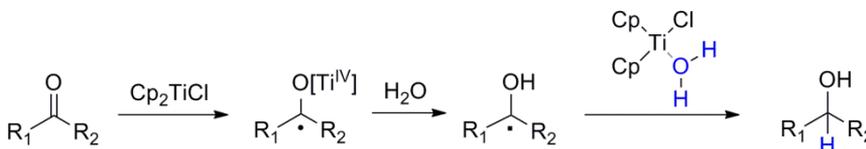
Esquema 22

³³ A. F. Barrero, A. Rosales, J. M. Cuerva, A. Gansäuer, J. E. Oltra, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1079-1082.

³⁴ J. L. Oller-López, A. G. Campaña, J. M. Cuerva, J. E. Oltra, *Synthesis* **2005**, 2619-2622.

Bloque A. Introducción

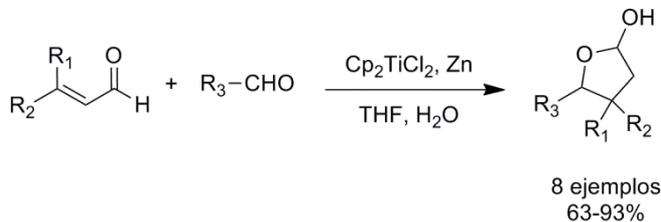
Estos procesos ocurren mediante un mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno desde el agua coordinada con Cp_2TiCl a los titanoxi- o hidroxirradicales (Esquema 23).³⁵



Esquema 23

▪ Reacciones de adición tipo Michael

En nuestro grupo de investigación se ha demostrado que el complejo Cp_2TiCl puede promover adiciones tipo Michael en presencia de agua (Esquema 24).³⁶

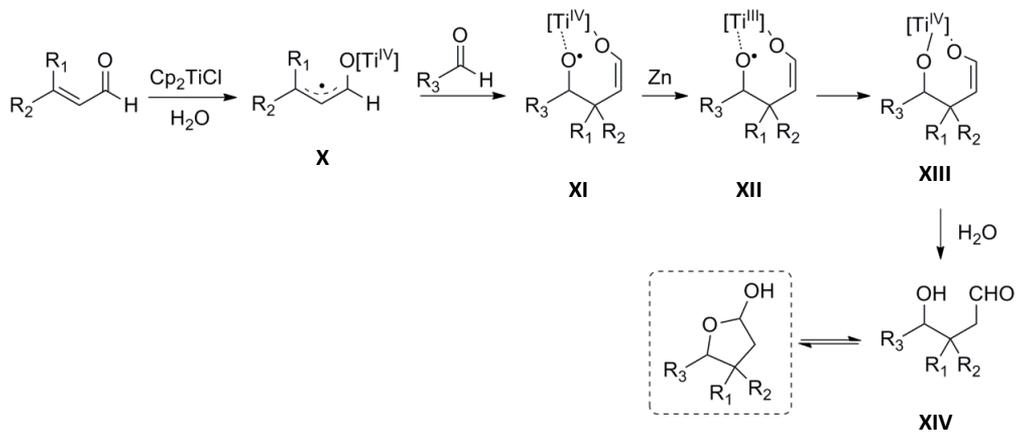


Esquema 24

³⁵ M. Paradas, A. G. Campaña, M. L. Marcos, J. Justicia, A. Haidour, R. Robles, D. J. Cárdenas, J. E. Oltra, J. M. Cuerva, *Dalton Trans.* **2010**, 39, 8796-8800.

³⁶ R. E. Estévez, J. L. Oller-López, R. Robles, C. R. Melgarejo, A. Gansäuer, J. M. Cuerva, J. E. Oltra, *Org. Lett.* **2006**, 8, 5433-5436.

El mecanismo propuesto comienza con una transferencia monoeléctrica de Cp_2TiCl al aldehído α,β -insaturado para dar el correspondiente aliltitanoxiradical **X** (Esquema 25). Este radical se adiciona sobre el aldehído alifático, formándose la especie **XI**. Posteriormente una segunda reducción de Ti(IV) a Ti(III) (intermedio **XII**) por el exceso de zinc, facilita la formación del intermedio **XIII**, que finalmente se hidroliza al compuesto **XIV** que está en equilibrio con el acetal cíclico correspondiente.

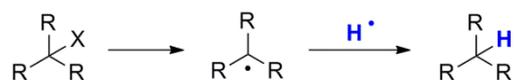


Esquema 25

1.4. Reducción de radicales carbonados con titanoceno(III) y agua

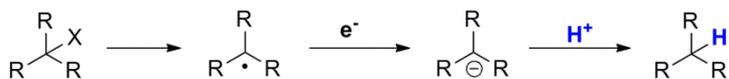
La reducción de radicales carbonados es un proceso esencial y muy extendido en química orgánica.¹ Estas reacciones pueden ocurrir mediante alguno de los siguientes mecanismos:

Mecanismo A: Por transferencia directa de un átomo de hidrógeno desde un dador de átomo de hidrógeno como el 1,4-ciclohexadieno o el Bu_3SnH .¹



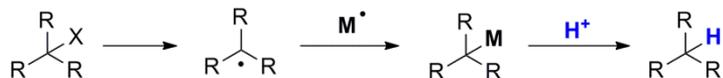
Esquema 26

Mecanismo B: Por reducción, mediante procesos de esfera externa, al correspondiente carbanión y posterior protonación.



Esquema 27

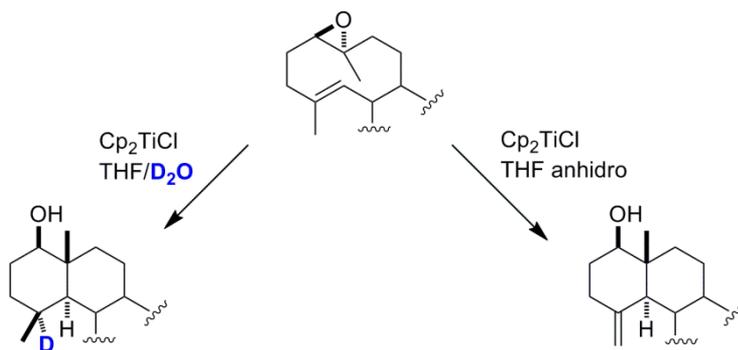
Mecanismo C: Mediante captura por especies metálicas de los radicales intermedios, generando los correspondientes enlaces C-M, y posterior protonólisis.



Esquema 28

Generalmente se ha creído que el agua es inerte frente a radicales libres y por tanto, solo actúa en la última etapa de los procesos tipo *B* y *C*. Esta inercia química frente a radicales se asocia a la alta energía de disociación del enlace H-OH (EDE= 117.59±0.07 kcal mol⁻¹), lo que impediría la transferencia directa de un átomo de hidrógeno del agua.^{37,38}

Sin embargo, en trabajos desarrollados por nuestro grupo de investigación entre 2001 y 2006, se tuvieron evidencias de que el agua, en determinadas condiciones, puede actuar como donador de átomo de hidrógeno. Se observó que la simple adición o no de agua al medio de reacción controlaba la etapa final en reacciones de ciclación (Esquema 29). En el caso de ciclaciones radicalarias en cascada dieron lugar a los productos reducidos o a los alquenos exocíclicos correspondientes (Esquema 30).^{39,40}



Esquema 29

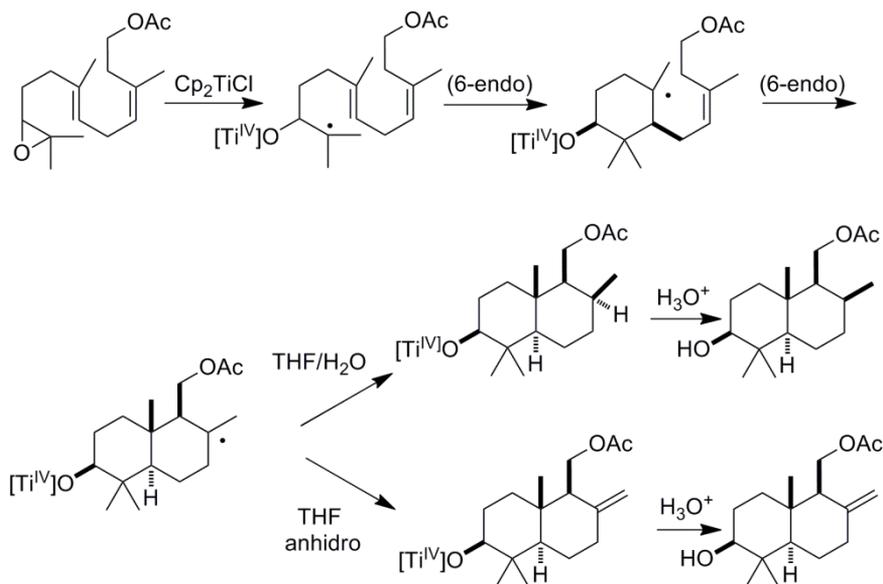
³⁷ *Stereochemistry of Radicals Reactions*, Eds.: D. P. Curran, N. A. Porter, B. Giese, VCH, Weinheim, **1996**.

³⁸ B. Ruscic, A. F. Wagner, L. B. Harding, R. L. Asher, D. Feller, D. A. Dixon, K. A. Peterson, Y. Song, X. Qian, C.-Y. Ng, J. Liu, W. Chen, D. W. Schwenke, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 2727-2747.

³⁹ A. F. Barrero, J. E. Oltra, J. M. Cuerva, A. Rosales, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2566-2571.

⁴⁰ a) A. F. Barrero, J. M. Cuerva, M. M. Herrador, M. Valdivia, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4074-4078; b) J. Justicia, A. Rosales, E. Buñuel, J. L. Oller-López, M. Valdivia, A. Haïdour, J. E. Oltra, A. F. Barrero, D. J. Cárdenas, J. M. Cuerva, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1778-1788.

Bloque A. Introducción

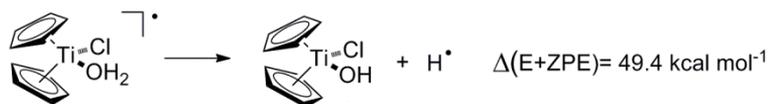


Esquema 30

Posteriormente se demostró que el agua se coordina al complejo bis(ciclopentadienil)titanio(III) y, así, es capaz de transferir un átomo de hidrógeno a radicales carbonados primarios, secundarios y terciarios.⁴¹

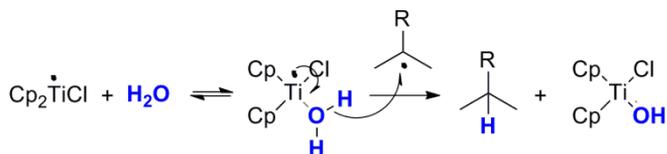
Los cálculos teóricos demostraron que la energía de disociación del enlace O-H del agua (EDE) se ve afectada por la coordinación al titanoceno(III). Así, esta energía calculada para el enlace O-H pasa de 108.1 kcal mol⁻¹ para el agua libre a 49.4 kcal mol⁻¹ para el acuocomplejo formado (Esquema 31).

⁴¹ J. M. Cuerva, A. G. Campaña, J. Justicia, A. Rosales, J. L. Oller-López, R. Robles, D. J. Cárdenas, E. Buñuel, J. E. Oltra, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5522-5526.



Esquema 31

Con estas evidencias se propuso que el agua se coordina al titanoceno(III) formando un acuocomplejo. Éste actúa como donador de átomo de hidrógeno mediante un proceso de transferencia monoeléctronica de esfera interna al átomo de oxígeno coordinado, como se observa en el Esquema 32.



Esquema 32

Cabe pensar que, al igual que el agua es capaz de unirse al titanoceno(III) y transferir un átomo de hidrógeno, otras moléculas tipo aminas o alcoholes también pudieran dar este proceso. Así, en 2010, se estudió la reactividad de H₂O, MeOH, PhOH, NH₃, MeNH₂ y Me₂NH como donadores de átomo de hidrógeno en presencia de titanoceno(III). Se demostró que entre todos los compuestos estudiados el agua es el mejor donador de átomo de hidrógeno.⁴²

Recientemente, se han llevado a cabo nuevos estudios para tratar de elucidar la estructura del acuocomplejo de titanio(III) propuesto, empleando

⁴² M. Paradas, A. G. Campaña, T. Jiménez, R. Robles, J. E. Oltra, E. Buñuel, J. Justicia, D. J. Cárdenas, J. M. Cuerva, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12748-12756.

Bloque A. Introducción

técnicas como espectroscopía de resonancia electrónica paramagnética (EPR), voltametría cíclica (VC) y cálculos teóricos.⁴³

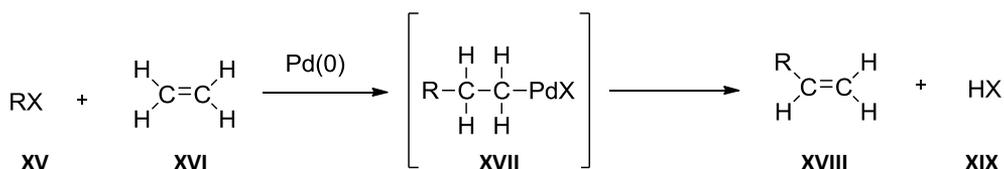
Con todos estos antecedentes queda demostrado que, en presencia de Cp_2TiCl , el agua es capaz de transferir átomos de hidrógeno a diferentes especies radicalarias.

⁴³ A. Gansäuer, M Behlendorf, A. Cangönül, C. Kube, J. M. Cuerva, J. Friedrich, M. v. Gastel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3266-3270.

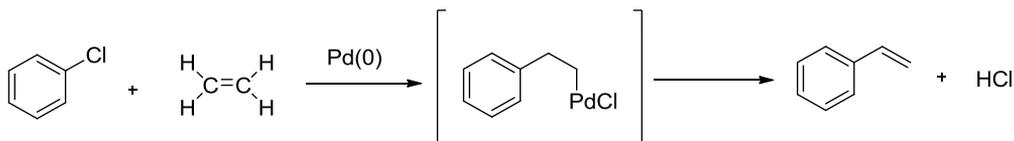
2. COMPLEJOS ALIL-METAL EN SÍNTESIS ORGÁNICA

Las reacciones catalizadas por metales de transición han desempeñado un papel muy importante en Química desde mediados del siglo XX, permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias sintéticas. Dentro de este campo cabe destacar las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio, en las que un primer enlace carbono-metal permite la posterior formación de un nuevo enlace simple carbono-carbono, difícil de conseguir mediante otras rutas sintéticas.

En 1972, Richard F. Heck demostró que a partir de un haluro orgánico **XV** (arilo, vinilo o alquilo) y empleando paladio(0) como catalizador, se conseguía la formación del intermedio **XVII** y de un nuevo enlace C-C **XVIII** (Esquema 33). Esta técnica fue aplicada a la síntesis del estireno.⁴⁴



Esquema 33

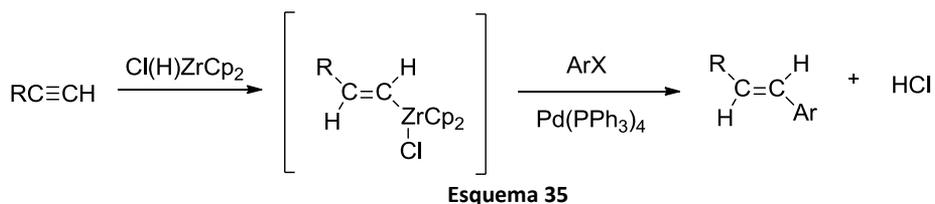


Esquema 34

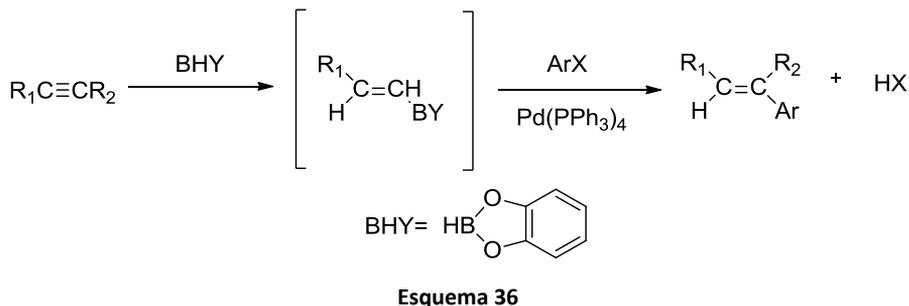
⁴⁴ R. F. Heck, J. P. Nolley, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2320.

Bloque A. Introducción

Negishi, en 1977, empleó compuestos organometálicos de zirconio como par nucleofílico para reacciones de acoplamiento cruzado, en condiciones suaves de reacción, obteniendo mejores rendimientos comparados con otros compuestos organometálicos. Además, presenta una amplia compatibilidad con distintos grupo funcionales (Esquema 35).⁴⁵



Dos años más, tarde Suzuki extendió esta metodología a compuestos organoborados (Esquema 36)⁴⁶.



La gran estabilidad y la naturaleza nucleofílica débil de los compuestos organoborados proporciona una gran versatilidad a este proceso. Entre las ventajas que presenta cabe destacar que tolera una amplia variedad de grupos funcionales,

⁴⁵ E. Negishi, A. O. King, N. Okukado, *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 1821.

⁴⁶ a) N. Miyaura, K. Yamada, A. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3437; b) N. Miyaura, A. Suzuki, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 866-867.

es altamente quimioselectivo, puede ser llevado a cabo en condiciones suaves y en medio acuoso con el uso de microondas. Además, los compuestos de boro son generalmente poco tóxicos, lo cual le ha brindado una gran popularidad en la industria farmacéutica.

La importancia de estos trabajos quedó demostrada cuando el Premio Nobel de Química en 2010 fué otorgado a Richard F. Heck, Ei-ichi Negishi y Akira Suzuki por sus aportaciones en este campo.

2.1. Complejos η^3 -alil-paladio

En 1965, Smith describió el complejo dímero $[\text{PdCl}_2(\text{C}_3\text{H}_5)]_2$. Su ligando η^3 -alilo tiene distancias de enlace C-C similares (1.357 Å y 1.395 Å) y un ángulo de enlace C-C-C de 119.8°. La estructura que forman los átomos de Pd y Cl es cercana a plano cuadrada y es perpendicular al plano de los grupos alilo, formando un ángulo de 111.5°. Los sustituyentes del grupo alilo se denominan *anti* y *syn* respecto al sustituyente en C2 (Figura 4).⁴⁷

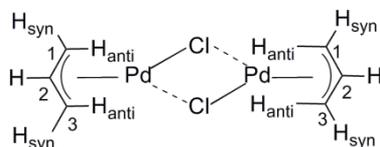


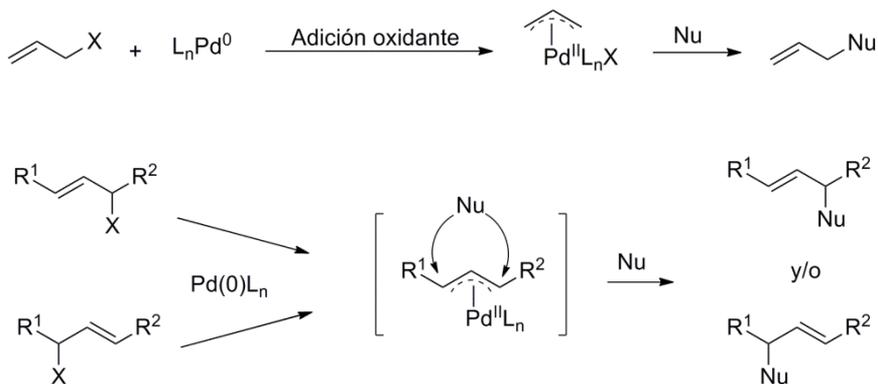
Figura 4

Uno de los métodos más generales de síntesis de complejos alil-paladio consiste en la adición oxidante de un sustrato alílico (haluros, ésteres, éteres, carbonatos...) sobre un complejo de paladio(0). Estos complejos presentan un carácter electrófilo, por lo que Tsuji y col. observaron que en presencia de ligandos fuertemente coordinantes eran atacados por nucleófilos. Esta reacción es regioselectiva, produciéndose normalmente el ataque en la posición menos sustituida del intermedio η^3 -alil-paladio, y simultáneamente es altamente estereoselectiva, observándose de forma habitual una retención total de la configuración (Esquema 37).^{48,49}

⁴⁷ A. E. Smith, *Acta Cryst.* **1965**, *18*, 331-340.

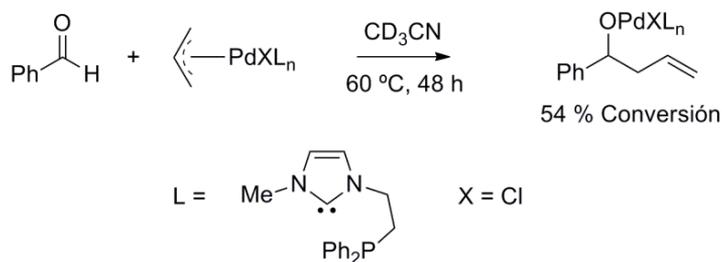
⁴⁸ T. Hayashi, T. Hagihara, M. Konishi, M. Kumada, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7767-7768.

⁴⁹ J. Tsuji, H. Takahashi, M. Morikawa, *Tetrahedron Lett.* **1965**, *49*, 4387-4388.



Esquema 37

También se ha descrito que la presencia de ciertos ligandos en la esfera de coordinación del complejo η^3 -alil-paladio pueden hacer cambiar su reactividad. Por ejemplo, la presencia de carbenos N-heterocíclicos hace que disminuya la electrofilia de los complejos y, así, se comporten como especies nucleófilas, pudiendo llevar a cabo reacciones de alilación (Esquema 38).⁵⁰



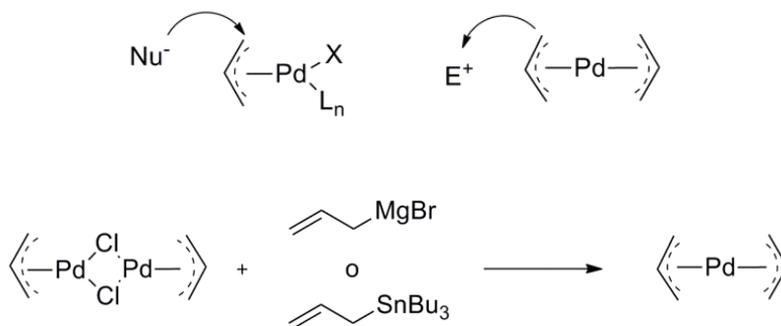
Esquema 38

En 1996, el grupo del Prof. Yamamoto demostró que los complejos de bis(η^3 -alil)paladio también presentan dicho carácter nucleófilo. Estos complejos se

⁵⁰ N. T. Barezak, R. E. Grote, E. R. Jarvo, *Organometallics* **2007**, 26, 4863-4865.

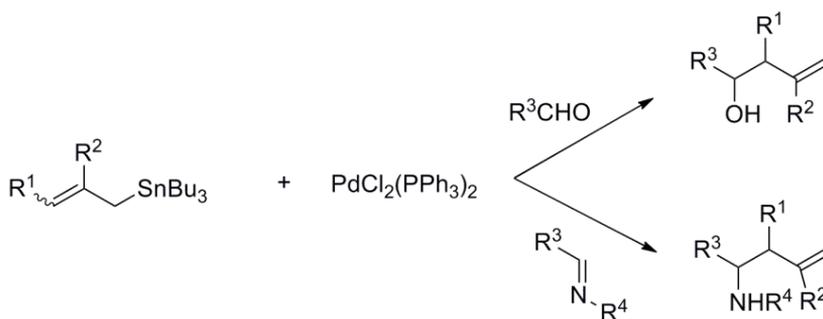
Bloque A. Introducción

obtienen mediante la reacción de complejos mono-alil-paladio (o sus correspondientes especies dimeras), con especies alil-metal, como reactivos de Grignard o alil-estannanos (Esquema 39).^{51,52}



Esquema 39

En presencia de compuestos electrófilos carbonados, como aldehídos o iminas aromáticas, dan lugar a la formación de enlaces C-C originando los correspondientes alcoholes o aminas homoalílicas (Esquema 40).^{53,52}



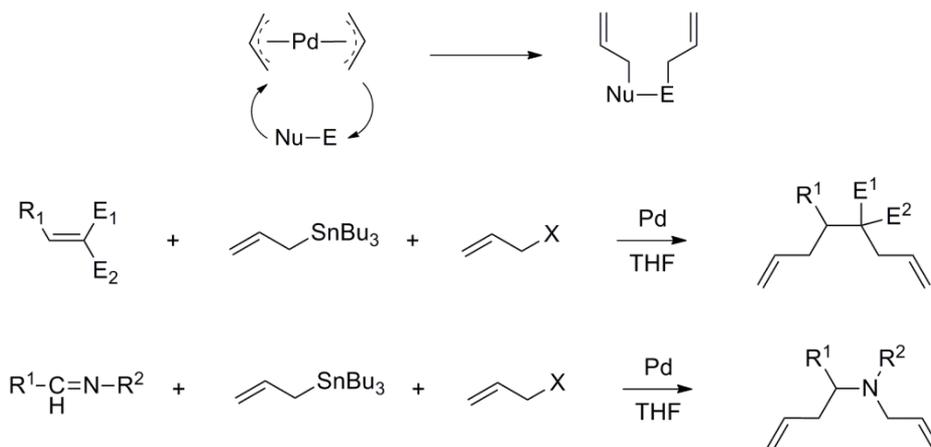
Esquema 40

⁵¹ H. Nakamura, K. Aoyagi, J.-G. Shim, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 372-377.

⁵² H. Nakamura, H. Iwama, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6641-6647.

⁵³ H. Nakamura, N. Asao, Y. Yamamoto, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1273-1274.

Debido a la doble reactividad de los dos grupos alilo del complejo bis(η^3 -alil)paladio, puede darse el ataque nucleófilo de uno de los alilos a una especie o resto electrófilo, seguido de un ataque nucleófilo sobre el otro grupo alilo como se muestra en el Esquema 41. Así, empleando sustratos que poseen carbonos nucleófilos y electrófilos se pueden obtener los correspondientes compuestos doblemente aliados.^{51,54}



Esquema 41

Igualmente ocurre en la versión intramolecular de la reacción, en la que las dos unidades η^3 -alilo del complejo bis(η^3 -alil)paladio están unidas por una cadena carbonada (Figura 5), permitiendo la obtención de productos cíclicos (Esquema 42).⁵¹

⁵⁴ H. Nakamura, J.-G. Shim, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8113-8114.

Bloque A. Introducción

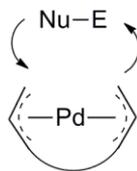
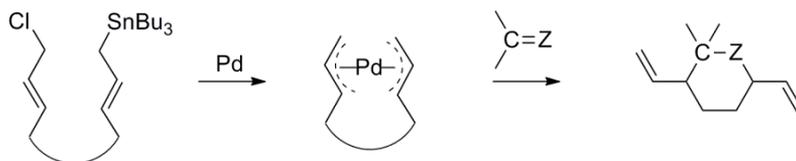


Figura 5

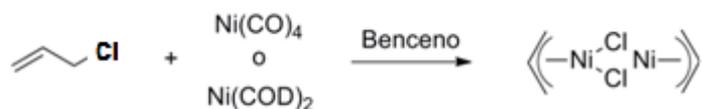


Esquema 42

2.2. Complejos η^3 -alil-níquel

El empleo de complejos de níquel se ha visto incrementado en las últimas décadas coincidiendo con el desarrollo de las reacciones de acoplamiento cruzado. Una de las razones es su precio, sumamente económico.

Los haluros de η^3 -alil-níquel se generan por reacción de haluros alílicos con complejos de níquel(0), como $\text{Ni}(\text{CO})_4$ o $\text{Ni}(\text{COD})_2$, en disolventes no polares como benceno (Esquema 43).⁵⁵ Los complejos obtenidos son sólidos cristalinos de color rojo oscuro a marrón y bastante sensibles al aire en disolución. Esta reacción tolera una gran variedad de sustituyentes en el alilo, permitiendo la preparación de complejos con distinta funcionalización.



Esquema 43

A pesar de su semejanza con los complejos de η^3 -alil-paladio, su comportamiento químico es distinto debido a que presentan carácter nucleófilo. De esta manera, en 1967, Corey y Semmelhack describieron la alilación de haluros orgánicos utilizando alilos de níquel. Tras sintetizar los correspondientes complejos de alil-níquel, los hicieron reaccionar con yoduros y bromuros alquílicos, vinílicos y arílicos en disolventes polares (Esquema 44).⁵⁶

⁵⁵ *Principles and Applications of Organotransition Metal Chemistry*, Eds.: J. P. Collman, L. S. Hegeudus, J. R. Norton, R. G. Finke, University Science Books, California, **1987**.

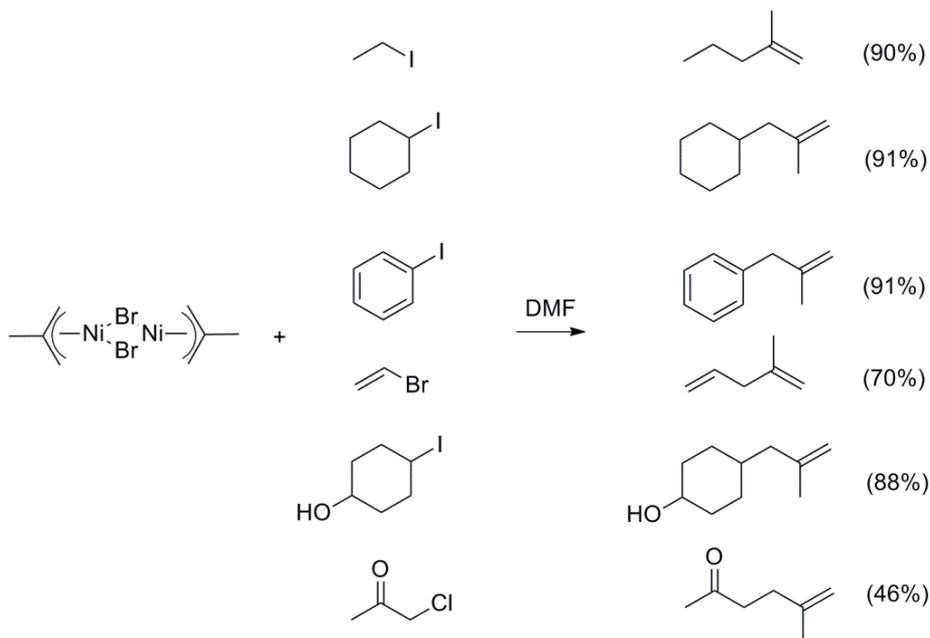
⁵⁶ E. J. Corey, M. F. Semmelhack, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2755-2757.

Bloque A. Introducción



Esquema 44

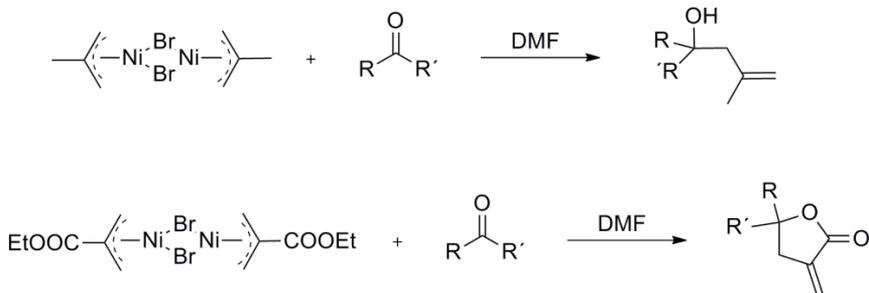
Si se utilizan complejos de alil-níquel no simétricos se observa una alta selectividad hacia el acoplamiento en la posición menos sustituida (Esquema 45).¹⁷



Esquema 45

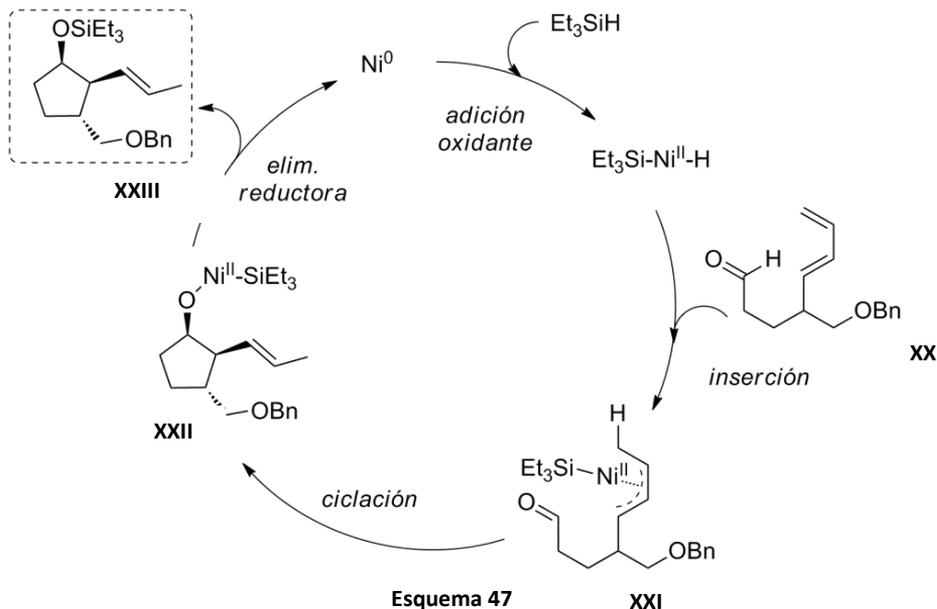
En 1985, Hegedus y col. profundizaron en el estudio del mecanismo de esta reacción, demostrando que ocurría a través de especies de Ni(I). Llevó a cabo la alilación de compuestos carbonílicos y lograron la síntesis de distintas α -metilén- γ -butirolactonas, de gran interés debido a su actividad como agentes antitumorales (Esquema 46).^{57,58}

⁵⁷ L. S. Hegedus, D. H. P. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5663-5669.



Esquema 46

En 1994, Mori y col. desarrollaron una reacción intramolecular y estereoselectiva de cetonas y 1,3-dienos a través de un intermedio de alil-níquel (Esquema 47).⁵⁹



Esquema 47

⁵⁸ L. S. Hegedus, S. D. Wagner, E. L. Waterman, K. Siirala-Hansen, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 593-598.

⁵⁹ Y. Sato, M. Takimoto, K. Hayashi, T. Katsuhara, K. Takagi, M. Mori, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9771-9772.

Bloque A. Introducción

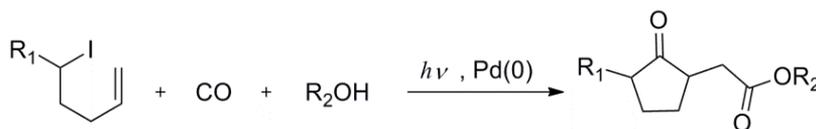
En primer lugar ocurre la adición oxidante de Et_3SiH sobre $\text{Ni}(0)$, seguida de la inserción de **XX** y formación del alilo de níquel **XXI**. Con el ataque nucleófilo al grupo carbonilo se produce la ciclación generando **XXII** seguida de la eliminación reductora, obteniéndose el producto **XXIII** y recuperándose el $\text{Ni}(0)$. Esta metodología permite el uso de níquel en cantidades subestequiométricas, debido a la regeneración del hidruro de níquel mediante Et_3SiH , cerrándose así el ciclo catalítico.

Los complejos de alil-níquel son más selectivos que los correspondientes complejos de litio, magnesio o zinc, aunque son considerablemente menos reactivos. Este hecho unido a su inestabilidad ha limitado su empleo como herramienta en Química Orgánica.

3. COMBINACIÓN DE QUÍMICA DE RADICALES LIBRES CON CATÁLISIS DE METALES DE TRANSICIÓN

Con objeto de desarrollar metodologías sintéticas eficientes, en los últimos años se han diseñado nuevas estrategias que combinan las ventajas de la catálisis mediada por metales de transición y la química de radicales libres.

En 2002, el grupo del Prof. Ryu presentó una reacción en cascada, a partir de haluros homoalílicos, catalizada por paladio y luz, dando lugar a distintas ciclopentanonas como se muestra en el Esquema 48.⁶⁰ Este proceso no podría llevarse a cabo sin la combinación de química radicalaria y metales de transición, ya que los haluros alifáticos son, habitualmente, inertes frente a complejos de Pd.⁶¹



Esquema 48

Estas estrategias también han servido para mejorar reacciones simples en disolventes polares. En este sentido, Oshima y col. propusieron que el CoCl_2 en combinación con un organomagnesiano ($\text{TMSCH}_2\text{MgCl}$) promueve la deshidrohalogenación de haluros alquílicos para originar mayoritariamente el alqueno terminal en condiciones de reacción suaves (Esquema 49).⁶² Por el

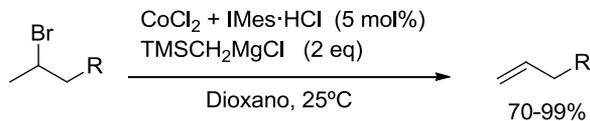
⁶⁰ I. Ryu, S. Kreimerman, F. Araki, S. Nishitani, Y. Oderaotoshi, S. Minakata, M. Komatsu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3812-3813.

⁶¹ R. G. Pearson, P. E. Figdore, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1541-1547.

⁶² T. Kobayashi, H. Ohmiya, H. Yorimitsu, K. J. Oshima, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11276-11277.

Bloque A. Introducción

contrario, la correspondiente eliminación iónica origina mezclas de regioisómeros y estereoisómeros.

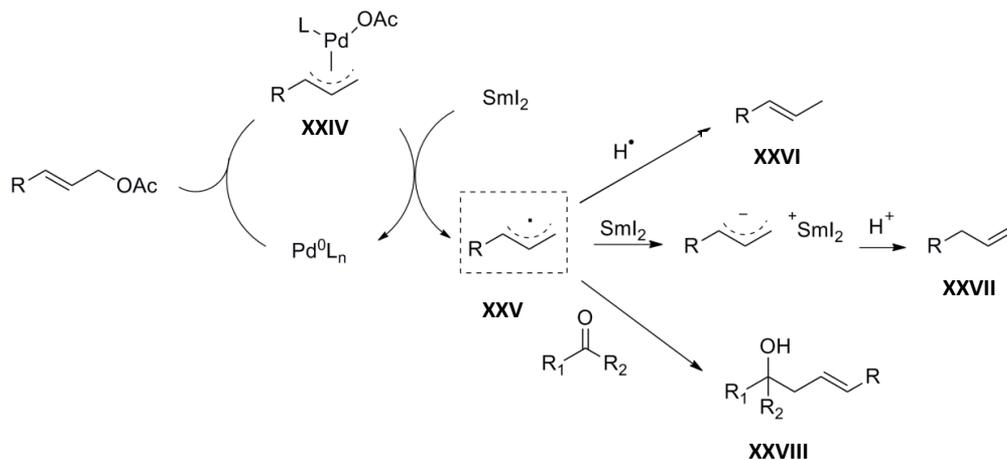


Esquema 49

También se han empleado agentes de transferencia monoeléctrica, como SmI_2 o Cp_2TiCl_2 , junto con metales de transición. En 1986, Inanaga y col. introdujeron el uso del sistema $\text{Pd}(0)\text{-SmI}_2$ en la reducción de acetatos alílicos. Como se muestra en el Esquema 50, el complejo de paladio activa al acetato alílico formándose un complejo η^3 -alil-paladio **XXIV**. El SmI_2 actúa, a continuación, como agente de transferencia monoeléctrico formando el correspondiente radical alílico **XXV**. Este último puede ser reducido (**XXVI** y **XXVII**) o bien puede adicionarse, por ejemplo, sobre grupos carbonilo **XXVIII**.^{63,64}

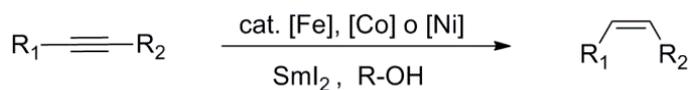
⁶³ T. Tabuchi, J. Inanaga, M. Yamaguchi, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 601-602.

⁶⁴ T. Tabuchi, J. Inanaga, M. Yamaguchi, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 1195-1196.



Esquema 50

En 1991, este mismo grupo llevó a cabo la reducción selectiva de alquinos a alquenos *cis* empleando un alcohol como donador de hidrógeno (Esquema 51). Esta reacción es mediada por SmI_2 combinado con catalizadores de metales de transición como Fe, Co y Ni. La formación de los correspondientes hidruros metálicos es clave en esta reacción.⁶⁵

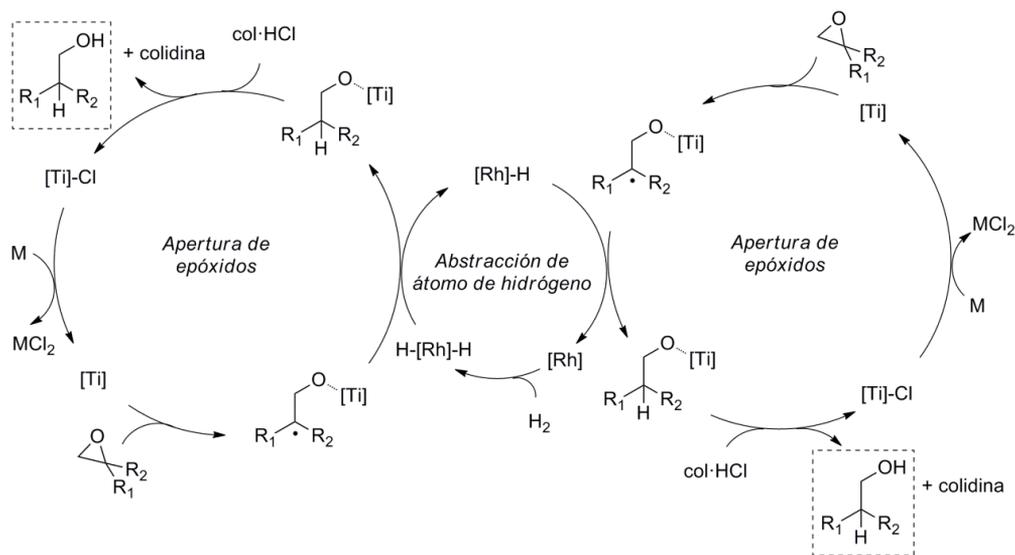


Esquema 51

⁶⁵ J. Inanaga, Y. Yokoyama, Y. Baba, M. Yamaguchi, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 5559-5562.

Bloque A. Introducción

En 2008, Gansäuer y col. desarrollaron un método de apertura reductora de epóxidos cuyo mecanismo propuesto consiste en una combinación de dos ciclos catalíticos (Esquema 52).⁶⁶



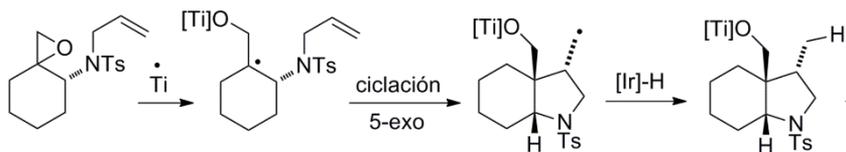
Esquema 52

El sistema consiste en el empleo de Cp_2TiCl_2 como agente de transferencia monoeléctronica para mediar la apertura radicalaria del epóxido, junto con un hidruro de rodio, para promover la transferencia de hidrógeno.

En 2011, este mismo grupo extendió la metodología a ciclaciones radicalarias, con un mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) a través de la especie $[\text{Ir}]-\text{H}$, formada tras la adición oxidante de H_2 sobre el catalizador $(\text{IrCl}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2)$, como se muestra en el Esquema 53.⁶⁷

⁶⁶ A. Gansäuer, C.-A. Fan, F. J. Piester, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6916-6917.

⁶⁷ A. Gansäuer, M. Otte, L. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 416-417.



Esquema 53

En definitiva, la combinación de química radicalaria con metales de transición permite llevar a cabo diferentes reacciones con altos rendimientos y en condiciones de reacción suaves, aprovechando de esta manera las ventajas que ofrecen ambas químicas.

Bloque A. Introducción

BLOQUE A

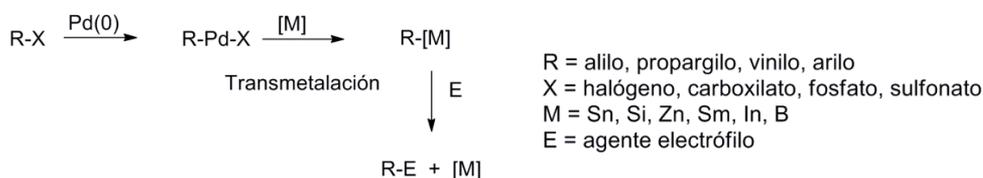
**CAPÍTULO I. REACCIONES DE ALILACIÓN DE
COMPUESTOS CARBONÍLICOS CATALIZADAS POR
EL SISTEMA MULTIMETÁLICO [Ti]/[Ni]**

BLOQUE A
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1. REACCIONES DE ALILACIÓN DE COMPUESTOS CARBÓNÍCOS MEDIADAS POR COMPLEJOS DE PALADIO

A pesar de su potencial en procesos de alilación, los haluros alílicos son relativamente lábiles a la hidrólisis y presentan gran tendencia a la eliminación, lo que limita su uso en síntesis de moléculas complejas. Una posible alternativa consiste en el empleo de carbonatos o carboxilatos alílicos, debido a su estabilidad y su fácil preparación. Además, son buenos sustratos de partida en reacciones mediadas por complejos de metales de transición en bajos estados de oxidación, transcurriendo con alto grado de regio- y estereoselectividad.

La transformación de intermedios electrófilos de paladio en compuestos nucleófilos para su uso en este tipo de reacciones se debe a la capacidad de los compuestos organopaladio para originar transmetalación con otros compuestos organometálicos (Esquema 54). Éstos pueden ser aislados o bien pueden reaccionar con especies electrófilas presentes en el medio, dando lugar a la formación de enlaces C-C.⁶⁸



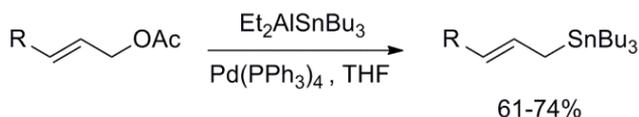
Esquema 54

A continuación se explican algunos de estos procesos de transmetalación, en función del metal empleado para tal fin.

⁶⁸ J. A. Marshall, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3163-3185.

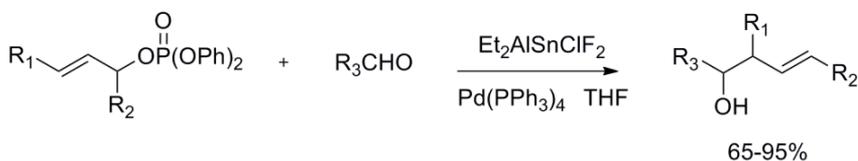
▪ **Estaño**

En 1984, Trost y Herndon describieron la transformación de acetatos alílicos en alil-estannanos a través del ataque nucleófilo de $\text{Et}_2\text{AlSnBu}_3$ al intermedio η^3 -alil-paladio. En el caso de acetatos alílicos asimétricos, la sustitución ocurre en el extremo menos impedido del sistema alílico (Esquema 55).⁶⁹



Esquema 55

Posteriormente, el grupo de Oshima demostró que los estannanos alílicos generados a partir de fosfatos reaccionaban con aldehídos originando los correspondientes alcoholes homoalílicos aunque con bajas diastereoselectividades *sin:anti* (entre 1:1 y 3:1) mediante la reacción que se muestra en el Esquema 56.⁷⁰



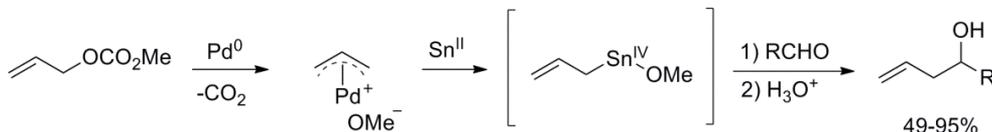
Esquema 56

Masuyama y col. llevaron a cabo distintos estudios empleando SnCl_2 , asumiendo una adición oxidante (de Sn(II) a Sn(IV)) al intermedio organopaladio. En estos trabajos se observó que los carbonatos alílicos son más reactivos que los

⁶⁹ B. M. Trost, J. W. Herndon, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6835-6837.

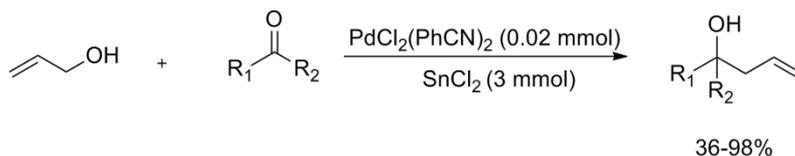
⁷⁰ S. Matsubara, K. Wakamatsu, Y. Morizawa, N. Tsuboniwa, K. Oshima, H. Noyaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58*, 1196-1199.

correspondientes acetatos y que son capaces de reaccionar *in situ* con aldehídos presentes en el medio (Esquema 57).^{71,72}



Esquema 57

Este mismo grupo también estudió el empleo directo de alcoholes alílicos como precursores de alil-estannanos para la alilación de diferentes aldehídos, siendo su eficacia más limitada al emplear cetonas como electrófilos (Esquema 58).⁷³



Esquema 58

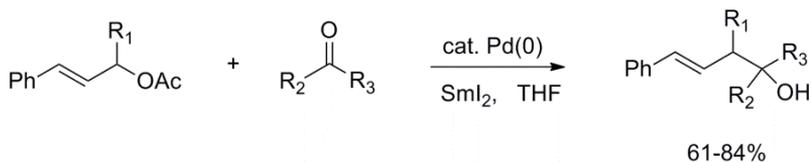
▪ Samario

Los intermedios organosamarrio(III) pueden adicionarse sobre grupos carbonilo, dando lugar a los productos de alilación correspondientes (Esquema 59).⁷²

⁷¹ Y. Masuyama, K. Otake, Y. Kuru, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 3563-3565.

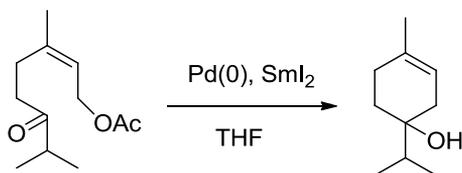
⁷² Y. Masuyama, R. Hayashi, K. Otake, Y. Kuru, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 44-45.

⁷³ a) Y. Masuyama, J. P. Takahara, Y. Kuru, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4473-4474; b) J. P. Takahara, Y. Masuyama, Y. Kuru, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 2577-2586.



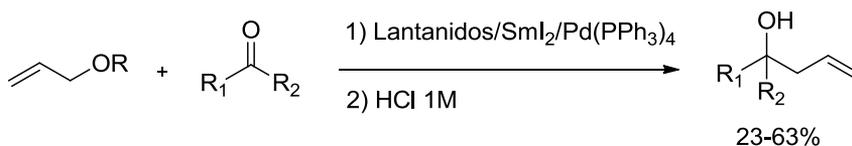
Esquema 59

La versión intramolecular de este proceso permitió la obtención de alcoholes cíclicos de manera sencilla. Así, se consiguió la síntesis de 4-terpinenol a partir de acetato de nerilo en un único paso y con buen rendimiento (Esquema 60).⁷²



Esquema 60

En 2005, Namy y col. modificaron este proceso utilizando cantidades subestequiométricas de Sm(II) y una mezcla de lantánidos como correductor. Con este sistema multimetalico (SmI_2/Pd)_{cat.} se logró la alilación de cetonas con distintos ésteres alílicos como pronucleófilos, aunque con bajos rendimientos (Esquema 61).⁷⁴

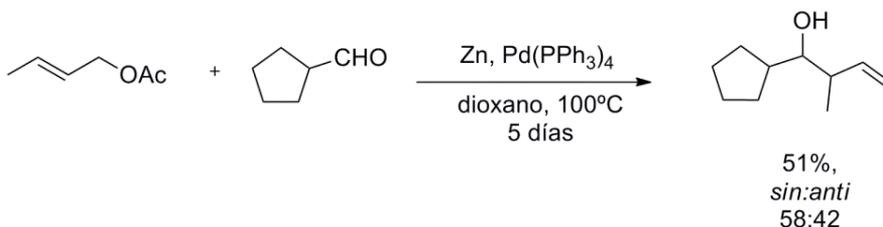


Esquema 61

⁷⁴ S. Médégan, F. Héllion, J.-L. Namy, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4715-4722.

- **Zinc**

Masuyama y col. describieron la transmetalación oxidativa de intermedios de organopaladio con Zn metálico. Para ello, emplearon acetatos alílicos como pronucleófilos y aldehídos como electrófilos, originando los correspondientes alcoholes homoalílicos. Esta reacción es muy lenta y se obtienen rendimientos muy bajos. La causa podría ser que probablemente la adición oxidante de Zn metálico sobre el intermedio de paladio ocurre solo en la superficie del metal (Esquema 62).⁷⁵

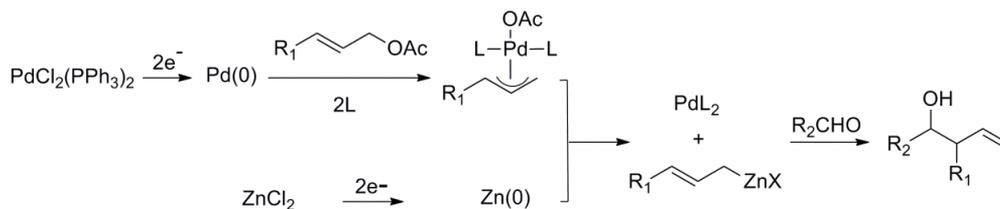


Esquema 62

Posteriormente, Qui y Wang desarrollaron una reacción análoga a la anterior, pero generando Zn(0) por reducción electroquímica de ZnCl₂. Se demostró que debido al potencial aplicado se reducían tanto ZnCl₂ como el complejo precursor de Pd(II), como se observa en el Esquema 63.⁷⁶

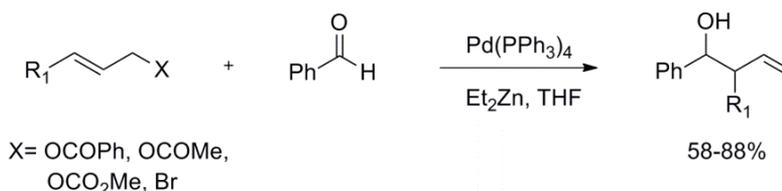
⁷⁵ Y. Masuyama, N. Kinagawa, Y. Kurusu, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 3702-3704.

⁷⁶ W. Qui, Z. Wang, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 356-357.



Esquema 63

Tamaru y col. emplearon Et_2Zn como fuente de Zn, consiguiendo la alilación *in situ* de benzaldehído a partir de benzoatos alílicos, suponiendo un gran avance de este tipo de metodología (Esquema 64). Posteriormente se demostró que esta reacción también tiene lugar cuando se emplean acetatos, carbonatos o bromuros alílicos.^{77,78}



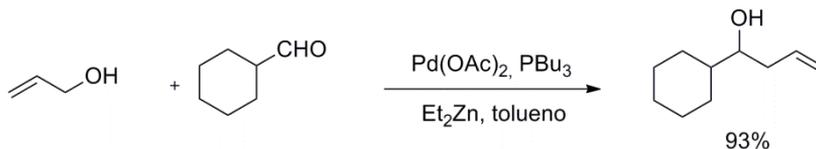
Esquema 64

En 2005, este mismo grupo llevó a cabo la alilación de aldehídos alifáticos empleando directamente alcoholes alílicos como pronucleófilos (Esquema 65).⁷⁹

⁷⁷ M. Shimizu, M. Kimura, S. Tanaka, Y. Tamaru, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 39, 609-612.

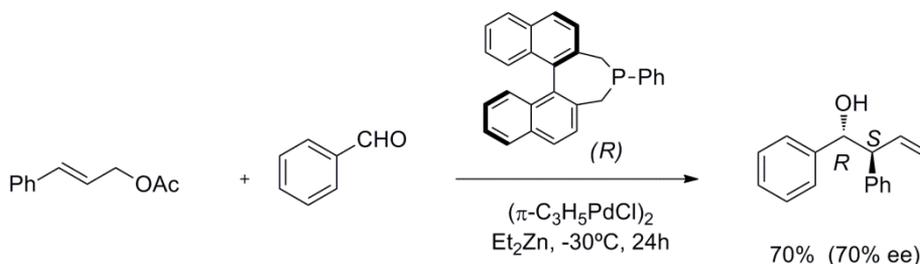
⁷⁸ K. Yasui, Y. Goto, T. Yajima, Y. Taniseki, K. Fugami, A. Tanaka, Y. Tamaru, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7619-7622.

⁷⁹ a) M. Kimura, M. Shimizu, K. Shibata, M. Tazoe, Y. Tamaru, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3392-3395; b) Y. Tamaru, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2647-2656.



Esquema 65

Recientemente, Zanoni y col. han descrito la alilación enantioselectiva de benzaldehído con ésteres alílicos empleando un compuesto fosforado quiral como ligando del complejo de Pd. Sin embargo, los excesos enantioméricos fueron moderados (Esquema 66).⁸⁰



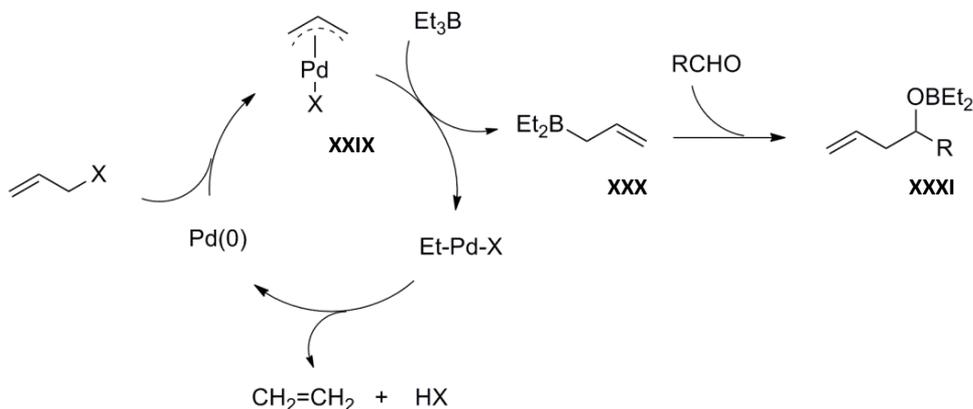
Esquema 66

▪ Boro

El grupo de Tamaru también estudió la reacción entre intermedios η^3 -alil-paladio y Et_3B . Observaron que empleando cantidades catalíticas de un complejo de $\text{Pd}(0)$, el Et_3B promueve la alilación de aldehídos con sustratos alílicos de distinta naturaleza, excepto con haluros. Según el mecanismo de reacción (Esquema 67), la etapa clave es un intercambio de ligando alilo-alquilo entre el intermedio η^3 -alil-paladio y el Et_3B . De esta manera, se genera el alil-borano **XXX** nucleófilo que ataca

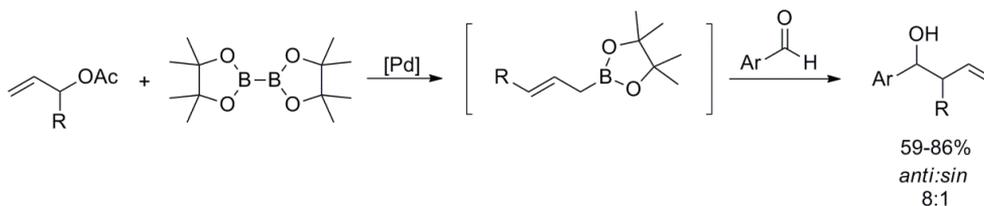
⁸⁰ G. Zanoni, S. Gladiali, A. Marchetti, P. Piccinini, I. Tredici, G. Vidari, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 846-849.

al aldehído presente en el medio. El intermedio **XXIX** formado evoluciona a través de una β -eliminación de hidrógeno, recuperándose así el catalizador de Pd(0).⁸¹



Esquema 67

En 2003, Szabó y col. desarrollaron una nueva metodología empleando bis(pinacolato)diboro y cantidades catalíticas de Pd(0) para llevar a cabo la reacción de alilación de aldehídos e iminas aromáticas con acetatos alílicos. De esta manera se obtuvieron los correspondientes alcoholes homoalílicos con buenos rendimientos y altas estereoselectividades (Esquema 68).⁸²

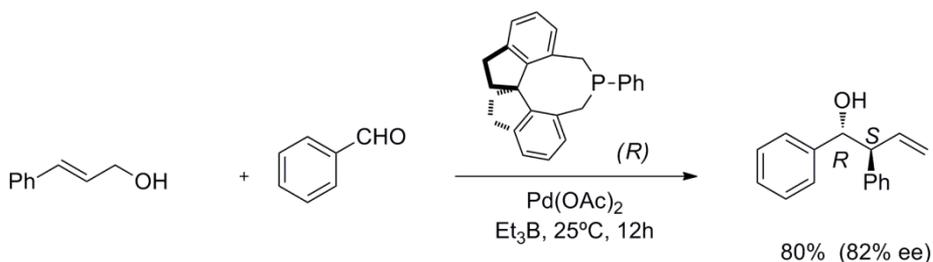


Esquema 68

⁸¹ M. Kimura, I. Kiyama, T. Tomizawa, Y. Horino, S. Tanaka, Y. Tamaru, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6795-6798.

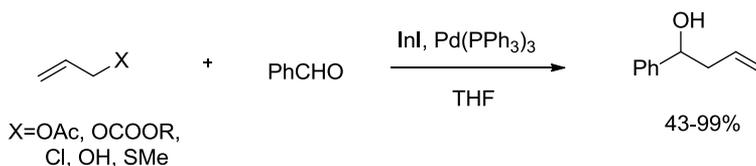
⁸² S. Sebelius, O. A. Wallner, K. J. Szabó, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3065-3068.

La versión asimétrica de esta reacción fue descrita por Zhou y col. Demostraron que empleando una fosfina quiral como ligando y alcoholes alílicos como sustratos de partida, la alilación solo ocurre sobre aldehídos aromáticos (Esquema 69). De esta manera se obtuvieron mejores resultados que en la alilación enantioselectiva que empleaba Et_2Zn .⁸³



▪ Indio

También es posible cambiar la reactividad de los complejos η^3 -alil-paladio empleando sales de indio(I), mediante procesos de transmetalación similares a los explicados anteriormente para otros metales (Esquema 70).⁸⁴



⁸³ S.-F. Zhu, Y. Yang, L.-X. Wang, B. Liu, Q.-L. Zhou, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2333-2335.

⁸⁴ S. Araki, T. Kamei, H. Hirashita, H. Yamamura, M. Kawai, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 847-849.

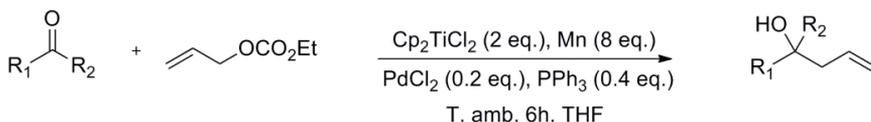
▪ **Titanio**

En nuestro grupo de investigación se estudió recientemente la combinación de la química radicalaria del titanio(III) con paladio. En este caso es clave la formación del intermedio η^3 -alil-paladio y su reducción al correspondiente radical alilo con Cp_2TiCl . El acoplamiento con una segunda especie de titanio(III) genera un η^1 -alil-titanio(IV), fuertemente nucleófilo, que reacciona con compuestos carbonílicos originando alcoholes homoalílicos (Esquema 71).⁸⁵



Esquema 71

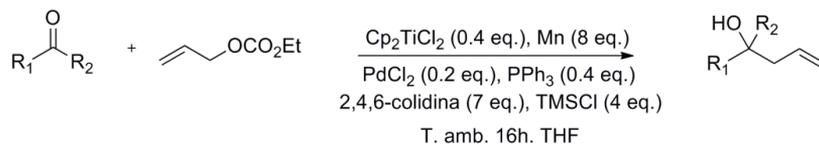
Esta metodología se optimizó empleando etilcarbonato de alilo como agente alilante, PdCl_2 como complejo de paladio y PPh_3 como ligando (Esquema 72). Además, introduciendo la mezcla TMSCl y 2,4,6-colidina (para la regeneración de la especie Cp_2TiCl_2) se consiguió la versión catalítica del proceso (Esquema 73).⁸⁶



Esquema 72

⁸⁵ A. G. Campaña, B. Bazdi, N. Fuentes, R. Robles, J. M. Cuerva, J. E. Oltra, S. Porcel, A. M. Echavarren, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7515-7519.

⁸⁶ A. Millán, A. G. Campaña, B. Bazdi, D. Miguel, L. Álvarez de Cienfuegos, A. Echavarren, J. M. Cuerva, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3985-3994.

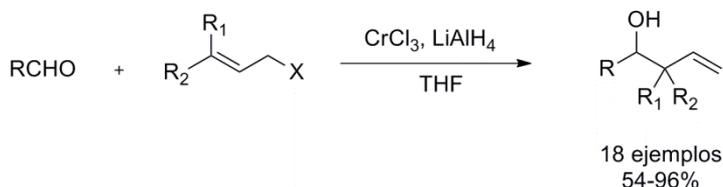


Esquema 73

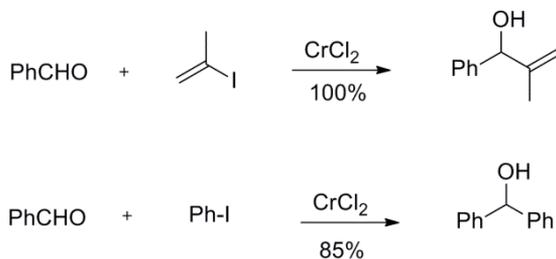
Los resultados obtenidos mostraron que este método se puede aplicar a distintos tipos de aldehídos y cetonas, obteniéndose los correspondientes productos de alilación con rendimientos de moderados a buenos. Además, estos rendimientos fueron mejores cuando se emplearon como electrófilos cetonas, a pesar de su menor reactividad.

2. REACCIONES DE ALILACIÓN DE COMPUESTOS CARBÓNICOS MEDIADAS POR COMPLEJOS DE NÍQUEL

En 1977, Nozaki y col. presentaron la alilación quimioselectiva de aldehídos con distintos haluros alílicos mediados por sales de cromo(II), generadas a partir de sales de cromo(III) por reducción con LiAlH_4 (Esquema 74). Unos años más tarde, la reacción se extendió a haluros arílicos y alquenílicos empleando CrCl_2 anhidro (Esquema 75).^{87,88}



Esquema 74



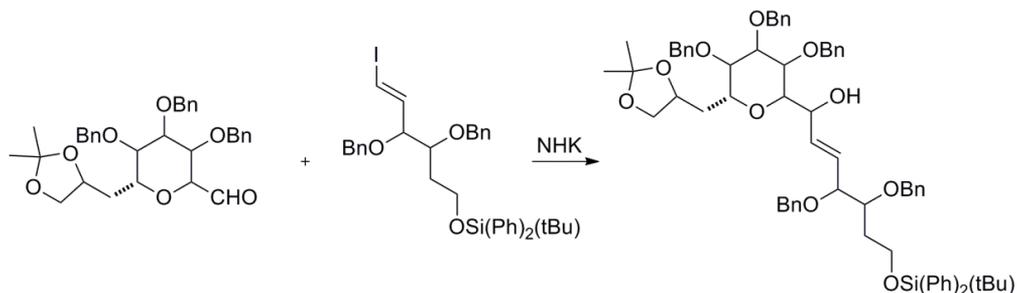
Esquema 75

En 1986, Kishi y col. emplearon esta metodología en una de las etapas de la síntesis del producto natural marino *Palytoxina* (reacción denominada NHK, Esquema 76), observando que el éxito de la reacción dependía de la fuente de CrCl_2

⁸⁷ Y. Okude, S. Hirano, T. Hiyama, H. Nozaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3179-3181.

⁸⁸ K. Takai, K. Kimura, T. Kuroda, T. Hiyama, H. Nozaki, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5281-5284.

empleada, atribuyendo esto a la presencia de alguna impureza, probablemente un segundo catalizador metálico.



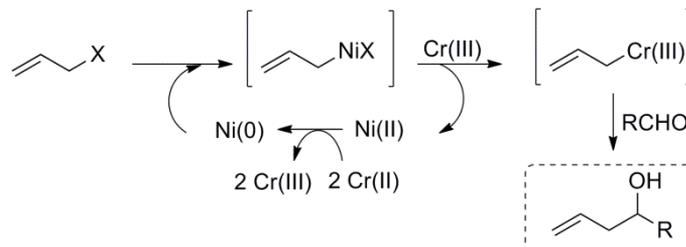
Esquema 76

Tras analizar el efecto de distintos metales de transición llegaron a la conclusión de que esta dependencia se debía a la presencia de trazas de NiCl_2 como impureza. Paralelamente, el grupo de Nozaki también descubrió este efecto en el estudio de la reacción de triflatos vinílicos con CrCl_2 ^{89,90}

Basados en esos descubrimientos, ambos grupos propusieron un posible mecanismo para la activación de haluros de alqueno y aplicable a haluros alílicos (Esquema 77). En primer lugar, el Ni(II) es reducido a la especie activa de Ni(0) por sales de Cr(II) . A continuación, ocurre la adición oxidante del Ni(0) sobre el enlace C-X seguida de la transmetalación, dando lugar a un intermedio de cromo(III). Tras la adición nucleófila del organocromo al aldehído, se obtiene el alcohol homoalílico correspondiente.

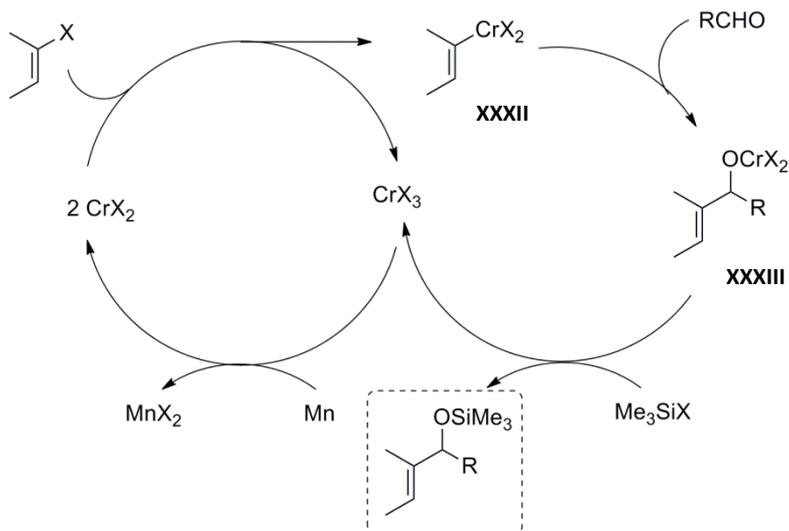
⁸⁹ H. Jin, J. Uenishi, W. J. Christ, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5644-5646.

⁹⁰ K. Takai, M. Tagashira, T. Kuroda, K. Oshima, K. Utimoto, H. Nozaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6048-6050.



Esquema 77

Para solventar el inconveniente del empleo de cantidades estequiométricas de reactivos de cromo, Fürstner y col. desarrollaron la versión catalítica de esta reacción. Este protocolo es válido para haluros alílicos, vinílicos, arílicos y propargílicos, empleándose TMSCl y Mn como regeneradores de Cr(II) (Esquema 78).⁹¹

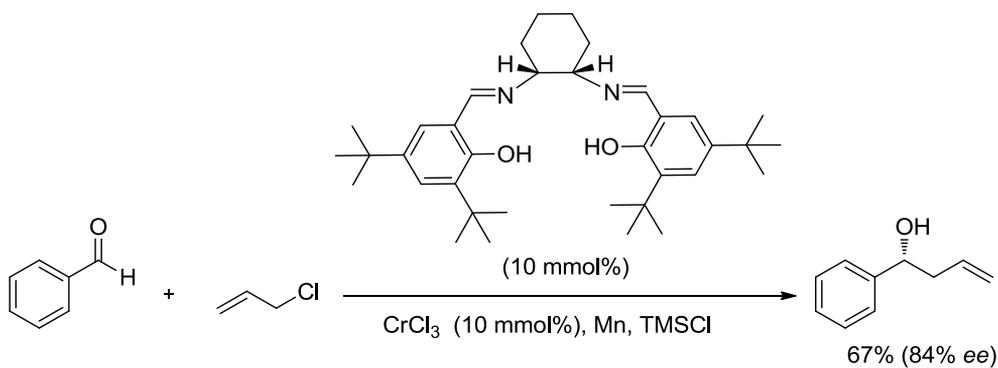


Esquema 78

⁹¹ a) A. Fürstner, N. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2533-2534; b) A. Fürstner, N. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12349-12357.

El haluro orgánico reacciona con dos equivalentes de CrCl_2 para formar el reactivo organocrómico **XXXII** y un equivalente de CrCl_3 . A continuación, el nucleófilo **XXXII** se adiciona sobre el aldehído para formar el alcóxido de cromo(III) **XXXIII**, que al reaccionar con el reactivo oxofílico Me_3SiX forma el correspondiente trimetilsililéter, liberándose Cr(III) , que es reducido por el Mn(0) a Cr(II) , completándose así el ciclo catalítico.

El desarrollo de la versión catalítica de la reacción permitió el posterior estudio de la versión asimétrica de forma más eficiente. Así, Cozzi y colaboradores publicaron el primer ejemplo de la reacción catalítica y enantioselectiva empleando para ello un ligando quiral tipo salen para el cromo (Esquema 79).⁹²



Esquema 79

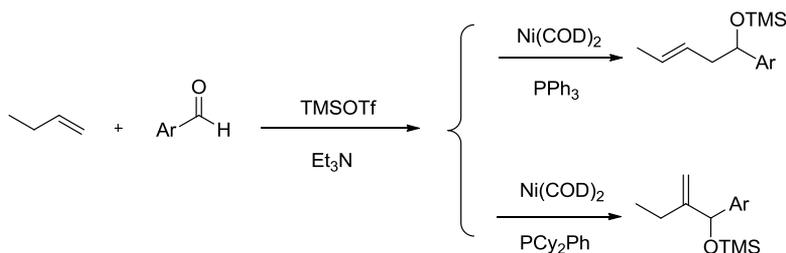
A partir de ahí se han presentado multitud de protocolos en los que se ha desarrollado la versión asimétrica de la reacción de Nozaki-Hiyama-Kishi (NHK) empleando distintos ligandos tanto para cromo como para níquel.⁹³

En los últimos años el grupo de Jamison ha llevado a cabo estudios sobre acoplamientos intermoleculares de aldehídos y alquenos catalizados por níquel en

⁹² M. Bandini, P. G. Cozzi, P. Melchiorre, A. Umani-Ronchi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3357-3359.

⁹³ G. C. Hargaden, P. J. Guiry, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 2407-2424.

presencia de ácidos de Lewis y una base. Estas reacciones dan lugar a derivados silylados de los alcoholes alílicos u homoalílicos de forma selectiva en función de la fosfina empleada. De esta manera, fosfinas de carácter aceptor y poco voluminosas como PPh_3 favorecen la formación del alcohol homoalílico, mientras que fosfinas de carácter dador y voluminosas como PCy_2Ph favorecen la formación del alcohol alílico (Esquema 80).⁹⁴

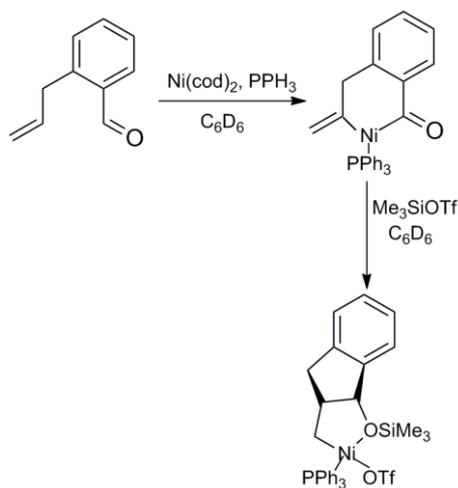


Esquema 80

Por otro lado, Ogoshi y col. han demostrado que la presencia de ácidos de Lewis en el medio de reacción puede promover ciclaciones que impliquen enlaces $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}=\text{C}$ coordinados a Ni. En dicho trabajo se presenta por primera vez la ciclación oxidante de complejos de níquel η^2 -carbonilo: η^2 -olefina para dar lugar a un metalaciclo de cinco miembros, observándose una aceleración del proceso cuando se produce la adición electrófila de Me_3SiOTf . Este metalaciclo sólo se forma al añadir un equivalente de ligando, lo que indicaría la necesidad de coordinación simultánea $\text{C}=\text{O}$ y al $\text{C}=\text{C}$ para la formación del mismo (Esquema 81).⁹⁵

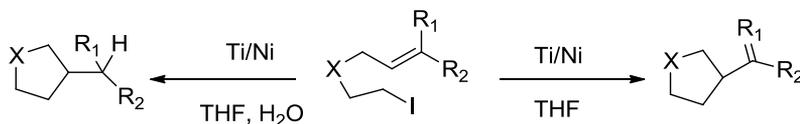
⁹⁴ a) S. S. Ng, T. F. Jamison, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14194-14195; b) C. Y. Ho, S. S. Ng, T. F. Jamison, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5362-5363; c) C. Y. Ho, S. S. Ng, T. F. Jamison, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11513-11528.

⁹⁵ S. Ogoshi, H. Kamada, H. Kurosawa, *Tetrahedron. Lett.* **2006**, *62*, 7583-7588.



Esquema 81

Recientemente, nuestro grupo de investigación estudió los procesos mediados por el sistema multimetalico Ti/Ni/Mn conducentes a reacciones tipo Heck y ciclaciones reductivas de yoduros de alquilo. El protocolo a seguir es el mismo en ambos casos, en presencia y ausencia de agua respectivamente (Esquema 82).⁹⁶



Esquema 82

En general, la principal desventaja de estos procesos es la no reactividad de cetonas y la necesidad de emplear como pronucleófilos compuestos activados (haluros o triflatos). El desarrollo de nuevas metodologías partiendo de sustratos

⁹⁶ A. Millán, L. Álvarez de Cienfuegos, D. Miguel, A. G. Campaña, J. M. Cuerva *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5984-5987.

Bloque A. Capítulo I

más estables y accesibles, como carbonatos o carboxilatos, podrían solventar estas limitaciones.

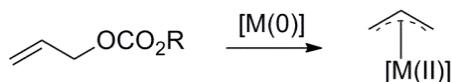
BLOQUE A
CAPÍTULO I. OBJETIVOS

Los complejos de titanoceno(III) han demostrado ser excelentes herramientas de síntesis participando en diversos procesos de formación de enlaces C-C mediante reacciones radicalarias.⁹⁷ Sin embargo, una de las limitaciones de estos procesos es que la generación de radicales queda restringida a sustratos de partida activados. Esto significa que, en principio, no se podría extender esta metodología a sustratos más estables como carboxilatos alílicos, pues los complejos de titanio(III) son incapaces de promover la ruptura homolítica del enlace C-O necesaria para formar la especie nucleófila de alil-titanio(IV) (Esquema 83).



Esquema 83

Por otra parte, los carboxilatos alílicos sí son reactivos frente a complejos de metales de transición en bajo estado de oxidación, dando los correspondientes η^3 -alil-metales (Esquema 84).



Esquema 84

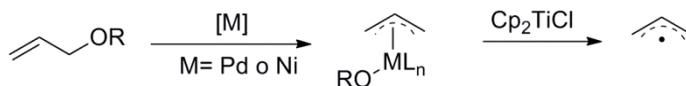
Para solventar estas limitaciones y con objeto de ampliar el alcance y versatilidad de la química radicalaria del titanio(III), en nuestro grupo de investigación se pensó en combinar en un único proceso la química de radicales

⁹⁷ a) A. Gansäuer, B. Rinker, *Titanium and Zirconium in Organic Synthesis*, Ed.: I. Marek, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**; b) J. M. Cuerva, J. Justicia, J. L. Oller-López, B. Bazdi, J. E. Oltra, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2006**, *3*, 23-35; c) J. M. Cuerva, J. Justicia, J. L. Oller-López, J. E. Oltra, *Top. Curr. Chem.* **2006**, *264*, 63-91.

Bloque A. Capítulo I

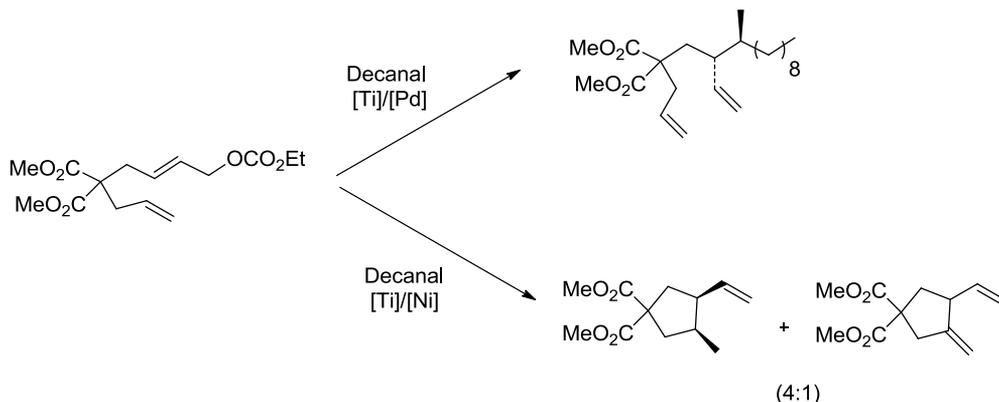
libres con la química de los metales de transición. Efectivamente, se pudo comprobar que los sistemas multimetálicos [Ti]/[Pd] y [Ti]/[Ni] eran totalmente compatibles, permitiendo así la utilización de sustratos poco activados.

En este tipo de procesos, en primer lugar ocurre la adición oxidante de los metales de transición a los sustratos alílicos originando los correspondiente η^3 -alilmetales. A continuación, se produce una transferencia monoeléctronica por parte del Cp_2TiCl formándose el correspondiente radical alilo, que puede ser utilizado en diferentes transformaciones químicas (Esquema 85).



Esquema 85

Así, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el empleo de complejos de metales de transición como Pd o Ni puede modular la reactividad de complejos de titanio(III). Sin embargo, el mecanismo de reacción parece ser distinto: en el caso de emplear complejos de paladio tiene lugar un acoplamiento intermolecular con reactivos electrófilos y en el caso de los complejos de níquel se produce la alilación intramolecular, generándose los correspondientes derivados carbocíclicos, incluso en presencia de un electrófilo como el decanal (Esquema 86).⁸⁵



Esquema 86

El hecho de que el mecanismo de la reacción catalizada por níquel sea completamente diferente resulta muy interesante de cara a la obtención de distintos productos a partir de un mismo sustrato de partida. Además, aunque a priori la capacidad catalítica de paladio es superior a la de níquel, la diferencia económica entre estos dos metales hace conveniente un estudio sobre el alcance de la química del níquel.

Como se ha comentado en los antecedentes, se han descrito numerosas alilaciones catalizadas por paladio como metal de transición, pero existen pocos trabajos en los que el níquel se emplee para promover este tipo de procesos. Por otro lado, el desarrollo de nuevas fosfinas ha hecho que se obtengan resultados muy interesantes en reacciones de formación de enlaces C-C, acoplamiento cruzado y activación del enlace C-H.

Bloque A. Capítulo I

Por lo tanto, los objetivos fijados en este estudio fueron los siguientes:

- Extender los procesos radicalarios mediados por titanoceno(III) a sustratos de partida accesibles, estables y de fácil manipulación.
- Estudiar la reacción de alilación de compuestos carbonílicos empleando el sistema multimetálico Ti/Ni/Mn.
- Estudiar el comportamiento de distintas fosfinas en dichos procesos de alilación intermolecular.
- Extender el método a reacciones intramoleculares.

BLOQUE A
CAPÍTULO I. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar las similitudes y diferencias con respecto al proceso catalizado por el sistema [Ti]/[Pd], decidimos estudiar la reacción de alilación de compuestos carbonílicos catalizada por la combinación de titanoceno(III) y un complejo de níquel, empleando carboxilatos alílicos con distinta sustitución. Estudios previos habían demostrado que este proceso tenía lugar en condiciones estequiométricas, por lo que se comenzó el estudio de la versión catalítica del mismo.^{85,86}

Con el fin de optimizar las condiciones de reacción, se eligieron el decanal (**1**) y la 2-decanona (**2**) como aldehído y cetona modelo. Asimismo, se escogió el etilcarbonato de alilo (**3**) como pronucleófilo por su simplicidad y estabilidad. Para estos ensayos se emplearon cantidades subestequiométricas tanto del complejo de níquel, como del Cp_2TiCl_2 y por tanto, se necesitó la presencia de un regenerador de la especie de titanoceno(III): la mezcla empleada anteriormente de TMSCl , 2,4,6-colidina y Mn.

Como punto de partida se decidió emplear la sal de níquel NiCl_2 como catalizador en estos procesos de alilación, en presencia de diversos ligandos fosforados de distinta naturaleza electrónica y estérica.⁹⁸

Para el caso del decanal (**1**) (Tabla 1), los mejores resultados se obtuvieron al emplear como ligando PPh_3 (entrada 4) y $\text{P}(\text{OEt})_3$ (entrada 5). Por el contrario, al emplear $\text{P}(\text{OPh})_3$ (entrada 6) sólo se obtuvieron trazas del producto alilado **4** y cuando se empleó PCy_2Ph o $\text{P}(\text{C}_6\text{F}_5)_3$ (entradas 2 y 7) la reacción no tuvo lugar.

⁹⁸ W. A. Tolman, *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 313-348.

Tabla 1

Cp_2TiCl_2 (0.4 eq), $\text{NiCl}_2/\text{Ligando}$ (0.1 eq)
 $2,4,6\text{-colidina}$ (7 eq), TMSCl (4 eq), Mn (8 eq)
 T. amb. 16 h. THF

Entrada	Ligando	Rendimiento (%)
1	PCy_3	18
2	PCy_2Ph	-
3	$\text{P}(o\text{-tol})_3$	49
4	PPh_3	65
5	$\text{P}(\text{OEt})_3$	70
6	$\text{P}(\text{OPh})_3$	5
7	$\text{P}(\text{C}_6\text{F}_5)_3$	-

Sin embargo, cuando se partió de la 2-decanona (**2**) (Tabla 2), sólo se obtuvo buen rendimiento al utilizar como ligando PPh_3 (entrada 3). A diferencia de los resultados obtenidos para el decanal (**1**) (Tabla 1), la alilación de la 2-decanona (**2**) sólo es posible en presencia de ligandos tipo fosfina. Cuando se emplean fosfitos, la reacción no tiene lugar.

Tabla 2

Reaction scheme: $\text{2} + \text{3} \xrightarrow[\text{T. amb. 16 h. THF}]{\text{Cp}_2\text{TiCl}_2 (0.4 \text{ eq}), \text{NiCl}_2/\text{Ligando} (0.1 \text{ eq}), 2,4,6\text{-colidina} (7 \text{ eq}), \text{TMSCl} (4 \text{ eq}), \text{Mn} (8 \text{ eq})} \text{5}$

Entrada	Ligando	Rendimiento (%)
1	PCy ₃	23
2	PCy ₂ Ph	-
3	P(<i>o</i> -tol) ₃	47
4	PPh ₃	69
5	P(OEt) ₃	-
6	P(OPh) ₃	-
7	P(C ₆ F ₅) ₃	-

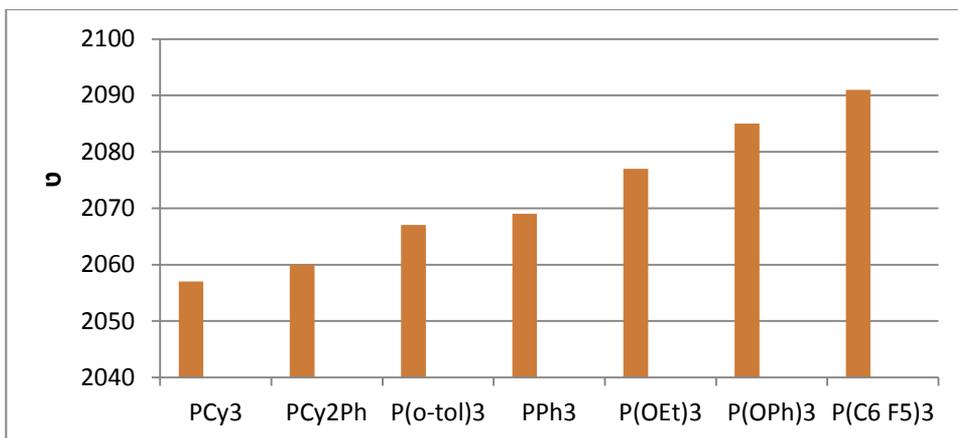
Los malos resultados obtenidos al emplear ligandos tipo fosfito se pueden explicar considerando la baja estabilidad en presencia de radicales libres que presentan estos compuestos.⁹⁹ Teniendo en cuenta estos resultados, la fosfina más adecuada para este tipo de reacciones es PPh₃, ya que en ambos casos proporciona rendimientos adecuados.

⁹⁹ M. Bietti, A. Cocagni, M. Salomone, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 4514-4520.

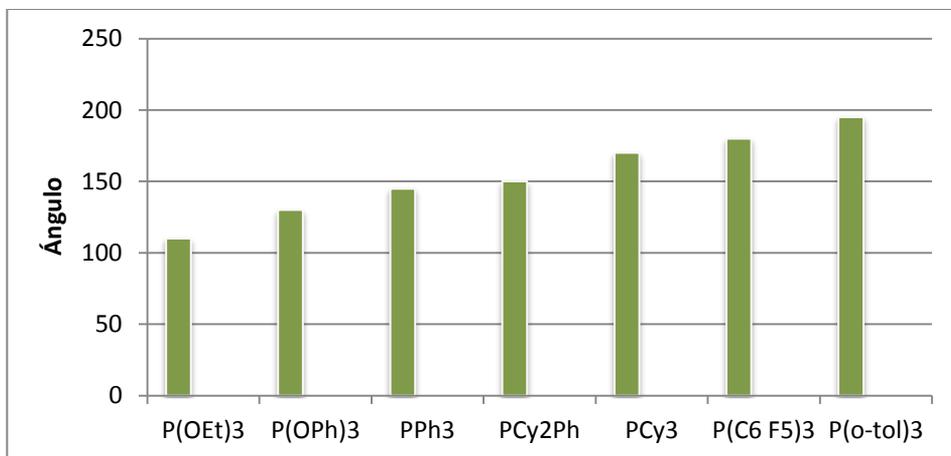
Bloque A. Capítulo I

En las gráficas 1 y 2 se comparan la frecuencia de vibración (ν) y el volumen estérico de distintos ligandos fosforados. Como se observa, PPh_3 es la fosfina que presenta menor tamaño y mayor carácter π -aceptor, justificando así los resultados obtenidos anteriormente.

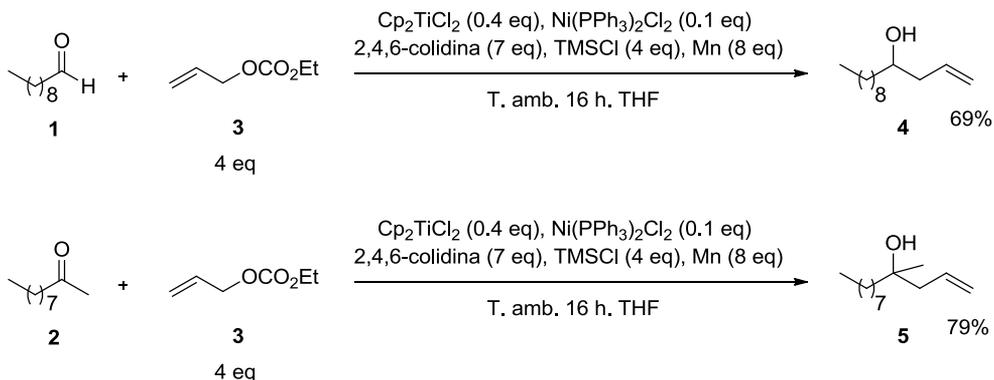
Gráfica 1



Gráfica 2

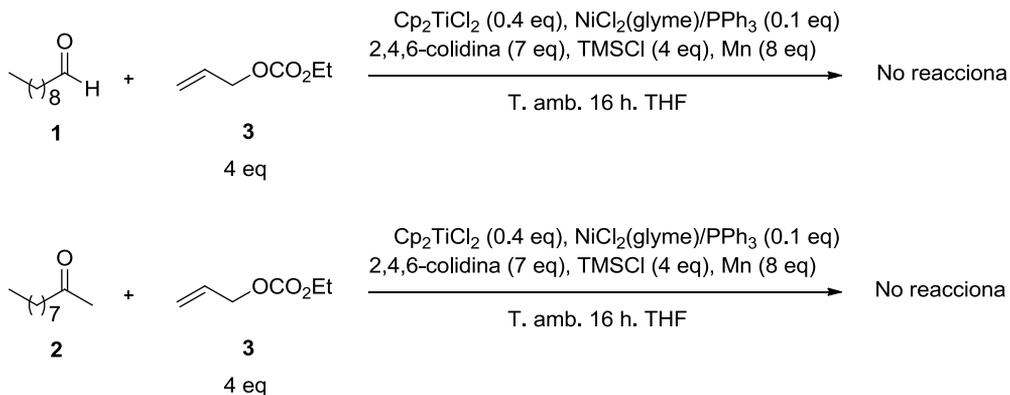


Por otra parte, se llevó a cabo la alilación de los sustratos modelo **1** y **2** empleando el complejo preformado $\text{Ni}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, disponible comercialmente. En ambos casos, se consiguió mejorar el rendimiento con respecto al obtenido al generar *in situ* el catalizador (Esquema 87).



Esquema 87

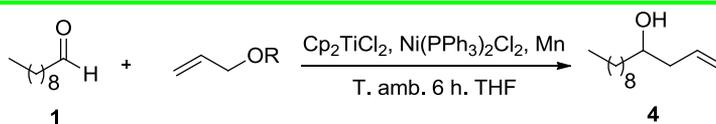
En este punto, se decidió modificar el derivado de níquel empleado en estos procesos, sustituyendo el NiCl_2 por $\text{NiCl}_2(\text{glyme})$, manteniendo PPh_3 como ligando. Sin embargo, en ningún caso se observó la formación de los compuestos alilados (Esquema 88).



Esquema 88

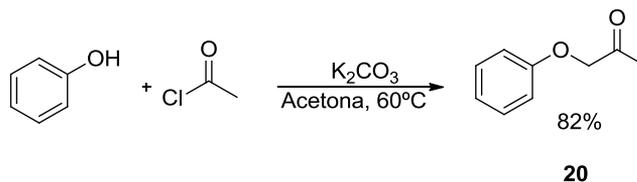
En base a estos resultados, utilizamos el complejo comercial $\text{Ni}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ en cantidades estequiométricas y decanal (**1**) como sustrato modelo para estudiar este proceso con distintos agentes alilantes (Tabla 3). La reacción tiene lugar cuando se emplea como pronucleófilos éteres, obteniéndose el alcohol homoalílico correspondiente con rendimiento moderado para el caso de éteres aromáticos (entrada 3). El empleo de benzoatos aromáticos generó el producto de alilación con rendimientos bajos cuando el anillo no presenta sustitución (entrada 4) pero en presencia de grupos electróndadores (entrada 5) o atractores (entrada 6) se desfavorece el proceso de alilación. Como puede observarse, en ningún caso se supera el rendimiento obtenido con el etilcarbonato de alilo (entrada 7), el cual se escogió como mejor agente alilante.

Tabla 3

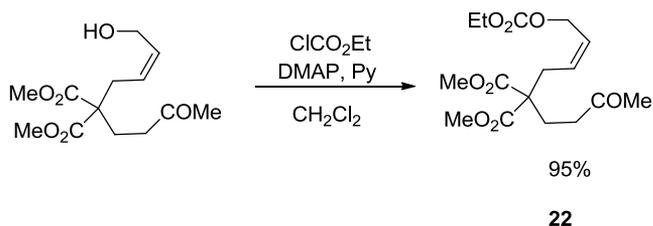


Entrada	R	Rendimiento %
1	H	-
2	Et	7
3	Ph	55
4	COPh	40
5	$\text{CO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OMe}$	-
6	$\text{CO}_2\text{C}_6\text{F}_5$	8
7	CO_2Et	69

Una vez fijadas las condiciones óptimas de reacción, estudiamos el alcance del proceso de alilación para aldehídos y cetonas de distintas características, tanto estéricas como electrónicas, empleando la combinación [Ti]/[Ni] (Tabla 4). Entre ellos, los productos de partida **20** y **22** se sintetizaron según se muestra en los esquemas 89 y 90, respectivamente.

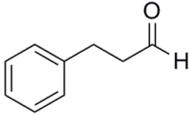
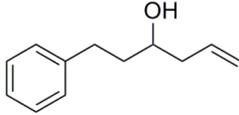


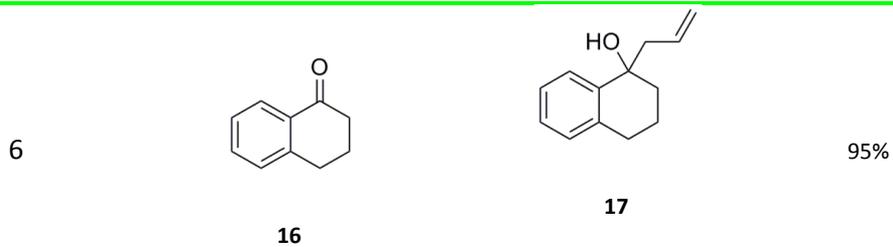
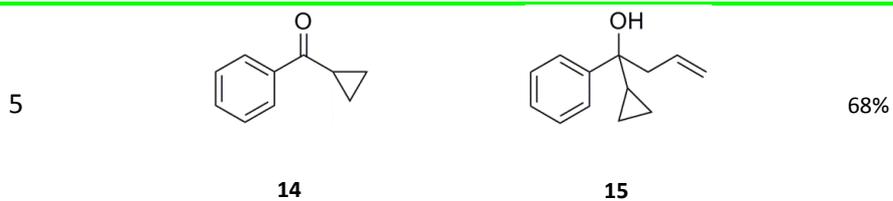
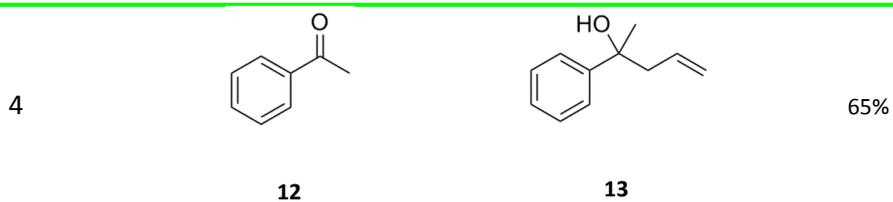
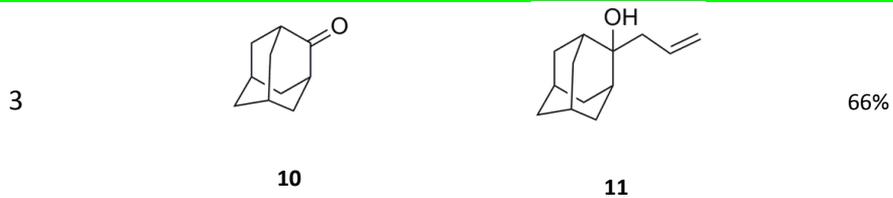
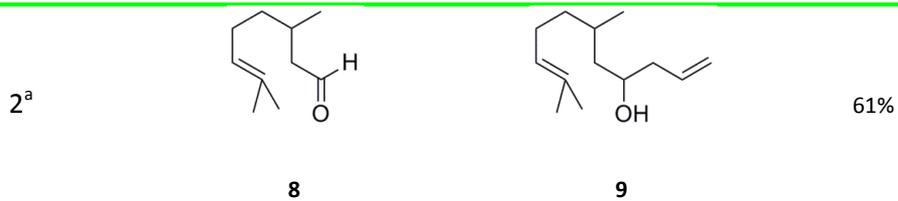
Esquema 89



Esquema 90

Tabla 4

Entrada	Compuesto carbonílico	Producto	Rendimiento
$R_1-C(=O)-R_2 + \text{CH}_2=CH-OR \xrightarrow[\text{T. amb. 16 h. THF}]{\text{Cp}_2\text{TiCl}_2 (0.4 \text{ eq}), \text{Ni}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2 (0.1 \text{ eq}), \text{2,4,6-colidina} (7 \text{ eq}), \text{TMSCl} (4 \text{ eq}), \text{Mn} (8 \text{ eq})}$ <p style="text-align: center;">4 eq</p>		$R_1-C(OH)(R_2)-CH_2-CH=CH_2$	
1	 <p style="text-align: center;">6</p>	 <p style="text-align: center;">7</p>	53%



7			50%
	18	19	
8			67%
	20	21	
9 ^b			68%
	22	23	

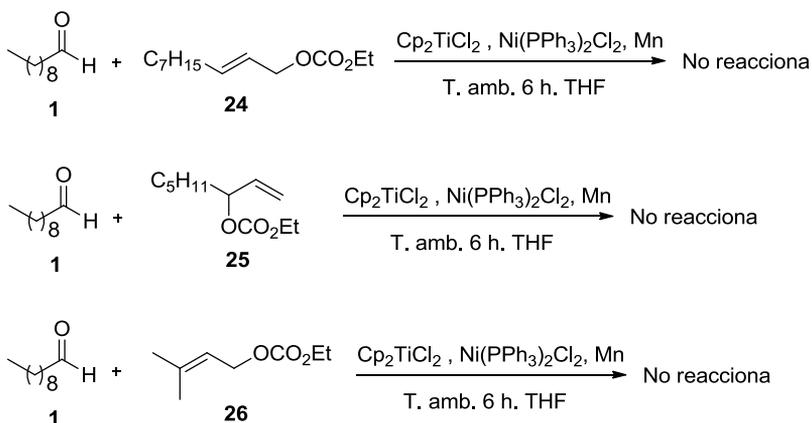
^a 1:1 mezcla de diastereoisómeros.

^b 2:1 mezcla de estereoisómeros *syn:anti*

La reacción tuvo lugar con aldehídos alifáticos (entradas 1 y 2), cetonas cíclicas y alifáticas no impedidas (entradas 7 y 8) y cetonas cíclicas estéricamente impedidas (entrada 3). Incluso cetonas aromáticas con tendencia a pinacolizar (entradas 4-6) originaron los correspondientes alcoholes homoalílicos. El carbociclo de seis miembros derivado de la versión intramolecular de la reacción de alilación (entrada 9) también se obtuvo con buen rendimiento, presentando el grupo vinilo una estereoquímica tipo *syn* con respecto al hidroxilo.

A continuación, estudiamos la reactividad de carbonatos de alilo con distinta sustitución (**24-26**). Bajo las condiciones óptimas anteriormente empleadas, la

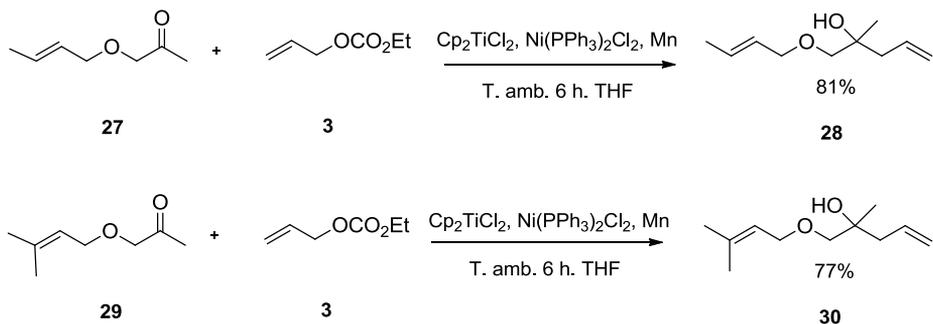
reacción del decanal (**1**) con estos carbonatos no tuvo lugar, recuperándose el producto de partida inalterado (Esquema 91).



Esquema 91

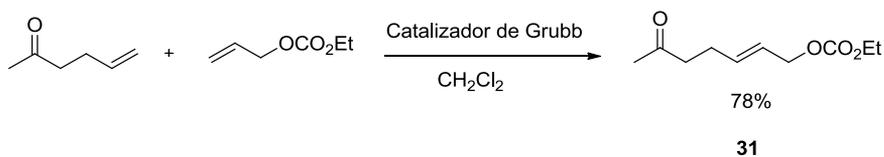
Aunque el comportamiento del níquel en estos procesos catalíticos de alilación es similar al del paladio, no ocurre lo mismo en reacciones de crotilación y prenilación intermoleculares. Para comprobarlo, empleamos las α -hidroxicetonas **27** y **29**, que presentan un doble enlace sustituido. En ambos casos obtuvimos el correspondiente alcohol homoalílico con buenos rendimientos (Esquema 92). Sin embargo, al llevar a cabo estas reacciones utilizando el sistema [Ti]/[Pd] obtuvimos mezclas complejas de reacción, demostrando la diferente quimioselectividad de ambos procesos.

Bloque A. Capítulo I

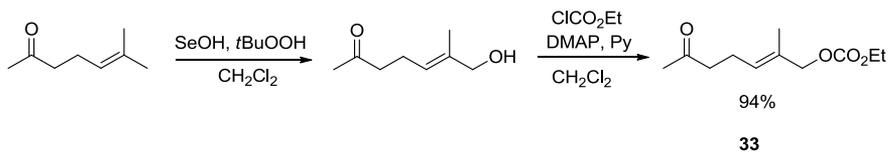


Esquema 92

A continuación, extendimos estos estudios de quimioselectividad a otros sustratos. Para tal fin sintetizamos los compuestos **31** (Esquema 93) y **33** (Esquema 94), que contienen en su misma estructura un grupo carbonato sustituido y un grupo carbonilo.

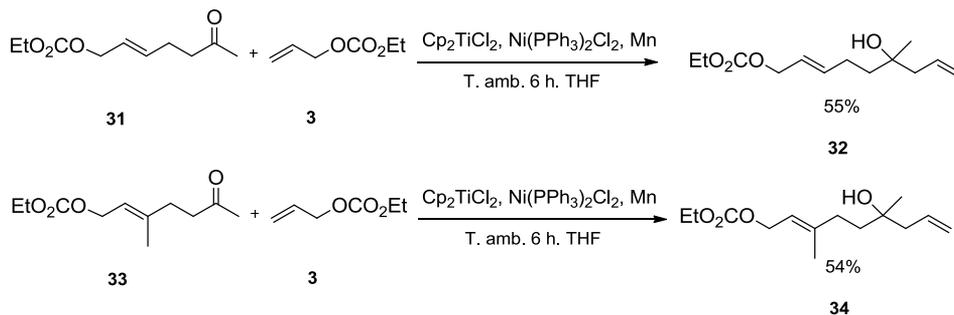


Esquema 93



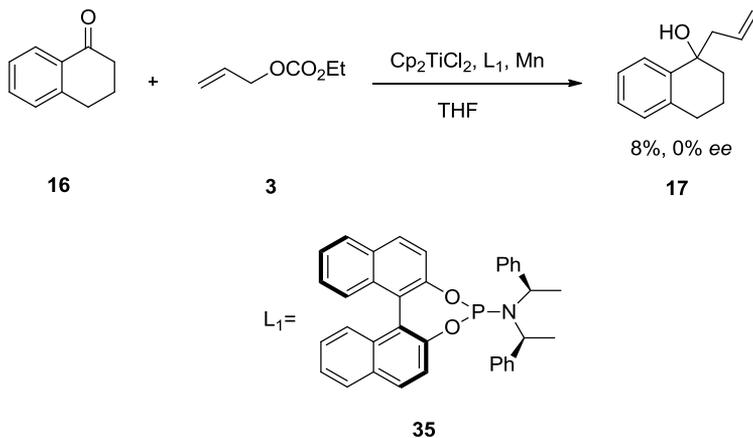
Esquema 94

Llevamos a cabo la reacción, añadiendo al medio etilcarbonato de alilo (**3**). Cuando se emplea el sistema [Ti]/[Ni], se observó de nuevo el producto de alilación intermolecular, manteniéndose el grupo carbonato intacto en la estructura final (Esquema 95). Sin embargo, cuando se empleó el sistema [Ti]/[Pd] se obtuvo una mezcla inseparable de productos, todos ellos sin carbonato en su estructura.



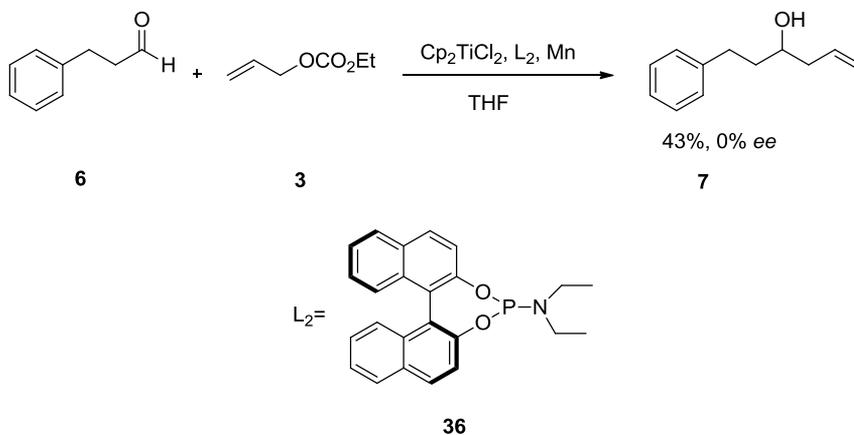
Esquema 95

Con el objetivo de obtener información sobre el mecanismo de reacción, llevamos a cabo distintos ensayos relacionados con el control de la enantioselectividad del proceso. En primer lugar, realizamos la alilación de la tetralona (**16**), empleando el fosforamidito quiral **35** como ligando para el níquel. Desafortunadamente, el rendimiento fue muy bajo, resultando además una mezcla racémica (Esquema 96).



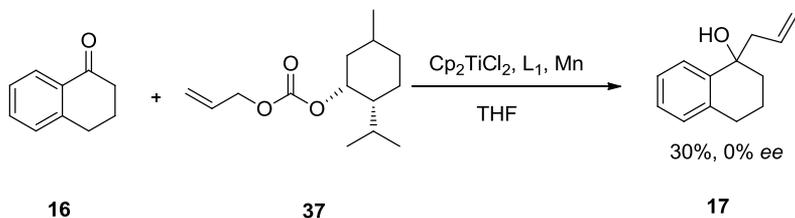
Esquema 96

Decidimos entonces emplear el ligando quiral (R)-monophos **36**, menos voluminoso, y un sustrato más reactivo como 3-fenilpropanal (**6**), obteniendo de nuevo el producto racémico aunque con mejor rendimiento (Esquema 97).



Esquema 97

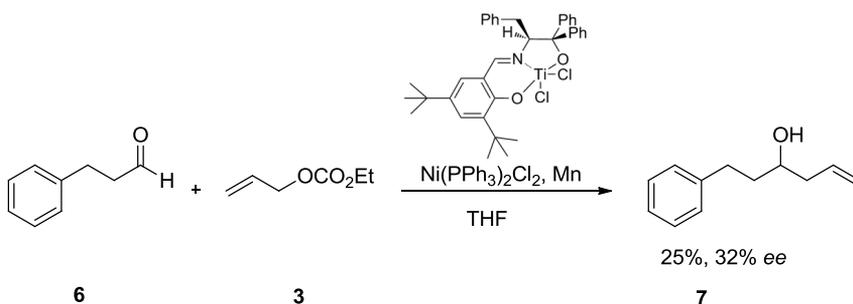
Finalmente, empleamos el pronucleófilo quiral **37**, derivado del (*R,R*)-mentol, como agente alilante y, de nuevo, no se obtuvo inducción asimétrica alguna (Esquema 98).



Esquema 98

De estos resultados preliminares se podría deducir que el complejo de níquel no está involucrado en la etapa de formación del enlace C-C o que dicha transformación ocurre con complejos de níquel en ausencia de ligando fosforado.

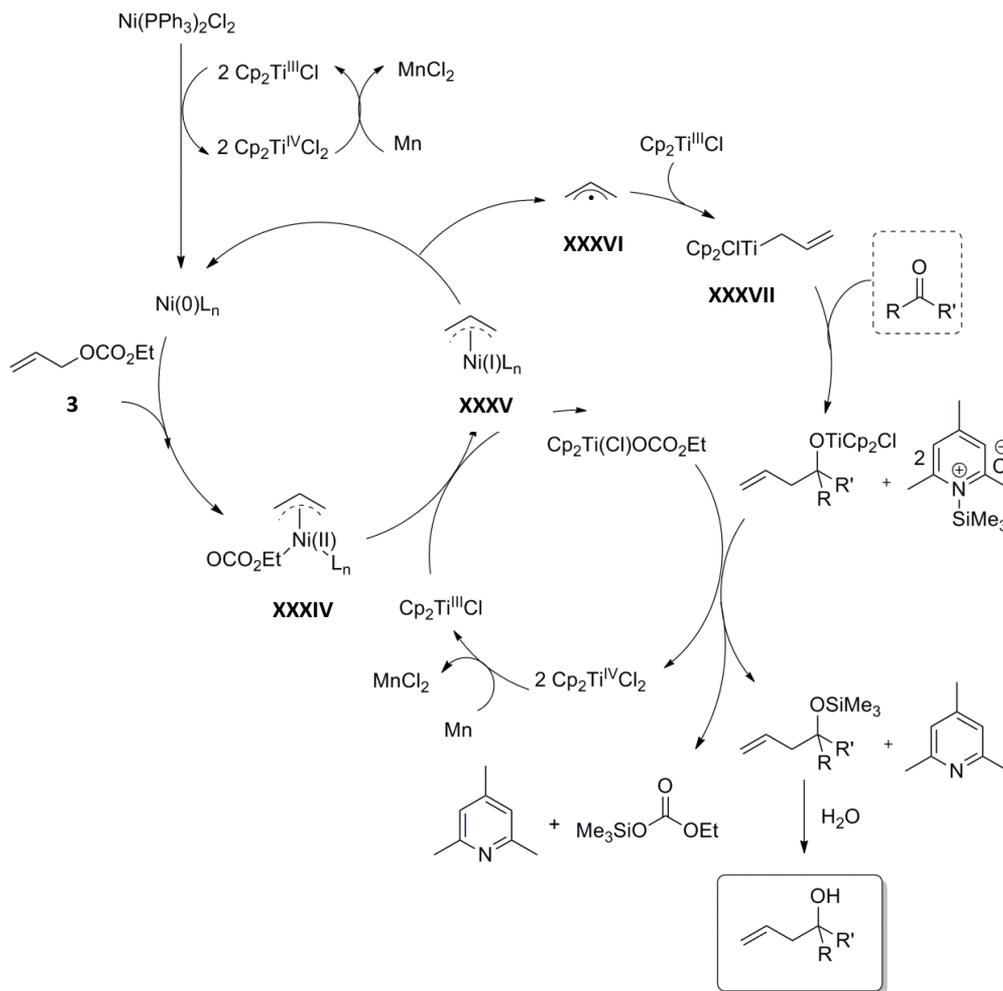
De la misma manera, se realizaron ensayos similares empleando complejos quirales de titanio(III), con el fin de determinar cuál es la especie catalítica implicada en el proceso de formación del enlace carbono-carbono. Para ello llevamos a cabo la reacción de alilación del fenilpropanal (**6**), empleando el complejo de titanio(IV) quiral de Riant.



Esquema 99

Aunque se obtuvo un 32% de exceso enantiomérico, el rendimiento de la reacción fue bajo. Sin embargo este experimento nos confirmó que el complejo de titanio está involucrado en la etapa de formación de enlace C-C, comprobando la que es posible controlar la estereoselectividad del proceso.

Analizando los resultados obtenidos a lo largo de este estudio, se propuso el siguiente mecanismo de reacción (Esquema 100).



Esquema 100

El complejo η^3 -alil-níquel(II) **XXXIV** es generado a partir de $\text{Ni}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, Cp_2TiCl_2 y Mn, debido a la adición oxidante del electrófilo alílico **3**. A continuación, ocurriría la reducción monoelectrónica de **XXXIV** formándose un intermedio η^3 -alil-níquel(I) **XXXV** y un etilcarbonato de titanio(IV). La especie de níquel **XXXV** podría fragmentarse en dos especies diferentes: a) el correspondiente radical alilo **XXXVI** y b) el complejo de Ni(0) que puede reintroducirse en el ciclo catalítico. El proceso de heteroacoplamiento del radical alilo con el complejo Cp_2TiCl daría lugar un complejo η^1 -alil-titanio(IV) nucleófilo **XXXVII**, que puede reaccionar con diferentes electrófilos como aldehídos y cetonas. La combinación de los agentes regeneradores de titanoceno(III), 2,4,6-colidina, TMSCl y Mn, reintroducen el Cp_2TiCl en el ciclo catalítico.

SECTION A
CHAPTER I. CONCLUSIONS

We have demonstrated that Ti^{III} can catalyse allylation of carbonyl compounds, in the presence of nickel complexes, from stable and easily handled allylic carboxylate starting materials.

The addition reaction can also be carried out intramolecularly to yield five membered cyclic products with good stereoselectivities. Notably, this bimetallic system is especially convenient for the allylation of ketones, which are infrequent substrates in other related protocols. This protocol is restricted to allyl donors and therefore useful when acceptors incompatible with palladium complexes are used.

From a mechanistic point of view, it seems that Ti^{III} intermediates are involved in the C-C bond-forming reaction and accordingly are responsible for the enantioselectivity of the process when chiral titanocene(III) complexes are used.

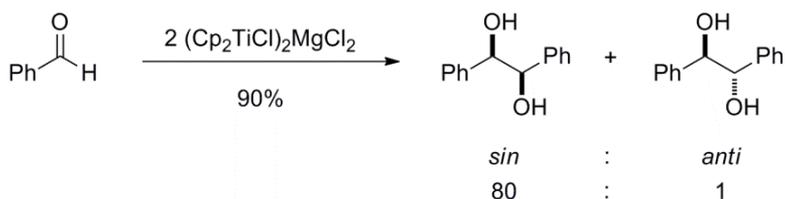
BLOQUE A
**CAPÍTULO II. NUEVAS REACCIONES DE ADICIÓN
TIPO BARBIER QUIMIOSELECTIVAS CATALIZADAS
POR COMPLEJOS DE TITANIO(III)**

BLOQUE A
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

1. REACCIONES DE ACOPLAMIENTO PINACOLÍNICO PROMOVIDAS POR TITANOCENO(III)

El acoplamiento reductor de dos compuestos carbonílicos, o acoplamiento pinacolínico, es probablemente una de las formas más directas para formar 1,2-dioles.

En 1987, Inanaga y Handa presentaron el acoplamiento pinacolínico de aldehídos aromáticos y α,β -insaturados promovidos por titanoceno(III) (Esquema 101).¹⁰⁰ En este trabajo se postuló que el complejo $(Cp_2TiCl)_2MgCl_2$, generado por reducción de Cp_2TiCl_2 con un magnesiano, es la especie reactiva capaz de acoplar aldehídos aromáticos con buenos rendimientos y diastereoselectividades. Con aldehídos y cetonas alifáticas como sustratos de partida no se tuvo lugar la reacción de acoplamiento en estas condiciones.



Esquema 101

La buena diastereoselectividad del proceso viene dada por la formación de un intermedio trinuclear donde los radicales cetilo unidos a los centros metálicos se disponen con los sustituyentes de forma *anti*, para disminuir así las interacciones estéricas (Figura 6).

¹⁰⁰ Y. Handa, J. Inanaga, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 5717-5718.

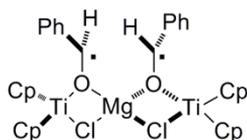
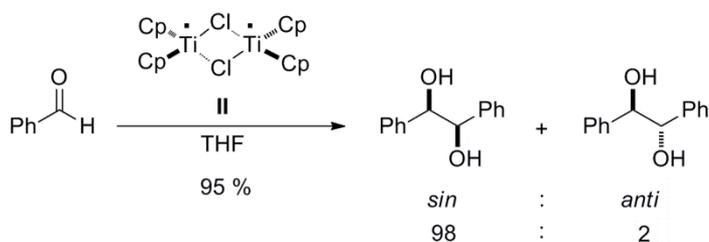


Figura 6

Posteriormente, Barden y Schwartz propusieron que se podía obtener una especie dímica de titanio(III) (II, Esquema 102 y véase Figura 1) por reducción de Cp_2TiCl_2 con Al en THF. En su caso, ésta sería la responsable de las altas diastereoselectividades en el acoplamiento pinacolínico de aldehídos aromáticos.¹⁰¹

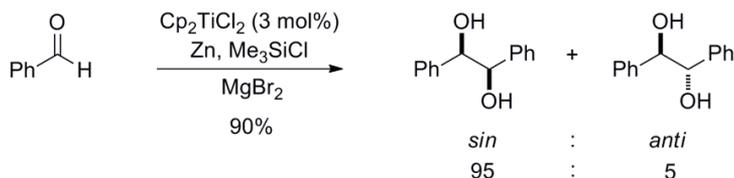


Esquema 102

El Prof. Gansäuer desarrolló en 1997 la primera versión catalítica de este acoplamiento, empleando como regenerador Me_3SiCl y Zn, en presencia de MgBr_2 (Esquema 103).¹⁰² En este caso el complejo propuesto por Inanaga (véase Figura 6) sería el responsable de la alta diastereoselectividad.

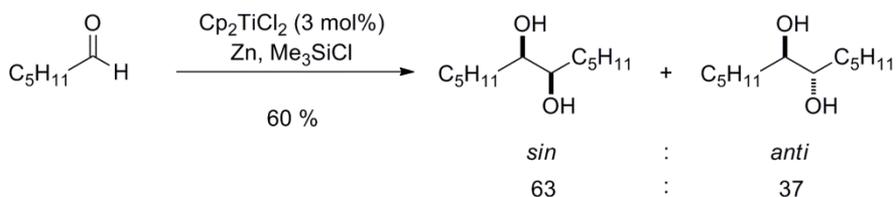
¹⁰¹ M. C. Barden, J. Schwartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5484-5485.

¹⁰² A. Gansäuer, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1997**, 457-458.



Esquema 103

La extensión de este procedimiento a aldehídos alifáticos se describió un año más tarde por parte del grupo de Hirao, empleando el sistema catalítico Cp_2TiCl_2 , Zn, Me_3SiCl (Esquema 104).¹⁰³ En este caso, las diastereoselectividades son más bajas que al utilizar aldehídos aromáticos.

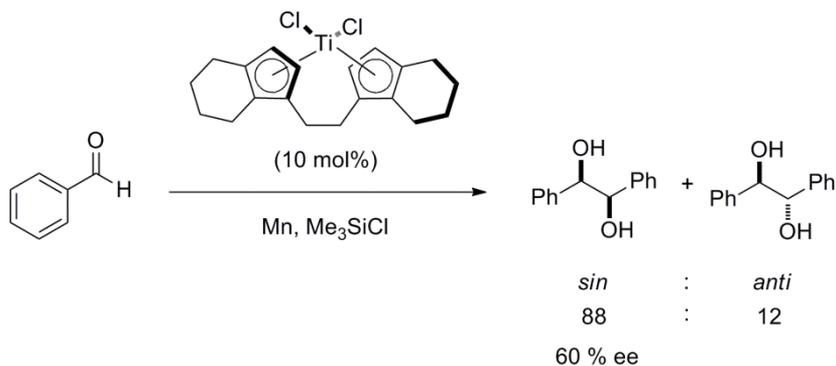


Esquema 104

El primer acoplamiento pinacolínico asimétrico de aldehídos fue llevado a cabo por Dunlap y Nicholas empleando como catalizador quiral el complejo de Brintzinger (Esquema 105).¹⁰⁴

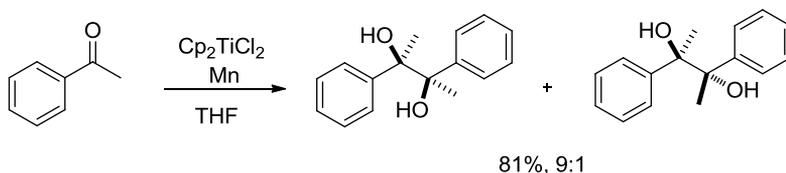
¹⁰³ T. Hirao, B. Hatano, M. Ashara, Y. Muguruma, A. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5247-5248.

¹⁰⁴ a) M. S. Dunlap, K. M. Nicholas, *Synth. Commun.* **1999**, 29, 1097-1106; b) M. S. Dunlap, K. M. Nicholas, *J. Organomet. Chem.* **2001**, 630, 125-131.



Esquema 105

En 2009, nuestro grupo de investigación estudió el acoplamiento pinacolítico de cetonas aromáticas, promovido por el sistema $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2/\text{Mn}$ (Esquema 106), pues hasta el momento todos los trabajos al respecto versaban sobre aldehídos. Se observó que al emplear titanoceno(III) en ausencia de manganeso, sólo se obtenía un 10% de producto pinacolínico; por el contrario, al emplear este metal reductor en exceso se obtuvo un rendimiento bastante elevado.¹⁰⁵

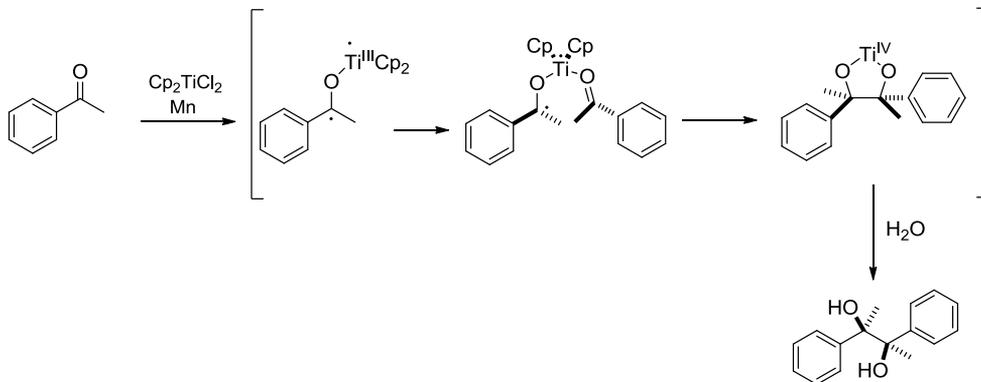


Esquema 106

El mecanismo de reacción propuesto (Esquema 107) implica que el titanio actúa de dos formas: en primer lugar, como ácido de Lewis para coordinarse con el grupo carbonilo, facilitando la transferencia monoelectrónica desde el metal reductor (Mn); y en segundo lugar como responsable de la diastereoselectividad

¹⁰⁵ M. Paradas, A. G. Campaña, R. E. Estévez, L. Álvarez de Cienfuegos, T. Jiménez, R. Robles, J. M. Cuerva, J. E. Oltra *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3616-3619.

observada. Aunque el mecanismo propuesto involucra a una especie diradicalaria, cálculos teóricos avalaron la existencia de dicha especie.

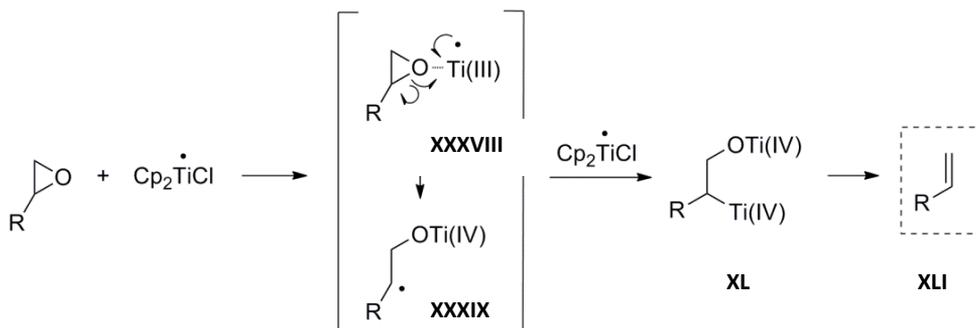


Esquema 107

En definitiva, el acoplamiento pinacólico promovido por titanoceno(III) es una herramienta más para la formación de enlaces C-C. Sin embargo, en el contexto del desarrollo de reacciones tipo Barbier se convierten en procesos paralelos no deseados, pues parte del sustrato carbonílico de partida pinacoliza, con la consiguiente disminución del rendimiento de la reacción principal.

2. REACCIONES DE DESOXIGENACIÓN Y REDUCCIÓN DE EPÓXIDOS MEDIADAS POR TITANOCENO(III)

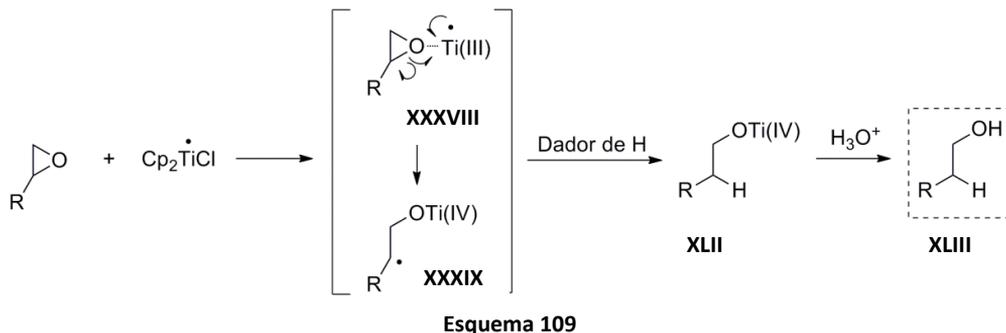
El complejo Cp_2TiCl permite la desoxigenación de epóxidos mediante dos transferencias mono electrónicas consecutivas, a través de un intermedio estable β -titanoxiradical. Es un proceso suave y selectivo (Esquema 108).^{13c,d}



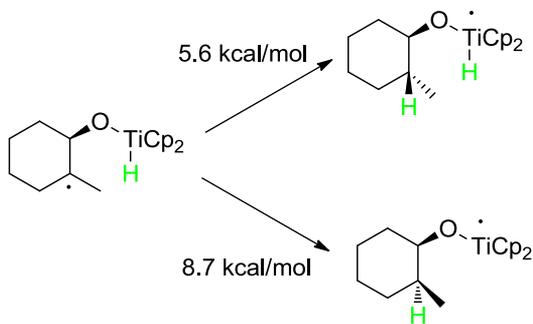
Esquema 108

Tras la formación del complejo **XXXVIII** entre el epóxido y el Ti(III) , se produce la ruptura homolítica del enlace C-O formando el β -titanoxiradical **XXXIX**, que es atrapado por otra molécula de Ti(III) . Posteriormente tiene lugar el proceso de desoxigenación de **XL**, dando lugar al alqueno correspondiente **XLI**.

En presencia de donadores de átomos de hidrógeno, el β -titanoxiradical **XXXIX** formado es reducido, obteniéndose el correspondiente alcohol **XLIII** (Esquema 109).^{13c,d} Cabe destacar que la regioselectividad de esta reacción es complementaria a la que se obtiene mediante apertura de epóxidos tipo $\text{S}_{\text{N}}2$.



Recientemente, el grupo del Profesor Gansäuer ha llevado a cabo la apertura reductora de epóxidos empleando un novedoso complejo de titanio(III), Cp_2TiH , capaz de generar una especie radicalaria en el epóxido, y a su vez promover un proceso de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT), generando el alcohol deseado. De esta manera, la reducción del epóxido al correspondiente alcohol presenta una estereoselectividad tipo *syn* (Esquema 110).¹⁰⁶

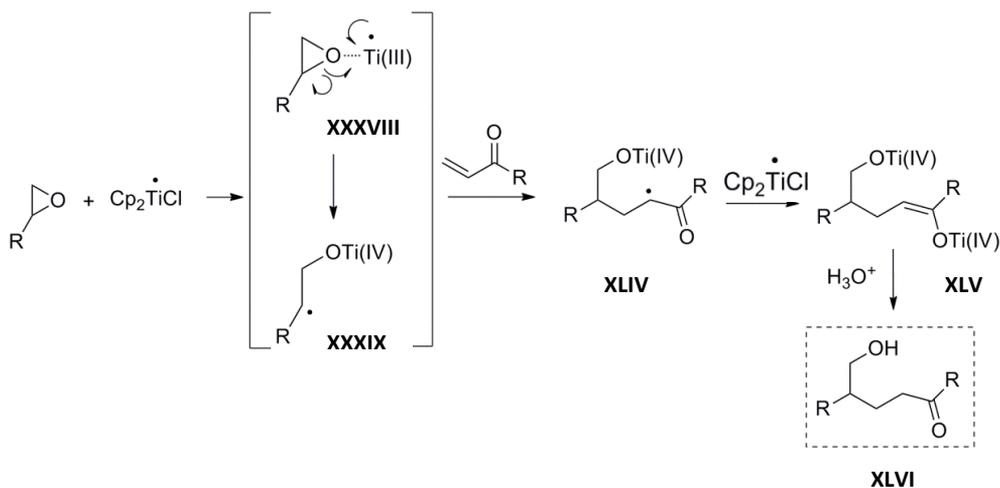


Esquema 110

¹⁰⁶ A. Gansäuer, M. Klätte, G. M. Brändle, J. Friedrich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1-5.

3. REACCIONES DE ADICIÓN INTERMOLECULAR Y CICLACIÓN DE MEDIADAS POR TITANOCENO(III)

Tras la apertura homolítica del epóxido, el β -titanoxiradical **XXXIX** generado también puede adicionarse a olefinas activadas, dando lugar a compuestos δ -hidroxicarbonílicos **XLVI** por formación de un enlace C-C (Esquema 111).^{13a,c}



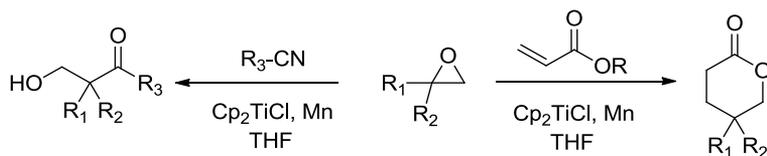
Esquema 111

De la misma manera, el β -titanoxiradical puede adicionarse a otras especies aceptoras tipo Michael y a nitrilos (Esquema 112).^{107,108,109}

¹⁰⁷ A. Gansäuer, H. Bluhm, *Chem. Commun.* **1998**, 2143-2144.

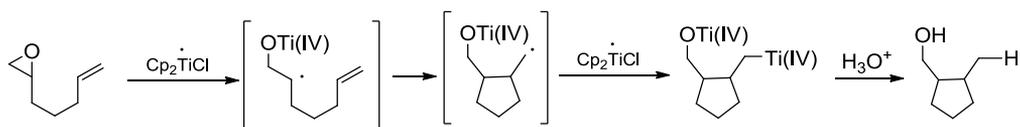
¹⁰⁸ a) J. D. Parrish, R. D. Little, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1439-1442; b) G. A. Nishiguchi, R. D. Little, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5249-5256.

¹⁰⁹ A. Fernández-Mateos, S. Encinas-Madrado, P. Herrero-Teijón, R. Rubio-González, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3913-3918.



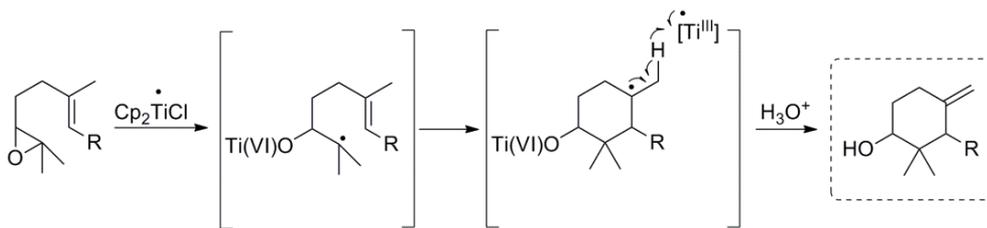
Esquema 112

La adición intramolecular del β -titanoxiradical sobre una olefina permite la obtención de ciclos de manera fácil y directa. Tras la ciclación, se genera un radical que puede ser atrapado por otra molécula de titanoceno(III), sufriendo la subsiguiente protodesmetalación (Esquema 113).^{13a}



Esquema 113

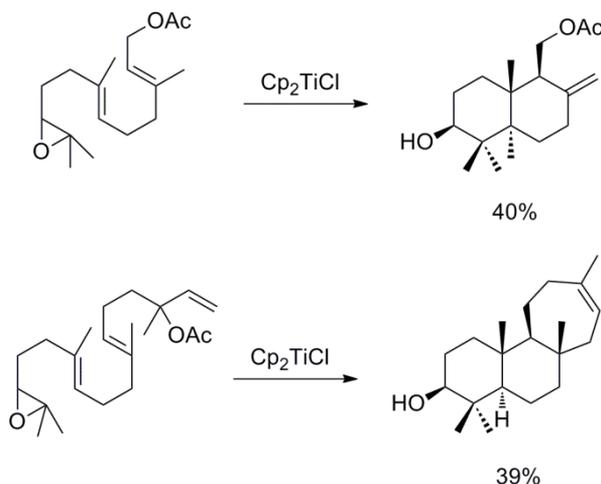
También puede ocurrir una reacción de desproporción mixta para generar un alqueno en el paso final de la ciclación (Esquema 114).¹¹⁰



Esquema 114

¹¹⁰ J. Justicia, T. Jiménez, S. P. Morcillo, J. M. Cuerva, J. E. Oltra *Tetrahedron* **2009**, *65*, 10837-10841.

Estas ciclaciones pueden ser sucesivas, dando lugar a ciclaciones radicalarias en cascada. Esta estrategia ha sido utilizada en ciclaciones biomiméticas de epoxipolienos, consiguiéndose ciclos fusionados con gran facilidad (Esquema 115).¹¹¹



Esquema 115

De esta manera se han sintetizado diversos productos naturales con actividad biológica, entre los que cabe destacar el zonarol, el achileol A o el sesterstatín 1 (Figura 7).¹¹²

¹¹¹ J. Justicia, L. Álvarez de Cienfuegos, A. G. Campaña, D. Miguel, V. Jakoby, A. Gansäuer, J. M. Cuerva, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3525-3537.

¹¹² a) J. Justicia, J. L. Oller-López, A. G. Campaña, J. E. Oltra, J. M. Cuerva, E. Buñuel, D. J. Cárdenas, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14911-14921; b) A. Gansäuer, J. Justicia, A. Rosales, D. Worgull, B. Rinker, J. M. Cuerva, J. E. Oltra, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4115-4127; c) A. F. Barrero, J. M. Cuerva, E. Álvarez-Manzaneda, J. E. Oltra, R. Chanboun, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2793-2796; d) J. Justicia, J. E. Oltra, J. M. Cuerva, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8265-8272; e) J. Justicia, J. E. Oltra, J. M. Cuerva, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4293-4296; f) J. Justicia, J. E. Oltra, A. F. Barrero, A. Guadaño, A. González-Coloma, J. M. Cuerva, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 712-718; g) T. Jiménez, S. P. Morcillo, A. Martín-Lasanta, D. Collado-Sanz, D. J. Cárdenas, A. Gansäuer, J. Justicia, J. M. Cuerva, *Chem., Eur. J.* **2012**, *18*, 12825-12833.

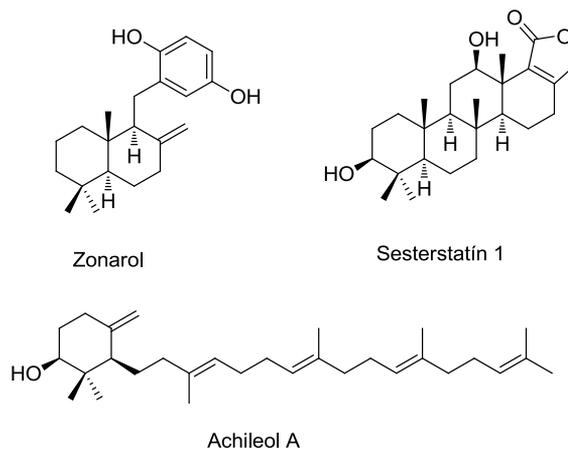
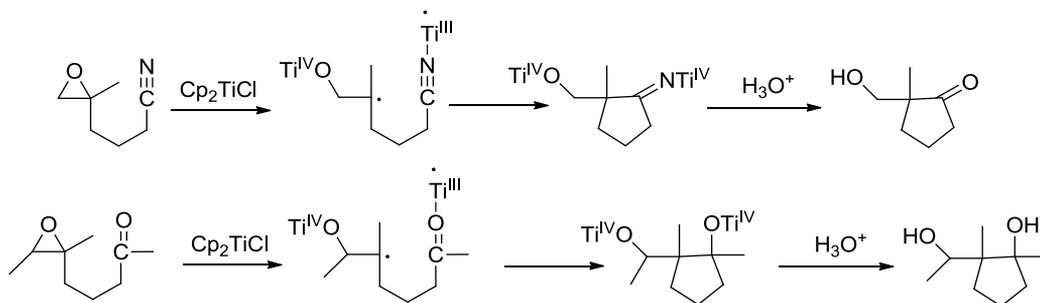


Figura 7

En este contexto, el complejo de titanoceno(III) también es capaz de promover una reacción de adición intramolecular sobre grupos carbonilo y nitrilos (Esquema 116).¹¹³



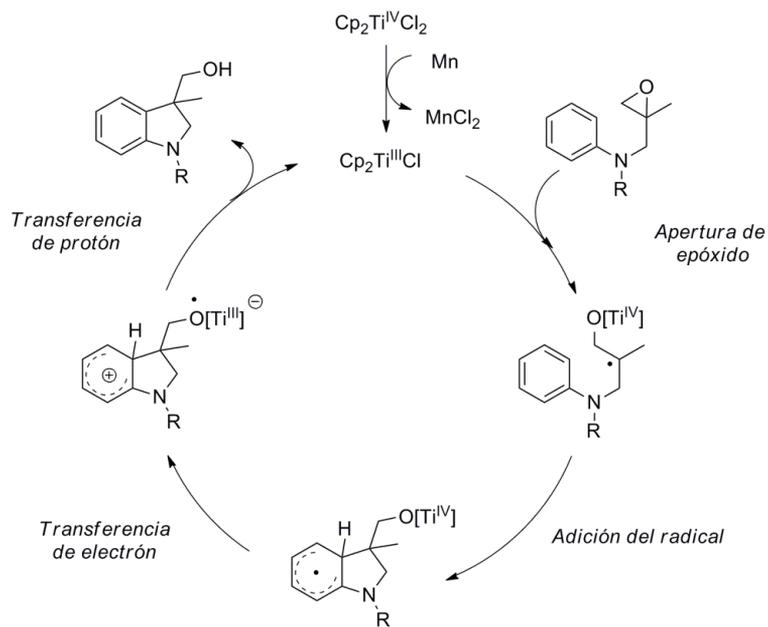
Esquema 116

¹¹³ a) A. Fernández-Mateos, E. Martín de la Nava, G. Pascual Coca, A. Ramos Silvo, R. Rubio González, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 607-609; b) A. Fernández-Mateos, P. Herrero Teijón, L. Mateos Burón, R. Rabanado Clemente, R. González Rubio, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9973-9982.

Recientemente, Gansäuer y colaboradores han descrito un novedoso proceso de adición de radicales generados a partir de epóxidos sobre anillos aromáticos que parece transcurrir a través del mecanismo que se muestra en el Esquema 117.¹¹⁴

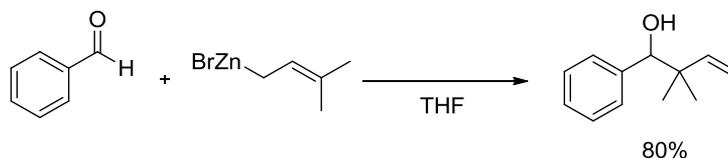
Tras la apertura del epóxido mediada por Cp_2TiCl , tiene lugar la adición del radical al anillo aromático. A continuación, se produce una transferencia de un electrón desde el radical arílico al titanoceno. La posterior transferencia de protón al grupo alcóxido unido a Ti(III) da lugar a los productos finales y cierra el ciclo catalítico con la regeneración de Cp_2TiCl . Este mecanismo intramolecular de transferencia de electrón-transferencia de protón permite el uso de cantidades subestequiométricas tanto de Cp_2TiCl_2 como de Mn, evitando el uso de regeneradores externos.

¹¹⁴ A. Gansäuer, M. Behlendorf, D. V. Laufenberg, A. Fleckhaus, C. Kube, D. V. Sadasivam, R. A. Flowers II, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4739-4742.



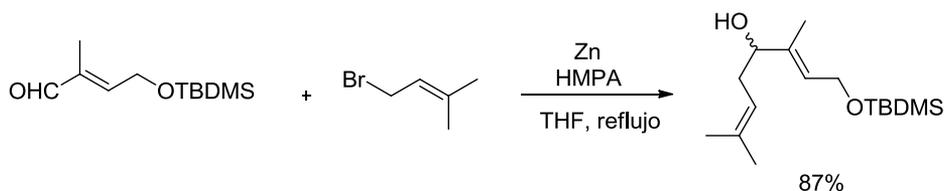
Esquema 117

Idéntico resultado obtuvo el grupo de Yamamoto empleando como especie alquilante prenil-zinc, aunque consiguieron mejores rendimientos (Esquema 120).¹¹⁶



Esquema 120

Años más tarde, se consiguió invertir la regioselectividad añadiendo un grupo protector voluminoso y HMPA en THF a reflujo (Esquema 121).¹¹⁷



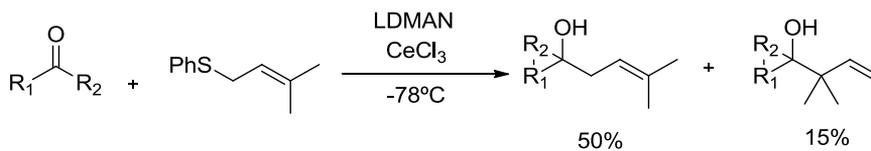
Esquema 121

En otros protocolos se han empleado metales como Ce (Esquema 122), Sm (Esquema 123), Sn (Esquema 124), Ba (Esquema 125), Cr (Esquema 126) o In (Esquema 127), aunque no siempre se ha controlado la regioselectividad.¹¹⁸

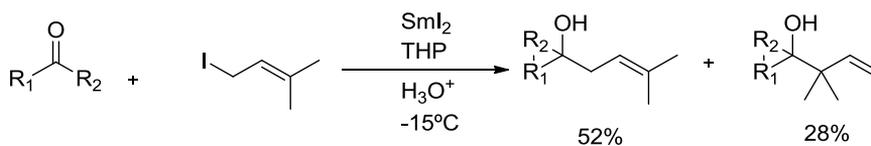
¹¹⁶ A. Yanagisawa, S. Habaue, H. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1986**, *54*, 5198-5200.

¹¹⁷ B. C. Hong, J. H. Hong, Y. C. Tsai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 468-470.

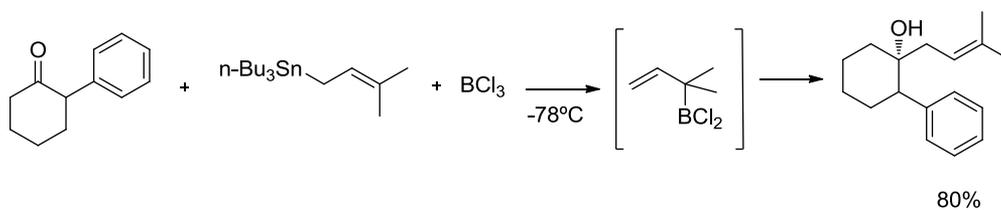
¹¹⁸ a) S. B. Guo, W. Doubleday, T. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4703-4710; b) B. Hamann-Gaudinet, J. L. Namy, H. B. Kagan, *J. Org. Chem.* **1998**, *567*, 39-47; c) K. M. Depew, S. J. Danishefsky, N. Rosen, L. Sepp-Lorenzino, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12463-12464; d) A. Yanagisawa, S. Habaue, K. Yasue, H. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6130-6141; e) H. S. Schrekker, M. W. G. De Bolster, R. V. A. Orru, L. A. Wessjohann, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1975-1981; f) H. S. Chen, T. P. Loh, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4990-4991.



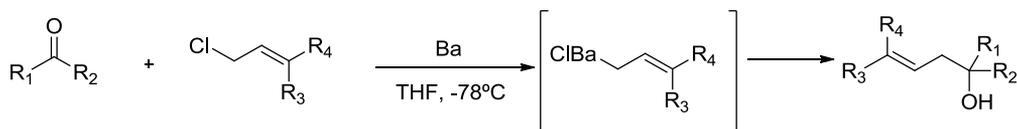
Esquema 122



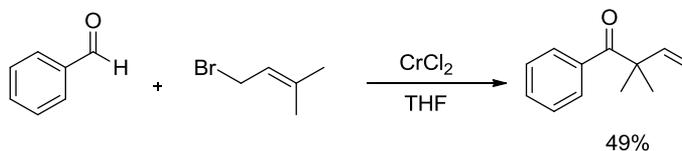
Esquema 123



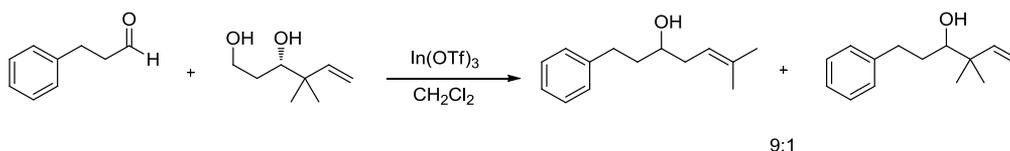
Esquema 124



Esquema 125



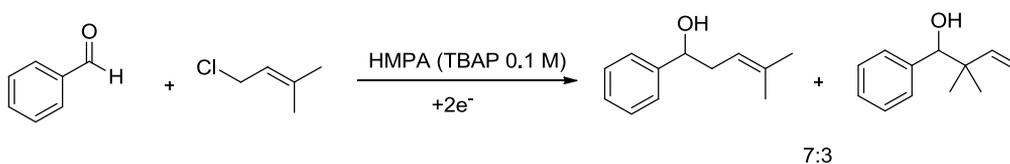
Esquema 126



Esquema 127

Como se puede observar, al emplear sales de Cr(II) se obtiene únicamente el el compuesto con regioquímica γ . Las reacciones mediadas por sales de Ce y Sm originan una mezcla de ambos regioisómeros, siendo el aducto α el mayoritario en éste caso. El empleo de estaño, bario e indio permite controlar la reacción y dirigirla hacia la formación del aducto α .

Por otro lado, también existen ejemplos de adiciones de haluros de prenilo a aldehídos alifáticos y/o aromáticos mediante métodos electroquímicos, usando disoluciones 0.1 M de perclorato de tetrabutilamonio en HMPA y electrodos de platino con distintos voltajes. En estos casos, ni la regio ni la diastereoselectividad son elevadas (Esquema 128).¹¹⁶



Esquema 128

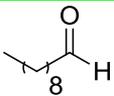
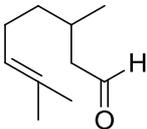
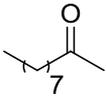
En nuestro grupo de investigación se pensó que este tipo de reacciones también pueden ser mediadas por $\text{Cp}_2\text{TiCl}_2/\text{Mn}$, por lo que en 2009 se procedió a realizar un estudio de éstas. Al optimizar las condiciones de reacción, se demostró

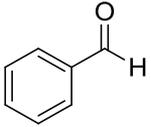
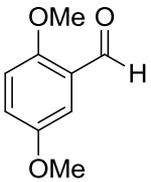
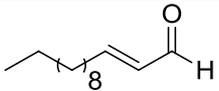
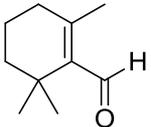
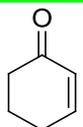
Bloque A. Capítulo II

que la adición lenta del haluro de prenilo muy diluído en THF sobre el compuesto carbonílico favorece la obtención del producto de adición α . Sin embargo, si la adición se realizaba de forma rápida o con alta concentración, la reacción se dirigía hacia la formación del aducto γ . Además, se consiguieron resultados similares empleando cantidades estequiométricas y catalíticas del complejo de titanio.⁹

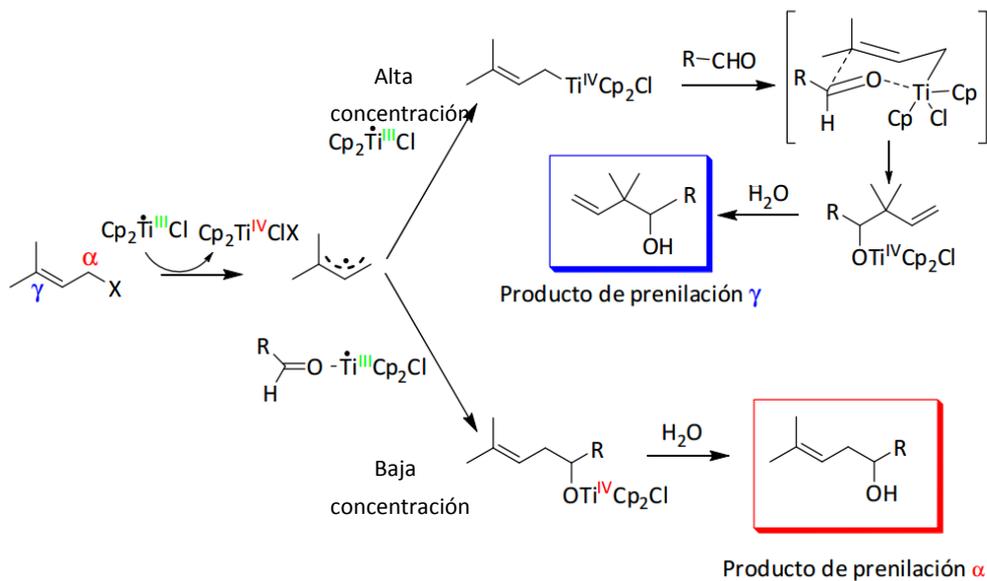
Algunos de los resultados obtenidos partiendo de aldehídos y cetonas alifáticas (entradas 1-3, Tabla 5), aromáticos (entradas 4 y 5) y α,β -insaturados (entradas 6-8) muestran que, aunque habitualmente se obtienen mezcla de regioisómeros, el producto de adición α suele ser el mayoritario.

Tabla 5

Entrada	Compuesto carbonílico	Producto $\alpha:\gamma$
1		8:2
2		4:6
3		0:1

4		1:0
5		1:0
6		9:1
7		1:0
8		1:0

Los resultados obtenidos confirmaron que, al contrario que en los procesos de alilación y crotilación, las reacciones tipo Barbier de prenilación de compuestos carbonílicos promovidas por titanoceno(III) son altamente regioselectivas, con preferencia por los productos de adición α cuando el haluro se añade diluido y lentamente. El mecanismo de reacción propuesto es el que se muestra en el Esquema 129:⁹



Esquema 129

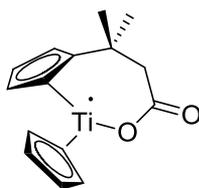
La limitación que presenta este protocolo es que en se obtienen bajos rendimientos debido a que los compuestos carbonílicos son susceptibles de dar lugar a reacciones de pinacolización en presencia de titanio(III). Además, es de destacar que la α -prenilación de compuestos carbonílicos α,β -insaturados es de especial interés en la síntesis de terpenos naturales.

BLOQUE A
CAPÍTULO II. OBJETIVOS

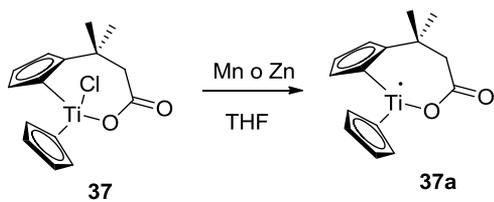
Durante años, nuestro grupo de investigación ha estudiado la reactividad y el alcance de la química del Cp_2TiCl . Como ya se explicado anteriormente, se ha logrado la formación de enlaces C-C a partir de acoplamientos pinacolínicos de compuestos carbonílicos, apertura homolítica de epóxidos y alquilaciones tipo Barbier de aldehídos y cetonas.^{9,105,110.}

Sin embargo, en ocasiones su reactividad hace que estos procesos compitan entre sí, produciéndose simultáneamente, con la consecuente disminución del rendimiento de reacción. Así, las α -prenilaciones mediadas por este complejo se ven limitadas por los acoplamientos pinacolínicos del compuesto carbonílico de partida. Por otro lado, la obtención de esqueletos terpénicos en síntesis de productos naturales a partir de procesos de α -prenilación se restringe a sustratos sin grupos epóxido, pues como es conocido el Cp_2TiCl provoca la apertura homolítica del mismo.

Para resolver este problema, decidimos estudiar el comportamiento químico de otro complejo de titanoceno(III) con objeto de desarrollar procesos quimioselectivos. Para tal estudio, elegimos el carboxilato de titanoceno(III) **37a** (Figura 8), generado *in situ* con un metal reductor (Mn o Zn) (Esquema 130) y descrito en 2005 por el grupo del Profesor Gansäuer.¹¹⁹

**37a****Figura 8**

¹¹⁹ A. Gansäuer, D.Franke, T. Lauterbach, M. Nieger, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11622-11623.

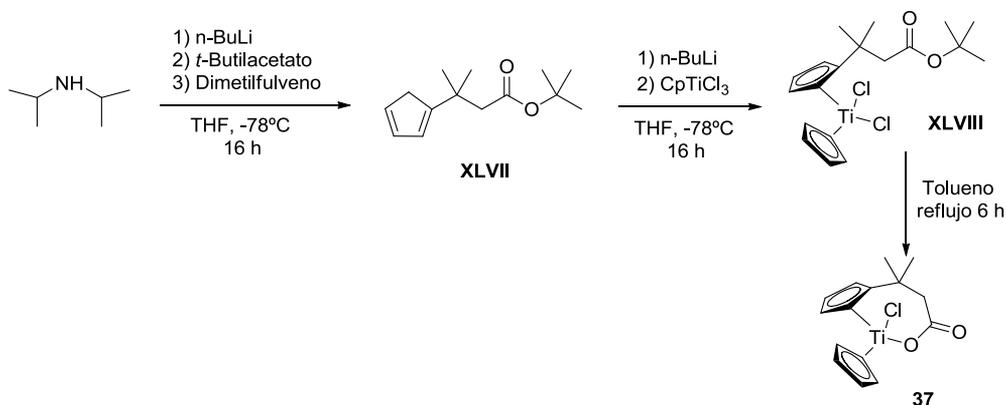


Esquema 130

En este capítulo describirán las diferencias existentes en la reactividad de este complejo con respecto al comúnmente usado Cp_2TiCl .

BLOQUE A
CAPÍTULO II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como primera etapa del presente estudio, sintetizamos el carboxilato de titanoceno **37** siguiendo la ruta que se muestra en el Esquema 131.¹¹⁹

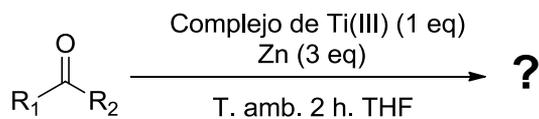


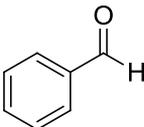
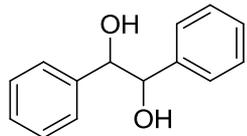
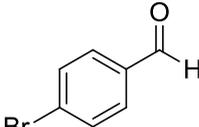
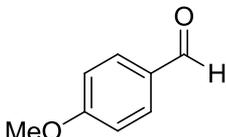
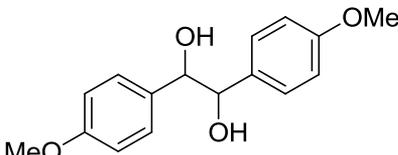
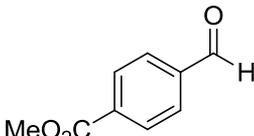
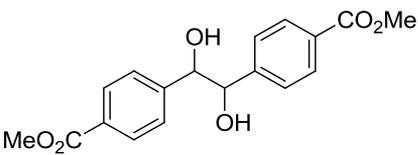
Esquema 131

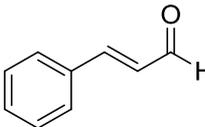
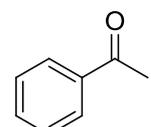
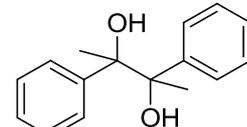
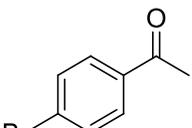
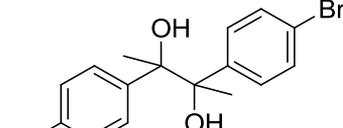
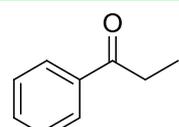
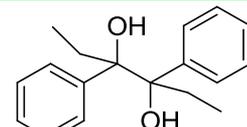
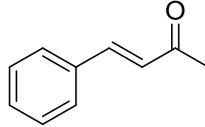
Este complejo **37** había sido empleado anteriormente como sustrato de partida para la síntesis de otros complejos de titanoceno(III) funcionalizados con grupos polares, con actividad citotóxica y antitumoral.¹¹⁹ Sin embargo, su reactividad no había sido estudiada hasta el momento, por lo que nos propusimos observar su comportamiento frente a las reacciones típicas de la Química del titanoceno(III).

Decidimos comenzar con el estudio de las reacciones de acoplamiento pinacólico, empleando Zn como metal reductor. Partimos de aldehídos y cetonas aromáticos en los que ésta reacción es frecuente, y llevamos a cabo el mismo proceso con cantidades estequiométricas de Cp₂TiCl₂ y del carboxilato **37** (Tabla 6), para comparar los resultados con ambos complejos.

Tabla 6



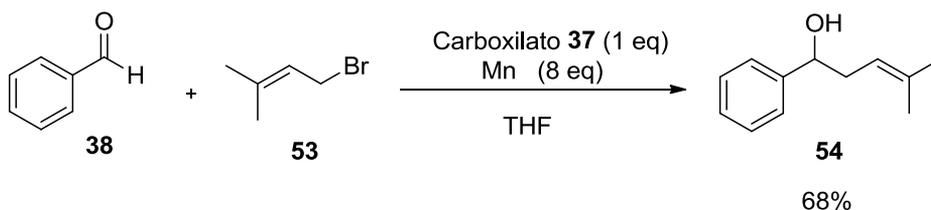
Entrada	Compuesto carbonílico	Reacción con Cp_2TiCl_2	Reacción con 37
1	 <p>38</p>	 <p>46</p>	38
2	 <p>39</p>	 <p>47</p>	39
3	 <p>40</p>	 <p>48</p>	40
4	 <p>41</p>	 <p>49</p>	41

5		---	42
6			12
7			43
8			44
9		---	45

Como se observa en la Tabla 6, en todos los casos en los que se empleó el carboxilato **37** se recuperó el producto de partida inalterado. Sin embargo, al emplear Cp_2TiCl_2 , obtuvimos los correspondientes productos de pinacolización **46-52** y en algunos casos la descomposición del producto de partida (entradas 5 y 9).

La no reactividad del carboxilato **37** frente a compuestos carbonílicos marca una gran diferencia con respecto al titanoceno(III) que empleábamos habitualmente, por lo que decidimos estudiar su comportamiento en procesos tipo Barbier.

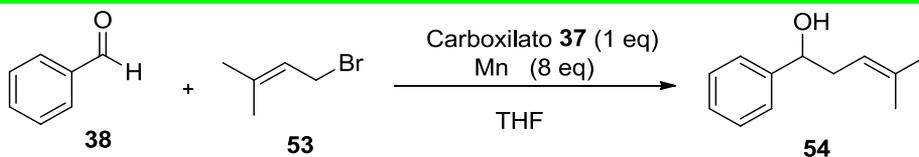
Teniendo en cuenta que los prenilos son la unidad básica de los terpenos naturales y los antecedentes con el complejo Cp_2TiCl , consideramos muy importante estudiar las reacciones de prenilación tipo Barbier con el carboxilato **37**. Para ello, tomamos como sustrato modelo el benzaldehído (**38**), por ser un compuesto inestable en presencia de con complejos de titanoceno(III), y para nuestra satisfacción, al llevar a cabo la reacción con bromuro de prenilo (**53**) como pronucleófilo, obtuvimos exclusivamente el producto α -prenilado **54** con rendimiento moderado (Esquema 132).



Esquema 132

Una vez comprobado que el aldehído **38** no se ve alterado por la presencia del complejo **37** y que además tenía lugar la reacción de prenilación tipo Barbier, procedimos a optimizar las condiciones de reacción teniendo en cuenta distintos factores: cantidad de complejo y haluro, así como el grado de dilución, la velocidad de adición y el tiempo de reacción por otro (Tabla 7).

Tabla 7



Entrada	Haluro (eq)	[Haluro]	Velocidad de adición	Tiempo de reacción	Rendimiento %
1	Br (1.5)	0.5 M	1 h	2 h	76
2	Br (2.0)	0.5 M	1 h	2 h	57
3	Br (3.0)	0.5 M	1 h	2 h	50
4	Br (1.5)	0.2 M	1 h	2 h	47
5	Br (1.5)	0.8 M	1 h	2 h	49
6	Br (1.5)	1 M	1 h	2 h	40
7	Br (1.5)	0.5 M	0.5 h	2 h	66
8	Br (1.5)	0.5 M	5 min.	2 h	53
9	Br (1.5)	0.5 M	1 h	0.5 h	65
10	Br (1.5)	0.5 M	1 h	4 h	68

11	Br (1.5 +1)	0.5 M	1 h + 5 min.	2.5 h	60
----	-------------	-------	--------------	-------	----

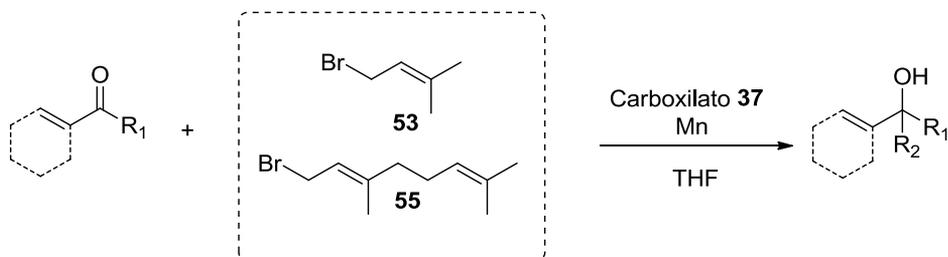
12	Cl (1.5)	0.5 M	1 h	2 h	65
----	----------	-------	-----	-----	----

A partir de estos datos llegamos a las siguientes conclusiones:

- Cuanto mayor sea la cantidad de haluro o concentración que se adiciona, más favorecida se ve la reacción de dimerización del mismo y por consiguiente se obtiene rendimientos moderados.
- Cuando la adición de haluro se realiza durante una hora y dejando reaccionar durante otra hora más, se obtienen los mejores resultados.
- El agente prenilante más eficaz es el bromuro de prenilo, aunque dicha reacción también tiene lugar empleando el correspondiente cloruro.

Por tanto, el mejor rendimiento (76%) se obtuvo a temperatura ambiente y con corto tiempo de reacción, representando un importante avance en la Química de titanoceno(III) pues en estas mismas condiciones de reacción pero empleando Cp_2TiCl el rendimiento no superó el 10% (debido a los procesos secundarios de pinacolización).

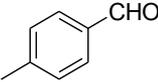
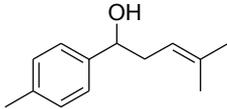
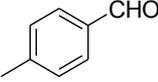
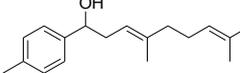
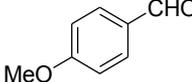
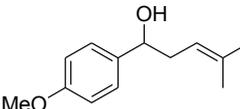
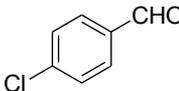
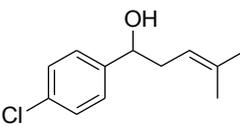
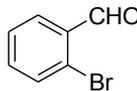
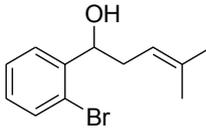
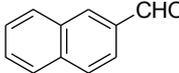
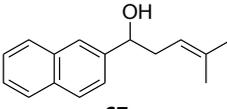
Debido a estos novedosos resultados, decidimos estudiar otros procesos en los que existiera la posibilidad de obtener adición en α y/o γ (Esquema 133).

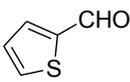
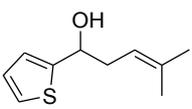
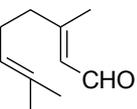
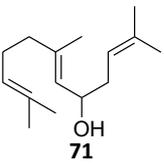
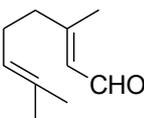
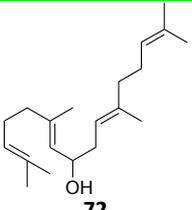
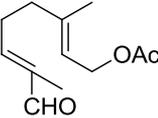
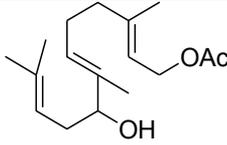


Esquema 133

Para ello escogimos los haluros alílicos **53** y **55** y distintos tipos de aldehídos (Tabla 8), aplicando los protocolos A (1 eq de carboxilato **37** y 1.5 eq de haluro) y B (1.5 eq de carboxilato **37** y 3 eq de haluro).

Tabla 8

Entrada	Aldehído	Haluro	Producto	Protocolo, Redimiento %
1	 56	53	 57	A, 96
2	 58	55	 59	A, 60
3	 60	53	 61	A, 82
4	 62	53	 63	A, 80
5	 64	53	 65	A, 88
6	 66	53	 67	A, 98

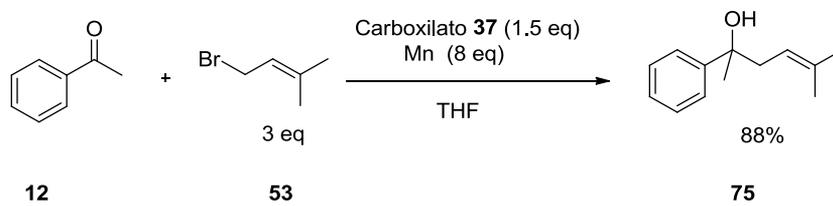
7	 68	53	 69	A, 60
8	 70	53	 71	B, 85
9	 70	55	 72	B, 30
10	 73	55	 74	B, 77

La adición α tuvo lugar con regioquímica α y con rendimientos entre moderados y altos, incluso en aldehídos aromáticos con distinta sustitución (entradas 1-6), con heterociclos aromáticos (entrada 7) y aldehídos α,β -insaturados (entradas 8-10). Estos productos podrían emplearse como sintones en síntesis de productos naturales, siguiendo una estrategia bioinspirada desarrollada por nuestro grupo de investigación.^{112d}

En ningún caso se observó la aparición de productos de pinalización de los aldehídos de partida, lo que justifica el aumento del rendimiento obtenido respecto a los resultados con Cp_2TiCl_2 .⁹ Además, esta regioselectividad permite la coexistencia del aldehído y del complejo durante la adición controlada de la

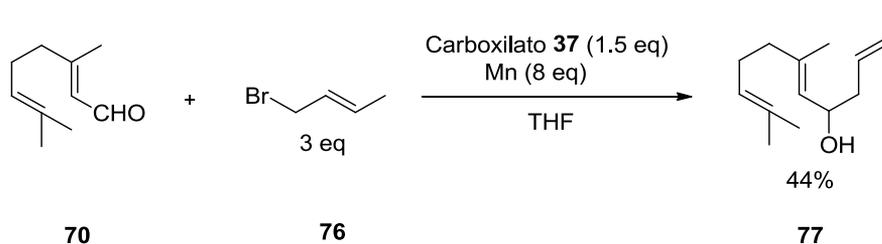
disolución de haluro, facilitando el procedimiento experimental.

Aunque en trabajos previos con Cp_2TiCl no habíamos conseguido realizar la adición de tipo α del haluro en cetonas aromáticas, pensamos que este carboxilato **37** podría mediar la reacción siguiendo el protocolo B antes descrito. Empleamos para este propósito acetofenona (**12**) obtuvimos el producto deseado con un rendimiento excelente (Esquema 134). Esta preferencia en todos los casos por el regioisómero α sugiere que estos procesos no son simples adiciones organometálicas, sino que siguen un mecanismo de tipo radicalario.



Esquema 134

Consecuentemente a estos resultados, llevamos a cabo la reacción empleando bromuro de crotilo (**67**) como pronucleófilo y un aldehído α,β -insaturado (**62**), obteniendo una relación 95:5 de regioisómeros $\alpha:\gamma$ (Esquema 135). Cabe destacar que cuando se emplea Cp_2TiCl en este tipo de procesos, la reacción es regioselectiva hacia la adición.²⁸

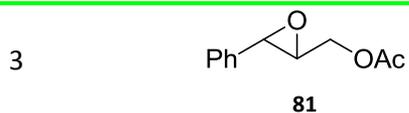
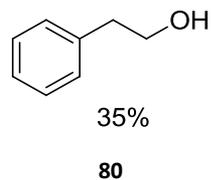
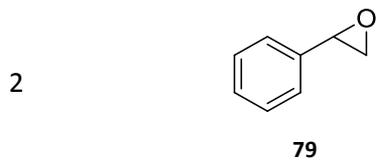


Esquema 135

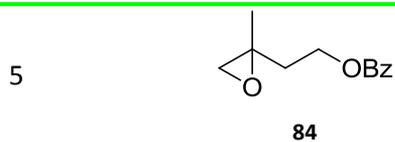
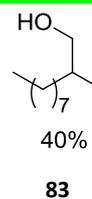
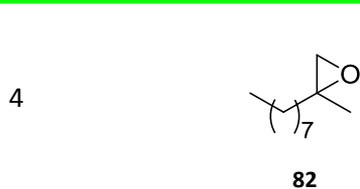
En este punto, decidimos estudiar otros tipos de reacciones habituales de la química de titanoceno(III), como es el caso de la apertura homolítica de epóxidos. Con objeto de determinar si el carboxilato **37** provoca la apertura de los anillos de oxirano tratamos distintos epóxidos con este complejo, empleando Mn como metal reductor. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

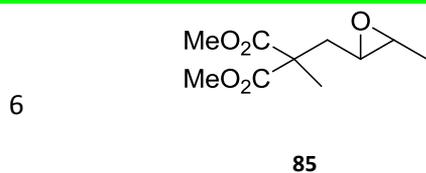
Entrada	Epóxido de partida	Producto final
1	<p>78</p>	Producto de partida inalterado



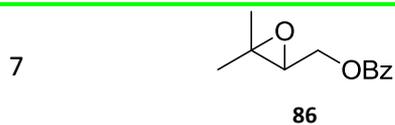
Producto de partida inalterado



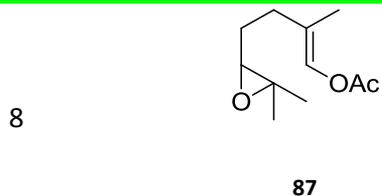
Producto de partida inalterado



Producto de partida inalterado



Producto de partida inalterado



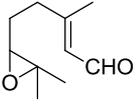
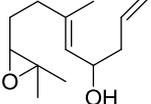
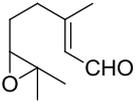
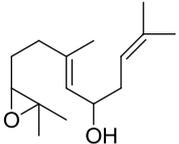
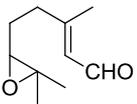
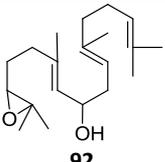
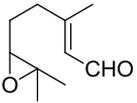
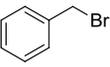
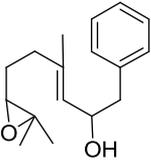
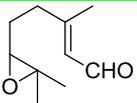
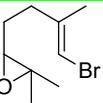
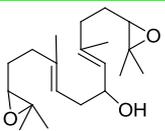
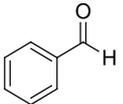
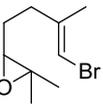
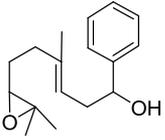
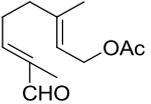
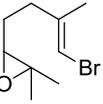
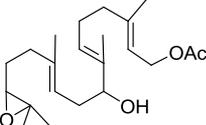
Producto de partida inalterado

En estos resultados se observan que la mayor parte de epóxidos permanecieron inalterados al reaccionar con el complejo **37** durante el tiempo de reacción establecido (6 horas). Tan sólo **80** y **83** sufrieron apertura del anillo, pero a causa de procesos catiónicos. Esta quimioselectividad no tiene precedentes en la Química del titanoceno(III), ya que el proceso de apertura de epóxidos es muy conocido y empleado.

Evaluando los resultados obtenidos hasta el momento, nos pareció muy interesante la posibilidad de llevar a cabo reacciones tipo Barbier con electrófilos y nucleófilos que presenten en sus estructuras funciones epóxido, pues la velocidad con la que se produce la reacción de Barbier es mayor que la de apertura de epóxido.

Así, preparamos el epoxialdehído **88** y el pronucleófilo epoxidado **95**, y los tratamos con distintos haluros activados (**53**, **55**, **93**), benzaldehído (**38**) y el aldehído α,β - insaturados **73**. Los resultados de las correspondientes reacciones mediadas por el carboxilato **37** se resumen en la Tabla 10, pudiendo calificarse los resultados obtenidos de excepcionales y completamente inesperados considerando la química clásica de los complejos de titanoceno(III).

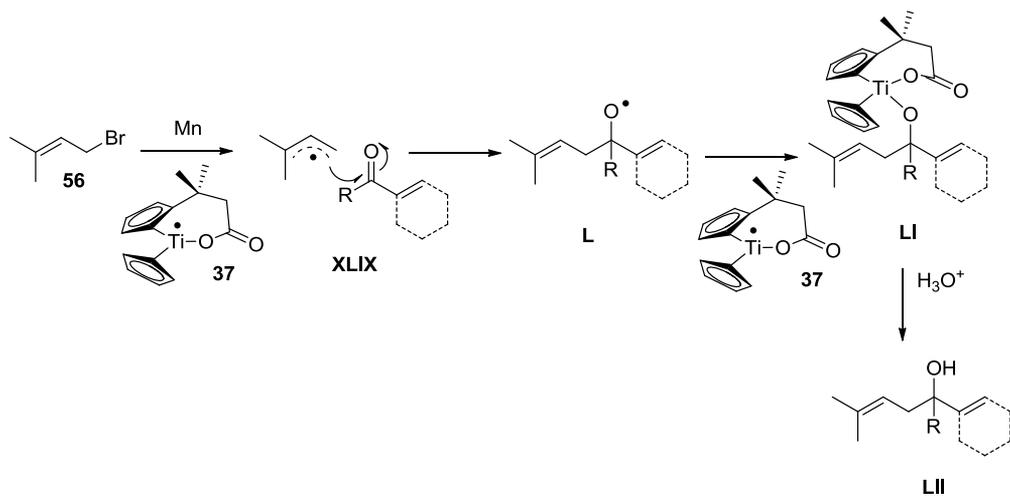
Tabla 10

Entrada	Epóxido	Haluro	Producto	Rendimiento %
1	 88	 89	 90	62
2	 88	53	 91	59
3	 88	55	 92	42
4	 88	 93	 94	63
5	 88	 95	 96	50
6	 38	 95	 97	77
7	 73	 95	 98	60

Como se puede observar, en todos los casos se obtienen los productos con α -regioselectividad con rendimientos moderados a buenos. En ningún caso se observó trazas de los productos procedentes de la apertura de los anillos de oxirano, dejando patente la selectividad del proceso. Además, los compuestos así preparados son sintones muy interesantes en la síntesis de terpenos y meroterpenos naturales. Por otra parte, esta metodología permite preparar epoxipoliprenos complejos en introduciendo un epóxido quiral, empleando los métodos de Sharpless, Shi o Jacobsen.^{12b-d} Especialmente interesante es el caso de la reacción entre los compuestos epoxidados **88** y **95**, permaneciendo en el producto final ambos anillos de oxirano.

La explicación del comportamiento quimioselectivo del carboxilato **37** aún no está clara, pues complejos similares como $\text{Cp}_2\text{TiCl}(\text{OMe})$, $\text{Cp}_2\text{TiCl}(\text{OAc})$ y $\text{Cp}_2\text{TiCl}(\text{OBz})$ presentan una quimioselectividad similar a la descrita para Cp_2TiCl . La razón de esta ausencia de reactividad frente a compuestos carbonílicos y epóxidos podría ser de naturaleza estérica, por lo que actualmente estamos realizando un estudio en profundidad de sus propiedades para justificar su quimioselectividad.

Analizando todos los resultados obtenidos, nuestra propuesta mecanística se muestra en el Esquema 136. En primer lugar tendría lugar la transferencia monoeléctronica al haluro activado, promovida por un exceso de manganeso o por el propio complejo **37** para generar el correspondiente radical alílico. La adición directa de este radical alilo **XLIX** al compuesto carbonílico genera un radical alcóxido **L** muy reactivo, que formará un intermedio **LI** para la captura por parte del carboxilato **37**. Finalmente, se obtiene el producto de adición α **LII** tras acidificación del medio de reacción.



Esquema 136

SECTION A
CHAPTER II. CONCLUSIONS

The lack of chemoselectivity towards certain functional groups is a weakness of titanium(III)-based reactions. In this sense, we demonstrated that a fine tuning of the electronic and/or steric properties of a tailor-made titanocene(III) complex could solve these drawbacks.

In this work, we studied that titanium carboxylate **37** in the presence of Mn dust yields a chemoselective titanocene(III) complex **37a** able to promote Barbier-type reactions, being compatible with activated carbonyl groups and/or epoxides.

This reactivity is unprecedented in Ti(III)-chemistry, showing the potential versatility of these complexes in organic synthesis. It is also remarkable that the Barbier reaction using prenylic halides as pronucleophiles takes place exclusively with α -selectivity, which is difficult to obtain using other methodologies.

BLOQUE B
INTRODUCCIÓN

1. FLUORESCÉINA. APLICACIONES, LIMITACIONES Y DERIVADOS

Una de las técnicas más potentes disponible en la actualidad para visualizar cómo transcurren los procesos dinámicos en el interior de células vivas, es el empleo de sondas fluorescentes moleculares. La fluoresceína (Figura 9), descubierta en el siglo XIX, continúa siendo la sonda fluorescente más empleada hoy en día debido a su gran absorptividad molar, excelente rendimiento cuántico y buena solubilidad en agua.¹²⁰

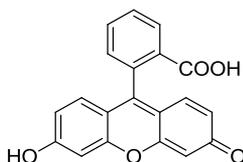


Figura 9

Esta molécula presenta su máximo de absorción a 490 nm, cercano a la línea del láser de argón (488 nm). Su máximo de emisión se observa a 514 nm y su rendimiento cuántico de fluorescencia es de 0.94, observado en disolución acuosa de NaOH 0.1 M a 22°C. En la Figura 10 se representan sus espectros normalizados de absorción (--) y emisión (--) a pH 9.¹²¹

Su elevado valor de pK_a (6.4) hace que sea muy sensible a variaciones de pH que pueden tener lugar en procesos a nivel celular. Por otra parte, es susceptible al fotoblanqueo y su permeabilidad celular es limitada.^{122,123}

¹²⁰ W. R. Orndorff, A. J. Hemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **1927**, *49*, 1272-1280.

¹²¹ *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9th ed, R. P. Haugland, Molecular Probes, Inc, Eugene, OR, USA, **2002**.

¹²² W. C. Sun, K. R. Gee, D. H. Klaubert, R. P. Haugland, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6469-6475.

¹²³ L. Song, E. J. Hennink, I. T. Young, H. H. Tanke, *Biophys. J.* **1995**, *68*, 2588-2600.

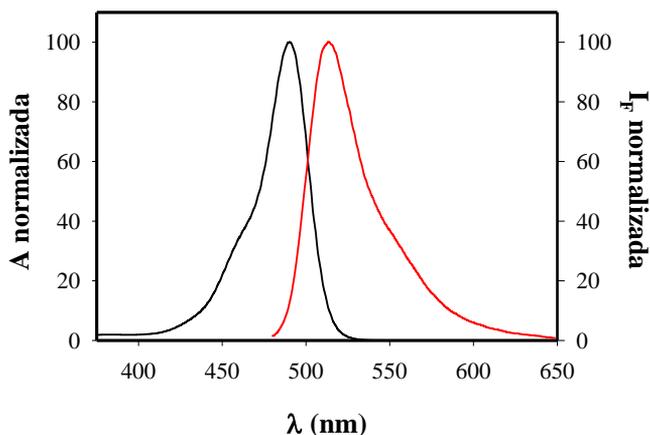


Figura 10

En disolución acuosa, dependiendo del pH, la fluoresceína puede existir en cuatro formas prototrópicas diferentes: neutro (N), catión (C), monoanión (M) y dianión (D) (Figura 11). A su vez, la forma neutra se presenta bajo tres formas tautoméricas: lactona, cetona y zwitterión.¹²⁴ Los coeficientes de extinción y los rendimientos cuánticos de fluorescencia son muy distintos para las diferentes especies prototrópicas y además, a pH cercano al fisiológico, solo tiene lugar el equilibrio monoanión-dianión, presentando ambas especies espectros de absorción y de fluorescencia diferentes. El dianión posee mayores coeficientes de extinción y rendimientos cuánticos que el monoanión y esto proporciona una gran sensibilidad de la señal fluorescente frente al pH.

La posibilidad de sintetizar la fluoresceína con un alto grado de pureza hace que se considere el fluoróforo de referencia y que sea el colorante más empleado para el etiquetado de macroestructuras de interés biológico. En este contexto, las macromoléculas etiquetadas con esta molécula se pueden detectar con elevada

¹²⁴ a) V. Zanker, W. Peter, *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 572-580; b) H. Diehl, N. Horchak-Morris, *Talanta* **1987**, *34*, 739-741.

sensibilidad, por lo que han sido muy utilizadas en combinación con técnicas de separación como la electroforesis.¹²⁵

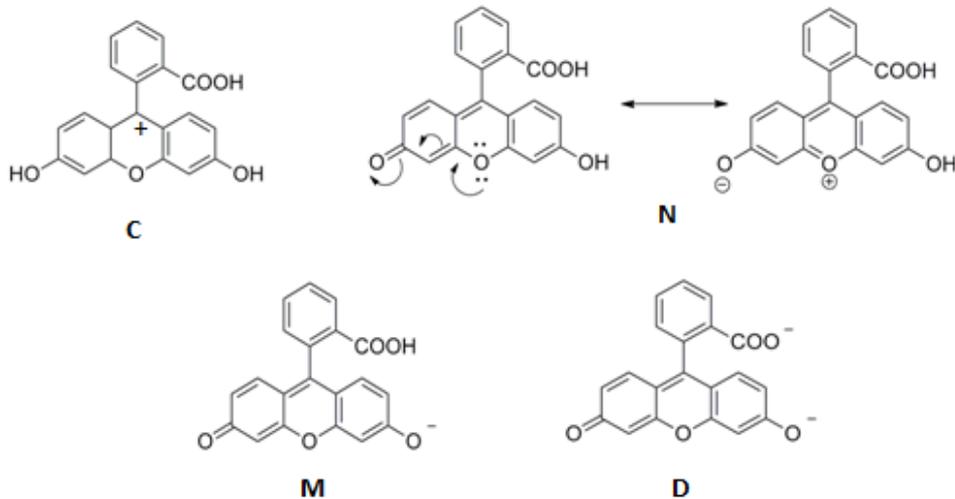


Figura 11

Donde mayor uso se hace de este fluoróforo es en las áreas de bioquímica y genética.^{126,127} Así, se ha empleado para medir distancias entre macromoléculas

¹²⁵ a) L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. H. Kent, L. E. Hood, *Nature* **1986**, *321*, 674-679; b) K. J. Ablner, K. R. Reddy, C. S. Lee, *J. Chromatogr. A* **1997**, *759*, 139-148; c) N. Chen, A. Chrambach, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 1126-1132; d) Y. Cheng, N. J. Dovivhi, *Science* **1998**, *242*, 562-564.

¹²⁶ a) A. Azadnia, R. Campbell, M. Sharma, *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 444-448; b) M. Pavalavrancic, E. Pfeifer, W. Schroder, H. Vondohren, H. Kleinkauf, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 14962-14966; c) K. Nag, S. G. Taneva, J. Perezgil, A. Cruz, K. M. Keough, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 2638-2650; d) D. Fixler, R. Tirosh, T. Zinman, A. Shainberg, M. Deutsch, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2003**, *300*, 23-28.

¹²⁷ a) P. Lorite, A. E. Aranega, F. Luque, T. Palomeque, *Heredity* **1997**, *78*, 578-582; b) J. Dreider, E. B. Breitmaier, E. Gocke, C. M. Apfel, M. G. Page, *Mutat. Res.* **2002**, *513*, 169-182.

Bloque B. Introducción

doblemente etiquetadas o en la detección de la hibridación de ADN en medios homogéneos.^{128,129}

Otras áreas científicas en las que ha encontrado aplicaciones se citan a continuación:

- Conversión de energía solar.¹³⁰
- Veterinaria.¹³¹
- Determinación de aminoácidos y estudios de proteínas.¹³²
- Neurología e investigación médica.¹³³
- Agricultura y pesticidas.¹³⁴

A continuación se explicarán las limitaciones de este compuesto fluorescente, así como algunos de sus derivados.

¹²⁸ A. I. H. Murchie, R. M. Clegg, E. Kitzing, D. R. Duckett, S. Diekmann, D. M. J. Lilley, *Nature* **1989**, 341, 763-766.

¹²⁹ a) E. M. Talavera, J. M. Álvarez-Pez, L. Ballesteros, R. Bermejo, *Appl. Spectrosc.* **1997**, 51, 401-406; b) E. M. Talavera, R. Bermejo, L. Crovetto, A. Orte, J. M. Álvarez-Pez, *Appl. Spectrosc.* **2003**, 57, 208-215.

¹³⁰ M. S. Chan, J. R. Bolton, *Solar Energ.* **1980**, 24, 561-574.

¹³¹ P. R. Somanath, K. K. Gandhi, *Amin. Reprod. Sci.* **2002**, 74, 195-205.

¹³² a) G. Nouadje, N. Simeon, F. Dedieu, M. Nertz, P. Puig, F. Couderc, *J. Chromatogr. A.* **1997**, 765, 337-343; b) G. Basañez, A. E. Shinnar, J. Zimmerberg, *FEBS Letters.* **1992**, 532, 115-120; c) B. E. Slentz, N. A. Penner, F. E. Regnier, *J. Chromatogr. A.* **2003**, 984, 97-107.

¹³³ a) F. Li, N. Omori, K. Sato, G. Jin, I. Nagano, Y. Manabe, M. Shoji, K. Abe, *Brain Res.* **2002**, 298, 83; b) K. Sriram, S. A. Benkovic, D. B. Miller, J. P. O'Callaghan, *Neuroscience.* **2002**, 135, 1335-1346; c) H. Daxecker, M. Raab, S. Markovic, A. Karimi, A. Griesmacher, M. Mueller, *Clin. Chim. Acta.* **2002**, 325, 171-175; d) K. Inoue, H. Okumara, T. Higuchi, H. Oka, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *Clin. Chim. Acta.* **2002**, 325, 157-163.

¹³⁴ a) B. Fontaniella, A. Márquez, C. W. Rodríguez, D. Piñon, M. T. Solas, C. Vicente, M. E. Legaz, *Plant Physiol. Bioch.* **2002**, 40, 881-889; b) M. R. Prater, R. M. Gogal, B. L. Blaylock, J. Longstreth, S. D. Holladay, *Food Chem. Toxicol.* **2002**, 40, 1863-1873.

▪ *Limitaciones de la fluoresceína*

El principal inconveniente que presenta es que su velocidad de fotoblanqueamiento es relativamente alta.¹³⁵ En la Figura 12 se muestran anticuerpos etiquetados con fluoresceína, observados mediante microscopía confocal. Las sucesivas imágenes se tomaron a los 0, 20, 40 y 90 segundos desde el comienzo de la iluminación de la muestra, observándose la rápida pérdida de intensidad de fluorescencia.¹²¹

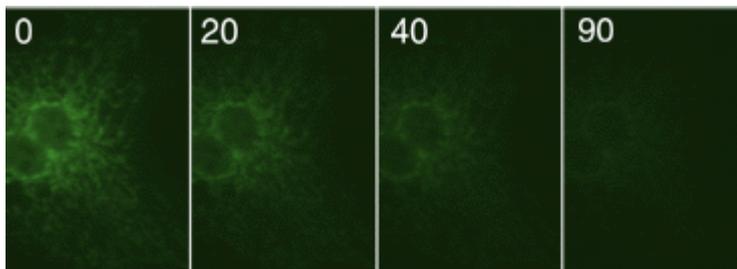


Figura 12

Otro problema que presenta es que su fluorescencia depende del pH del medio en los valores cercanos a la neutralidad, pues la intensidad fluorescente se reduce significativamente por debajo del valor de pH 7.^{136,137} Sin embargo, esta dependencia con el pH ha sido explotada utilizándose como sonda de pH intracelular.

¹³⁵ L. Song, C. A. G. O. Varma, J. W. Verhoeven, H. Tanke, *Biophys. J.* **1996**, *70*, 2959-2968.

¹³⁶ a) J. Yguerabide, E. M. Talavera, J. M. Alvarez, B. Quintero, *Photochem. Photobiol.* **1994**, *60*, 435-441; b) R. Sjöbak, J. Nygren, M. Kubista, *Spectrochim. Acta A.* **1995**, *51*, L7-L21.

¹³⁷ J. M. Alvarez-Pez, L. Ballesteros, E. M. Talavera, J. Yguerabide, *J. Phys. Chem. A.* **2001**, *105*, 6320-6332.

Bloque B. Introducción

El empleo de la fluoresceína en microscopía confocal multicolor se ve limitada porque su espectro de emisión de fluorescencia es relativamente ancho.

Por otro lado, la fluorescencia de este compuesto y de algunos de sus derivados conocidos se reduce alrededor de un 50% con la conjugación a biopolímeros (Figura 13).¹²¹ Además, mayores grados de sustitución en la macromolécula no mejoran esta propiedad, ya que la proximidad entre los fluoróforos origina un sensible quenching de fluorescencia.^{138,129}

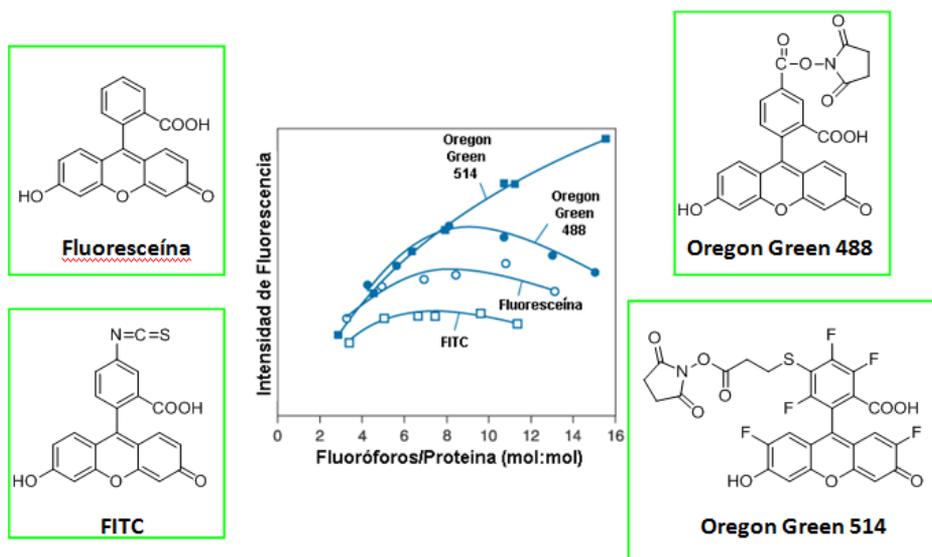


Figura 13

Otra cuestión importante es que la fluoresceína presenta un decaimiento biexponencial alrededor del pH fisiológico, dificultando su aplicación en técnicas basadas en la medida de los tiempos de decaimiento de los colorantes, como es el

¹³⁸ a) R. F. Zuk, G. L. Rowley, E. F. Ullman, *Clin. Chem.* **1979**, 25, 1554-1560; b) R. F. Chen, J. R. Knutson, *Anal. Biochem.* **1988**, 172, 61-67; c) M. R. Chapple, G. D. Johnson, R. S. Davidson, *J. Microsc.* **1990**, 159, 254-261.

caso de la microscopía de imágenes de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM). En la Figura 14 se muestran los tiempos de decaimiento a pH alrededor de 7, regulado con tampón de fosfatos 1 mM. A partir de un valor de pH de 7.70 se recupera un único tiempo de vida.¹³⁷

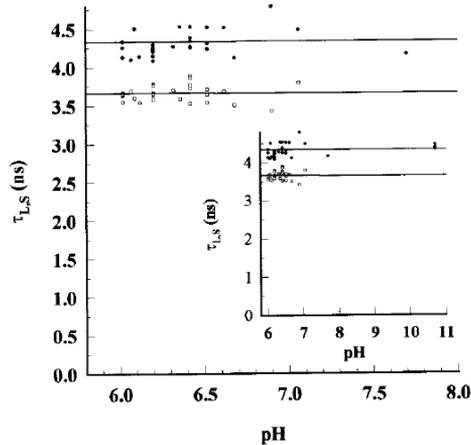


Figura 14

- *Derivados de la fluoresceína*

A lo largo de los años, se han sintetizado diversos derivados de la fluoresceína, encontrando interesantes aplicaciones en distintos campos. Algunos ejemplos de derivados empleados en el etiquetado de macromoléculas, citología e inmunohistoquímica son el isotiocianato de fluoresceína (**LIII**), los ésteres succinimídicos de la carboxifluoresceína (**LIV**) y la 5-iodoacetamidofluoresceína (**LV**) (Figura 15). Estos fluoróforos se unen directamente a la molécula a etiquetar mediante reacción química, pero presentan los mismos inconvenientes que la fluoresceína.

Bloque B. Introducción

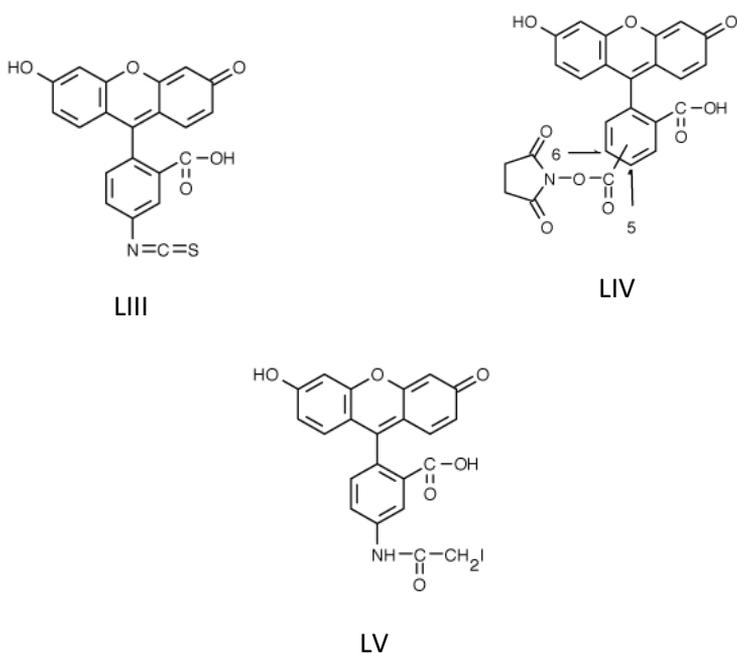


Figura 15

El isotiocianato de fluoresceína **LIII** se ha empleado para el estudio de la hibridación de ácidos nucleicos y en la separación mediante electroforesis capilar de péptidos y aminoácidos.^{129,139} También se ha llevado a cabo la detección de proteínas en gel y en membranas de nitrocelulosa y se ha conseguido un seguimiento del ensamblaje entre distintas subunidades de una proteína, aprovechando la transferencia de energía entre las moléculas fluorescentes.¹⁴⁰

¹³⁹ a) R. W. Dirks, R. P. Van Gilswijk, R. H. Tullis, A. B. Smith, J. Van Minnen, M. Van der Ploeg, A. K. Raap, *J. Histochem. Cytochem.* **1990**, *38*, 467; b) S. Wu, N. J. Dovichi, *Chromatogr.* **1989**, *480*, 141-155.

¹⁴⁰ a) J. C. Vera, C. I. Rivas, P. A. Cortes, J. O. Carcamo, J. Delgado, *Anal. Biotechnol.* **1988**, *174*, 38-45; b) B. Houston, D. Peddie, *Anal. Biochem.* **1989**, *177*, 263-267; c) P. J. Sims, *Biochemistry* **1984**, *23*, 3248-3260.

La ventaja de emplear ésteres succinimídicos de fluoresceína como etiquetadores es la introducción de brazos espaciadores hidrofóbicos que separan el fluoróforo de la macromolécula etiquetada pues permiten una mejor detección secundaria del fluoróforo conjugado, por ejemplo a través de anticuerpos específicos.¹⁴¹

Un gran avance en este campo fue la síntesis de derivados halogenados, pues las moléculas presentan características especiales que las diferencian de la fluoresceína: tras la absorción de luz, sufren un cruzamiento entre sistemas desde el estado excitado singlete hacia el estado triplete. Así, sus rendimientos cuánticos de fluorescencia son inferiores, pero se pueden emplear eficazmente como sensibilizadores de oxígeno singlete y en la medida de las propiedades rotacionales de proteínas, membranas y otras biomoléculas en disolución mediante medidas de anisotropía de fosforescencia.^{142,143}

Dentro de este grupo se encuentra la 2',7'-diclorofluoresceína (Figura 16). La cloración de la fluoresceína va acompañada por un desplazamiento batocrómico de unos 10 nm tanto en los espectros de absorción como en emisión.¹²¹ A principios de los años 70, Leonhardt y colaboradores estudiaron las características fundamentales de este compuesto, comparándolo con la fluoresceína. Mediante un método gráfico, determinaron tres constantes en estado fundamental para los equilibrios ácido-base ($pK_1 = 0.47$, $pK_2 = 3.50$ y $pK_3 = 4.95$), observando cómo el efecto de la

¹⁴¹ K. Kimura, Y. Arata, T. Yasuda, K. Jr. Kinoshita, M. Nakanishi, *Biochem. Biophys. Acta.* **1992**, *1104*, 9-14.

¹⁴² a) D. C. Neckers, *J. Photochem. Photobiol. A.* **1989**, *47*, 1; b) S. M. Linden, D. C. Neckers, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1257-1262.

¹⁴³ a) R. D. Ludescher, *Spectroscopy* **1990**, *5*, 20-31; b) R. A. Stein, R. D. Ludescher, P. S. Dahlberg, P. G. Fajer, R. L. Bennett, D. D. Thomas, *Biochemistry.* **1990**, *29*, 10023-10031; c) E. D. Matayoshi, W. H. Sawyer, T. M. Jovin, *Biochemistry.* **1991**, *30*, 3550-3458.

Bloque B. Introducción

electronegatividad de los sustituyentes aporta más polaridad a la molécula, disminuyendo los valores de pK_a con respecto a los de fluoresceína.¹⁴⁴

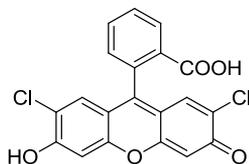


Figura 16

Este compuesto se ha utilizado en la detección de los cambios de concentración de H_2O_2 intracelular producido por la generación endotelial de oxígeno activo, posible signo de varias alteraciones patológicas.^{145,146} Esta aplicación se ha desarrollado ampliamente y, en la actualidad, la 2',7'-diclorofluoresceína es un indicador esencial en el estudio de oxígeno reactivo *in vivo* o estrés oxidativo entre otros.¹⁴⁷

La medida del valor de pH de ciertos orgánulos celulares también se realiza a través de la 2',7'-diclorofluoresceína. Debido a sus valores de pK_a , la zona de mayor dependencia de la absorción y emisión del fluoróforo con el pH es precisamente el intervalo de acidez moderada. Estos orgánulos celulares de pH ácido tienen diversas funciones dentro de la célula: pueden activar enzimas y funciones proteicas, que serían demasiado lentas a pH neutro, favoreciendo así el metabolismo celular. Hay

¹⁴⁴ H. Leonhardt, L. Gordon, T. Livingston, *J. Phys. Chem.* **1971**, 75, 245-249.

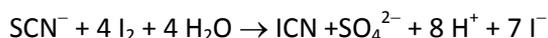
¹⁴⁵ J. A. Royall, H. Ischiropoulos, *Arch. Biochem, Biophys.* **1993**, 302, 348-355.

¹⁴⁶ a) B. A. Freeman, G. M. Rosen, M. J. Barber, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 6590-6593; b) K. L. Brigham, B. Meyrick, L. C. Berry, J. E. Repine, *J. Al. Physiol.* **1987**, 63, 840-850; c) M. B. Grisham, *J. Al. Physiol.* **1989**, 257, H1640-H1646.

¹⁴⁷ C. F. Chignell, R. H. Sik, *Free Rad. Biol. Med.* **2003**, 34, 1029-1034.

que resaltar que el pH anormalmente bajo en lisosomas se ha relacionado con determinadas patologías, por ejemplo en algunas células tumorales.¹⁴⁸

Otras aplicaciones de este fluoróforo pueden ser la quimioluminiscencia en sistemas de determinación por inyección en flujo, por ejemplo para hidracina y sulfuros,¹⁴⁹ o el método fluorimétrico para la determinación de tiocianato desarrollado por Gong y Gong, que se basa en la formación de una especie poco fluorescente entre el I₂ y la 2',7'-diclorofluoresceína.¹⁵⁰ Cuando se añade el ión tiocianato ocurre la siguiente reacción (Esquema 137):



Esquema 137

Al reaccionar el I₂, se libera la 2',7'-diclorofluoresceína del complejo formado, con el consecuente aumento de la intensidad fluorescente de la mezcla, de manera que puede relacionarse fácilmente la cantidad de SCN⁻ presente con la fluorescencia de la disolución. Estos autores aplicaron este método a la determinación de SCN⁻ en suero y en saliva, para la identificación de fumadores y no fumadores.¹⁵¹

También se han descrito ésteres succinimídicos de derivados clorados de fluoresceína que muestran un amplio desplazamiento batocrómico en sus espectros de absorción y emisión conforme aumenta la sustitución (Figura 17).¹²¹ Se han

¹⁴⁸ P. Montcourrier, P. H. Mangeat, C. Valembois, G. Salazar, A. Sahuquet, C. Duperray, H. Rochefort, *J. Cell. Sci.* **1994**, *107*, 2381-2391.

¹⁴⁹ a) A. Safivi, M. R. Baezzat, *Anal. Chim. Acta.* **1998**, *358*, 121-129; b) A. Safivi, M. A. Karimi, *Talanta.* **2002**, *57*, 491.

¹⁵⁰ B. Gong, G. Gong, *Anal. Chim. Acta.* **1999**, *394*, 171-175.

¹⁵¹ X. H. Cai, Z. F. Zhao, *Anal. Chim. Acta.* **1988**, *212*, 43.

Bloque B. Introducción

utilizado en secuenciado de ADN, en patología y medicina forense o como sondas de hibridación por transferencia de energía.¹⁵²

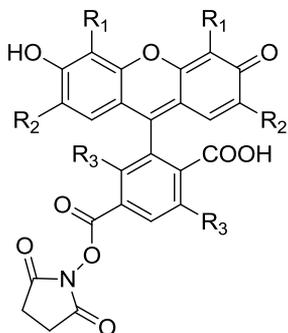


Figura 17

	R ¹	R ²	R ³
6-carboxi-4',5'-dicloro-2'7'-dimetoxifluoresceína	Cl	OCH ₃	H
6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína	Cl	Cl	Cl
6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína	H	Cl	Cl

Por tanto, existe una gran variedad de derivados de la fluoresceína con aplicaciones en distintos campos. Recientemente se han descrito nuevos derivados, como los denominados “Tokyo Green”, cuyas propiedades fotoquímicas se explicarán más adelante.¹⁵³

¹⁵² a) A. K. Lindqvist, P. K. Magnusson, J. Balciuniene, C. Wadelius, E. Lindholm, M. E. Alarcon-Riquelme, U. B. Gyllensten, *Genome. Res.* **1996**, *6*, 1170-1176; b) R. Poltl, C. Luckenbach, R. Fimmers, H. Ritter, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2871-2873; c) J. S. Sevall, *Mol. Cell. Probes.* **2000**, *14*, 249-253.

¹⁵³ Y. Urano, M. Kamiya, K. Kanda, T. Ueno, K. Hirose, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4888-4894.

2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL: CONTAJE DE FOTONES INDIVIDUALES CORRELACIONADOS EN EL TIEMPO

La técnica del conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TSCPC), desarrollada entre los años 60 y 70, consiste en determinar el tiempo que tardan los fotones emitidos por la muestra en llegar al detector tras la excitación por el pulso de luz. A continuación se explica esta técnica con más detalle:¹⁵⁴

Inicialmente, la muestra fluorescente se excita repetidamente por pulsos rápidos de luz con una determinada frecuencia, estando cada pulso monitorizado por un fotodiodo o fototubo de alta velocidad de respuesta, produciendo una señal denominada START. Esta señal provoca un incremento de voltaje que aumenta de forma lineal con el tiempo. El voltaje se detiene cuando se detecta el primer fotón emitido por la muestra (señal STOP), y así, su valor final es directamente proporcional al tiempo entre las señales START y STOP. En el caso en el que no se detecte el fotón, el voltaje alcanza un nivel máximo y vuelve a cero a la espera de la siguiente señal START.

El dispositivo fundamental en un instrumento de TCSPC es la electrónica integrada en las tarjetas de control insertadas en un ordenador, que realiza las siguientes funciones: convertidor tiempo-amplitud (TAC), analizador multicanal (MCA) y un discriminador de fracción constante (CFD). El proceso de adquisición se alarga durante varios miles de pulsos, y el MCA construye un histograma de probabilidad de cuentas frente a canales de tiempo. La duración del experimento se extiende hasta conseguirse un número adecuado de cuentas (suele ser usual recoger histogramas de al menos 10,000 cuentas en el canal del máximo, aunque según las necesidades, puede ser necesario un número aún mayor).

¹⁵⁴ L. M. Bollinger, G. E. Thomas, *Rev. Sci. Ins.* **1961**, 32, 1044-1051.

Bloque B. Introducción

A la vista de este funcionamiento, se deduce que la velocidad con la que aumenta el voltaje y la velocidad de reseteo del mismo son factores limitantes en la respuesta temporal del instrumento. El modo estándar de funcionamiento es suficiente cuando las frecuencias de repetición de los pulsos son bajas, como las proporcionadas por fuentes de excitación como lámparas de flash. Cuando las frecuencias de repetición son mayores, como las que producen láseres pulsados, el TAC se satura por una llegada masiva de señales START al fotodiodo “disparador” antes del retorno al voltaje nulo.

La solución a este problema es que el TAC opere en modo reverso. En esta modalidad, el primer fotón emitido y detectado proporciona la señal START y la señal de pulso siguiente detectada funcionará como señal STOP. De esta forma, el aumento de voltaje solo se activa si el fotón emitido es detectado. En el resto de pulsos, cuando el fotón emitido no se detecta, el TAC permanece inactivo y por tanto no se satura.¹⁵⁵

Para trabajar en el modo de conteo de fotones individuales la emisión fluorescente debe ser atenuada, de forma que únicamente un 0.5% de la radiación excitatriz produzca una señal sensible en el detector. Bajo estas condiciones, se puede asegurar que la señal recogida en el detector corresponde a un fotón individual (más o menos un único fotón detectado cada 100 pulsos de la fuente). Asimismo, el histograma producido en el MCA se corresponde con el decaimiento de intensidad de fluorescencia de la muestra, aunque convolucionado con el perfil del pulso excitatriz.

¹⁵⁵ a) L. E. Bowman, K. A. Berglund, D. G. Nocera, *Rev. Sci. Instrum.* **1993**, *64*, 338-346; b) M. Maus, E. Rousseau, M. Cotlet, G. Schweitzer, J. Hofkens, M. J. Van der Auweraer, F. C. De Schryver, *Rev. Sci. Instrum.* **2001**, *72*, 36.

El desarrollo de dispositivos específicos para esta técnica, tales como láseres, detectores de platos multicanales, amplificadores de fracción constante, discriminadores, materiales ópticos no lineales, etc., hacen posible la determinación de tiempos de vida de picosegundos. El grupo de Boens refinó la técnica TCSPC para obtener tiempos de decaimiento de fluorescencia en la escala del picosegundo con elevada fiabilidad.¹⁵⁶

Por otro lado, el alto error asociado a la técnica en tiempos cortos se solventa con la mejora de los dispositivos instrumentales y las nuevas aportaciones metodológicas que proporcionan cada vez mayor resolución temporal, como el método de convolución de la función delta.¹⁵⁷

¹⁵⁶ N. Boens, N. Tamai, I. Yamazaki, *Photobiol. Photochem.* **1990**, *52*, 911-917.

¹⁵⁷ J. Karolczak, D. Komar, J. Kubicki, T. Wrózowa, K. Dobek, B. Ciesielska, A. Maciejewski, *Chem. Phys. Letter.* **2001**, *344*, 154-164.

2.1. Fuentes de luz y detectores para instrumentos de TCSPC

Con objeto de excitar gran variedad de muestras y describir posibles dependencias con la longitud de onda de excitación, la fuente excitatriz debería abarcar un amplio intervalo espectral. Ejemplos de fuentes de excitación son las lámparas de flash o la radiación procedente de un sincrotrón.^{158,137,159} Sin embargo, ambas poseen el problema de anchuras de pulso relativamente grandes, alrededor de algunos cientos de picosegundos. Esto limita extremadamente la resolución temporal de los experimentos de TCSPC llevados a cabo.

Por otro lado, el desarrollo de nuevas fuentes de luz como los láseres de estado sólido sintonizables o los láseres de colorantes con bombeo sincrónico, ha proporcionado grandes avances como buena resolución temporal, frecuencias de pulso ajustables y alta estabilidad con el tiempo; pero por otro lado presentan problemas como la región limitada de longitudes de onda o el requerimiento de cambiar el colorante del láser, con el consumo de tiempo que ello conlleva.

La aparición durante la década de los noventa de materiales no lineales mucho más resistentes al deterioro abrió el camino al desarrollo de amplificadores y osciladores paramétricos ópticos. Estos dispositivos han demostrado ser herramientas muy fiables e importantes para conseguir mayores intervalos de longitudes de onda en láseres ultra-rápidos de alta calidad.^{160,161,162}

¹⁵⁸ D. J. S. Birch, R. E. Imhof, *Rev. Sci. Instrum.* **1981**, *52*, 1026-1212.

¹⁵⁹ W. R. Laws, J. C. Sutherland, *Photochem. Photobiol.* **1986**, *444*,434.

¹⁶⁰ a) C. L. Tang, W. R. Rosenberg, T. Ukachi, R. J. Lane, L. K. Cheng, *Laser Focus World* **1990**, *26*, 107; b) A. Fix, T. Schröder, R. Wallestein, *Laser Optoelektronik* **1991**, *23*, 106-110.

¹⁶¹ a) V. Petrov, F. Seifert, F. Noack, *Al. Phys. Lett.* **1994**,*65*, 268-271; b) G. Schweitzer, L. Xu, B. Craig, F. C. De Schryver, *Opt. Commun.* **1994**, *142*, 283-288.

¹⁶² a) K. Laenen, A. Laubereau, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 1553-1555; b) A. Robertson, M. E. Klein, M. A. Tremont, K. J. Boller, R. Wallestein, *Opt. Lett.* **2000**, *25*, 657- 659.

Uno de los factores críticos en estos instrumentos es el sistema de detección, tanto en la línea de señal START como en la línea STOP. Las características de respuesta de los detectores definen el perfil instrumental, modificando la anchura de los pulsos, y por tanto, la resolución temporal de los experimentos. Los tres tipos de detectores más empleados son fototubos de dínodos en cadena, fototubos de platos microcanales y fotodiodos.

La utilización de detectores multicanal (varias líneas de detección simultánea) aumenta la velocidad de adquisición de decaimientos al poder aumentar el número de fotones detectados, evitando la llegada al detector de más de un fotón que distorsionarían los valores adquiridos.

2.2. Integral de convolución. Análisis de los decaimientos

Los histogramas que proporciona el instrumento son una convolución de la función de respuesta al impulso (ley del decaimiento) con la función de respuesta instrumental (función de la lámpara).

La función de respuesta al impulso, $I(t)$, es la que se observaría si la muestra fuese excitada con un pulso infinitamente corto δ . Sin embargo, los pulsos de las fuentes existentes tienen una determinada anchura. Así, puede considerarse el pulso excitatriz como una serie de pulsos δ con diferentes amplitudes, que van a producir diferentes respuestas. El histograma medido sería la suma de todas estas funciones respuesta. Esta suma viene expresada por la llamada integral de convolución (Ecuación 1):

$$F(t) = \int_0^t I(t-t')D(t')dt' \quad \text{Ecuación 1}$$

El decaimiento medido experimentalmente es $F(t)$, la función de respuesta instrumental es $D(t')$, mientras que $I(t)$ es la ley de decaimiento.

El perfil instrumental se obtiene mediante suspensión dispersora de luz, recogiendo la emisión a la misma longitud de onda que la excitación. Se pueden utilizar dispersores como sílica coloidal, sulfato de bario, partículas de oro, glucógeno o leche.

En lo referente a las leyes de decaimientos posibles, las más empleadas para describir comportamientos usuales de las muestras fluorescentes son los

multiexponenciales, distribuciones de tiempos de vida, exponenciales extendidos y efectos transitorios.

- *Decaimientos multiexponenciales*

Se presentan en mezclas de fluoróforos independientes, en el caso de un único fluoróforo con decaimiento complejo y en algunos procesos en el estado excitado (Ecuación 2).

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad \text{Ecuación 2}$$

- *Distribuciones de tiempos de vida*

Pueden describir comportamientos de fluoróforos en mezclas de disolventes con distintos ambientes (Ecuación 3).

$$I(t) = \int_{\tau=0}^{\infty} \alpha(\tau) e^{-t/\tau} d\tau \quad \text{Ecuación 3}$$

- *Exponenciales extendidos*

Similares a las distribuciones de tiempos de vida, pero en este caso, β se relaciona con la distribución de tiempos. Esta ley se encuentra en ocasiones en estudios sobre polímeros (Ecuación 4).

Bloque B. Introducción

$$I(t) = I_0 \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta\right] \text{ Ecuación 4}$$

- *Efectos transitorios*

Se trata de decaimientos no exponenciales debido a fenómenos que suceden justo tras la excitación (Ecuación 5). Ejemplos son el quencheo colisional, la transferencia resonante de energía o la recombinación de los protones con la base excitada tras la desprotonación de un fotoácido.

$$I(t) = I_0 \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau}\right) - 2bt^{1/2}\right] \text{ Ecuación 5}$$

El método de análisis no lineal por mínimos cuadrados sigue empleándose como el más general y fiable para el análisis de los datos con resolución temporal, aunque en la actualidad también se emplea el método de la máxima entropía.¹⁶³

¹⁶³ J. C. Bronchon, *Methods Enzymol.* **1994**, *240*, 262-265.

3. REACCIONES DE TRANSFERENCIA PROTÓNICA EN EL ESTADO EXCITADO

Las reacciones de transferencia protónica en el estado fundamental, es decir, los equilibrios ácido-base, son procesos de conocida importancia en química. Sin embargo, las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado (ESPT) ocupan un apartado más restringido, sobre todo en el ámbito de la fotoquímica, aunque tienen gran interés tanto en química fundamental como aplicada.

Las primeras investigaciones sobre el comportamiento ácido-base en el estado excitado se deben a Weber, quien observó que la zona de inflexión en la curva de valoración ácido-base de determinadas moléculas orgánicas dependía de si los datos experimentales se recogían mediante emisión o por absorción.¹⁶⁴ Más tarde, Förster investigó este fenómeno proponiendo un método para estimar el valor de pK_a en el estado excitado (pK_a^*) basado en el pK_a del estado fundamental y el valor de los máximos de los espectros de absorción y emisión de la molécula. Este método, denominado el ciclo de Förster, suele emplearse en la actualidad para obtener una estimación aproximada de estas constantes en el estado excitado.¹⁶⁵

En la Ecuación 6, $\bar{\nu}_B$ y $\bar{\nu}_{BH}$ son los números de onda de la transición $0 \rightarrow 0$ de la base y el ácido respectivamente, y T la temperatura en grados Kelvin.

$$pK_a^* = pK_a + \frac{0.625}{T} (\bar{\nu}_B - \bar{\nu}_{BH})$$

Ecuación 6

¹⁶⁴ K. Z. Weber, *Phys. Chem.* **1931**, B15, 18-25.

¹⁶⁵ T. Förster. *Z. Elektrochem.* **1950**, 54, 42.

Bloque B. Introducción

Años más tarde, Weller encontró en el salicilato de metilo un desplazamiento de Stokes inusualmente grande en el espectro de emisión. La protonación del grupo fenólico provoca que el espectro de emisión se convierta en imagen especular del espectro de absorción. Propuso que el desplazamiento hacia el rojo en el espectro de fluorescencia se debía a un isómero formado en el estado excitado por transferencia protónica. A partir de este trabajo, las reacciones ESPT intramoleculares han sido extensamente estudiadas.¹⁶⁶

El propio Weller realizó una revisión sobre las reacciones ESPT intramoleculares, extendiendo el interés en el estudio de estos procesos.¹⁶⁷ Existen revisiones sobre ESPT intermoleculares, en base a las teorías de transferencia de carga y resonancia y también tratando las aplicaciones analíticas de estas reacciones.¹⁶⁸

El principal problema del método de Weller es que, por un lado supone que el equilibrio ha de alcanzarse en el estado excitado, y por otro, que los tiempos de vida del par ácido-base excitados deben ser idénticos. De ahí que las ecuaciones de Weller necesiten ser modificadas en ciertas situaciones.^{169,170}

A finales de los años 70 se empezó a desarrollar una técnica relacionada con las reacciones ESPT: los saltos de valor de pH inducidos por un láser. Consiste en la creación, mediante pulsos láser muy intensos, de una población alta de moléculas en estados excitados que sufren rápidas protonaciones o desprotonaciones mediante

¹⁶⁶ A. Weller, *Naturwiss.* **1955**, *42*, 175-176.

¹⁶⁷ A. Weller, *Prog. React. Kinet.* **1961**, *1*, 189-214.

¹⁶⁸ a) E. Vander Donckt, *Prog. React. Kinet.* **1970**, *5*, 273-288; b) S. G. Schulman, J. D. Winefordner, *Talanta.* **1970**, *17*, 607-616.

¹⁶⁹ A. Samantha, N. Chattopadhyay, D. Nath, T. Kundu, M. Chowdhury, *Chem. Phys. Lett.* **1985**, *121*, 507-512.

¹⁷⁰ a) S. G. Schulman, B. S. Vogt, *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 2074-2079; b) N. J. Chattopadhyay, *J. Photochem. Photobiol. A.* **1995**, *88*, 105-108; c) R. Yang, S. G. Schulman, *J. Fluoresc.* **2003**, *13*, 89-93.

ESPT, proporcionando una variación rápida del valor de pH de un medio. Estos saltos pueden emplearse como iniciadores de ciertas reacciones en el estado fundamental.¹⁷¹ La acidificación local mediante ESPT también es un procedimiento que sigue empleándose en la actualidad para comprobar su efecto en proteínas, a través de derivados del 2-naftol unidos a éstas.¹⁷²

Los procesos ESPT están asociados a grandes desplazamientos de Stokes, fotoestabilidad, altos rendimientos cuánticos y efectividad en inversiones de población, lo que los hace útiles en el diseño de láseres de colorantes.¹⁷³

Otro aspecto interesante de las reacciones ESPT se encuentra en moléculas cuya desprotonación en el estado excitado es muy rápida. En estas moléculas, el control por difusión de la desprotonación puede hacer que se produzca una reprotonación inmediata y procesos transitorios, que afectan notablemente las constantes cinéticas de la ESPT con el tiempo y los decaimientos no exponenciales de fotoácidos.¹⁷⁴ Estos efectos son sobre todo notables en fotoácidos muy fuertes, y en disolventes con viscosidades apreciables. En este sentido se estudiaron derivados

¹⁷¹a) A. J. Campillo, J. H. Clarck, S. L. Shapiro, K. R. Winn, *Springer Ser. Chem. Phys.* **1978**, *4*, 319-321; b) J. H. Clarck, S. L. Shapiro, A. J. Campillo, K. R. Winn, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 746-748.

¹⁷²a) A. Jankowski, P. Stefanowicz, *J. Photochem. Photobiol. A.* **1994**, *84*, 143-149; b) A. Jankowski, P. Stefanowicz, T. Janiak, *J. Photochem. Photobiol. A.* **1995**, *85*, 69-75.

¹⁷³a) M. Kasha, *J. Chem. Soc. Faraday Trans 2.* **1986**, *82*, 2379-2392; b) P. Chou, D. McMorrow, T. J. Aartsma, M. Kasha, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4596-4599; c) A. U. Acuña, F. Amat, J. Catalán, A. Costela, J. M. Figuera, J. M. Muñoz, *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *132*, 567-569; d) A. U. Acuña, F. Amat-Guerri, J. Catalán, A. Costela, A. Dhoul, J. M. Figuera, F. Florido, R. Sastre, *Chem. Phys. Lett.* **1991**, *187*, 98-100; e) A. U. Acuña, A. Costela, J. M. Muñoz, *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 2807-2808; f) D. A. Parthenopoulos, D. McMorrow, M. Kasha, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 2668-2674; g) B. M. Uzhinov, S. I. Druzhinin, *Usp. Khim.* **1998**, *67*, 140-154.

¹⁷⁴a) E. Pines, D. Huppert, *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *126*, 88-90; b) E. Pines, D. Huppert, *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 5620-5622; c) E. Pines, D. Huppert, *J. Chem. Phys.* **1986**, *84*, 3576-3577; d) N. Agmon, *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 5639-5642.

Bloque B. Introducción

del 1- y 2-naftol, observando que sustituyentes muy electronegativos convierten la molécula en un fotoácido más fuerte.¹⁷⁵

Las ESPT también han sido empleadas como sondas estructurales de medios microheterogéneos, sondas para estudiar cambios conformacionales y estructurales de macromoléculas cuando el fluoróforo se emplea como etiqueta fluorescente o en la detección de cambios de fase en liposomas.^{172b,176}

Otra característica estudiada en estas reacciones es el efecto de los electrolitos sobre su cinética. De forma general, se ha observado que las velocidades de la reacción ESPT, cuando el agua es el aceptor de protones, descienden en presencia de electrolitos. La mayoría de las interpretaciones de estos estudios presentan la necesidad de un aceptor protónico. Huppert y colaboradores sugirieron que este descenso en la velocidad en la ESPT se debe principalmente a una disminución de las moléculas de agua libres necesarias para hidratar los iones H_3O^+ creados por la disociación en el estado excitado, ya que estarían hidratando a los iones de los electrolitos presentes.¹⁷⁷

Para ácidos muy fuertes en su estado excitado ($pK_a^* < 0$) se han propuesto especies dímeras de agua como aceptores protónicos efectivos. En este tipo de fotoácidos, la desprotonación y la reorientación del disolvente suceden a velocidades comparables, y aquello que afecte a la estructura local del disolvente

¹⁷⁵ a) I. Carmeli, D. Huppert, L. M. Tolbert, J. E. Haubrich, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *260*, 109-110; b) K. M. Solntsev, D. Huppert, N. Agmon, L. M. Tolbert, *J. Phys. Chem. A.* **1999**, *103*, 6984-6997.

¹⁷⁶ a) A. Jankowski, P. Stefanowicz, P. Dobryszcki, *J. Photochem. Photobiol. A.* **1992**, *69*, 57-66; b) A. Jankowski, P. Dobryszcki, J. Lipiski, P. Stefanowicz, *J. Fluoresc.* **1998**, *8*, 103-113; c) J. Sujatha, A. K. Mishra, *J. Fluoresc.* **1997**, *7*, 189-196; d) L. M. Davenport, J. R. Knutson, L. Brand, *Biochemistry* **1986**, *25*, 1186-1195.

¹⁷⁷ D. Huppert, E. Kolodney, M. Gutman, E. Nachliel, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6949-6953.

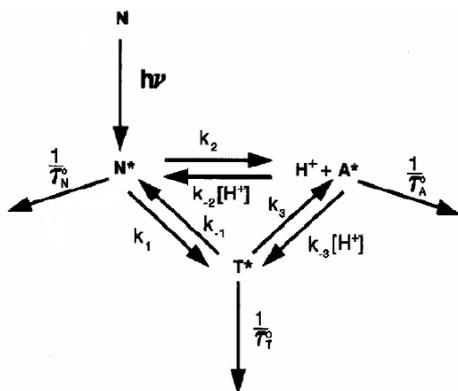
alterará la cinética de la ESPT.¹⁷⁸ En este contexto, Htun y colaboradores encontraron que la presencia de CaCl_2 en mezclas metanol/agua produce un incremento en la velocidad de la reacción ESPT del 4-hidroxi-1-naftalensulfonato hasta una concentración 0.1 M, mientras que disminuye por encima de esa concentración de electrolito.¹⁷⁹ No obstante, la influencia de electrolitos en las cinéticas de las ESPT sigue presentando en la actualidad bastantes ambigüedades y contradicciones.

El avance en los instrumentos de medida con resolución temporal y las herramientas informáticas han permitido detectar decaimientos triexponenciales o discriminar entre tiempos de decaimiento similares. Así, comenzaron a plantearse esquemas cinéticos en tres y cuatro especies excitadas. Seixas de Melo y Maçanita plantearon un método general de resolución del “triángulo fotocinético” (Esquema 138). Inicialmente lo aplicaron a la especie neutra del 7-hidroxi-4-metilcumarina, a su tautómero formado en estado excitado, y a la especie aniónica. El método de solución general del sistema suponía el empleo como dato adicional del tiempo de decaimiento y las razones de sus pre-exponenciales. Los decaimientos que recogieron contenían 20000 cuentas en el canal del máximo, frente al valor típico de 10000.¹⁸⁰

¹⁷⁸ a) L. M. Tolbert, J. E. Haubrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10593-10600; b) M. T. Htun, A. Suwaiyan, A. Baig, U. K. A. Klein, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *243*, 71-77.

¹⁷⁹ M. T. Htun, A. Suwaiyan, A. Baig, U. K. A. Klein, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *264*, 596-604.

¹⁸⁰ J. Seixas de Melo, A. L. Maçanita, *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *204*, 556-562.



Esquema 138

La mayor constante de protonación medida en el estado excitado hacia moléculas de agua como aceptoras alcanza un valor de $1.4 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1}$ para el catión 7-hidroxi-4-metilflavilio.¹⁸¹ Los estudios con sales del ión flavilio tienen un gran interés por su relación con productos naturales como las antocianinas. En este caso, la emisión de la base cuando sólo se excita la forma ácida, es la convolución de la emisión de la forma ácida con los procesos de desactivación de la base, que serán la cinética de emisión de fluorescencia y la cinética de protonación en el estado excitado (Ecuación 7).

$$I_A(t) = k_d [I_{AH}(t) \otimes e^{-Yt}] \quad \text{Ecuación 7}$$

$$Y = k_A + k_p [H^+]$$

¹⁸¹ J. C. Lima, I. Abreu, R. Brouillard, A. L. Maçanita, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 298, 189-195.

En esta ecuación k_d es la constante cinética de desprotonación en el estado excitado, $I_A(t)$ e $I_{AH}(t)$ son las emisiones de las formas básica y ácida respectivamente, mientras que Y engloba la cinética de emisión de A y la protonación de la forma básica. El símbolo \otimes expresa convolución. El análisis de deconvolución de la emisión de la base con la de la forma ácida proporcionará ajustes monoexponenciales, cuyo tiempo de decaimiento corresponderá a $1/Y$. La representación de diferentes valores de Y así obtenidos frente a $[H^+]$ proporciona los valores de k_A y k_p . **Error! Marcador no definido.**¹⁸²

Generalmente, la forma de obtener los valores de las constantes cinéticas a través de los decaimientos de fluorescencia se basa en análisis globales por reconvolución iterativa. En ellos se relacionan los tiempos de decaimiento y pre-exponenciales asociados con un determinado modelo cinético. Estos análisis en dos pasos han sido los más empleados en la determinación de cinéticas de ESPT. Sin embargo, se han desarrollado otras estrategias, como son la introducción en fotofísica del análisis global compartimental.¹⁸³

¹⁸² J. C. Conte, J. M. G. Martinho, *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *134*, 350-354.

¹⁸³ M. Ameloot, N. Boens, R. Andriessen, V. Van der Bergh, F. C. De Schryver, *Methods Enzymol.* **1992**, *210*, 314-320.

Bloque B. Introducción

El análisis global compartimental de una superficie de decaimientos de fluorescencia permite resolver cinéticas en estado excitado y obtener parámetros espectroscópicos en un solo paso. En este contexto, el grupo del Prof. Boens y el grupo del Prof. Álvarez-Pez desarrollaron conjuntamente las ecuaciones teóricas apropiadas, diseñando un nuevo programa de cálculo que permitió aplicar esta metodología con distintos fluoróforos.¹⁸⁴

La instrumentación cada vez más potente ha obligado en muchas ocasiones a replantear mecanismos y características de las ESPT. La posibilidad de detectar etapas cada vez más rápidas ha revelado diferentes fenómenos de crucial importancia que no se detectaban al emplear técnicas menos sofisticadas. Por ejemplo, en las desprotonaciones en el estado excitado ultrarrápidas se han atribuido tiempos de unos cientos de femtosegundos a efectos de hidratación del disolvente tras la desprotonación. Estos fenómenos pasan desapercibidos cuando la resolución temporal es menor.¹⁸⁵

¹⁸⁴ a) L. Crovetto, A. Orte, E. M. Talavera, J. M. Álvarez-Pez, M. Cotlet, J. Thielemans, F. C. De Schryver, N. Boens, *J. Phys. Chem. B.* **2004**, *108*, 6082-6092; b) A. Orte, L. Crovetto, E. M. Talavera, N. Boens, J. M. Alvarez-Pez, *J. Phys. Chem. A.* **2005**, *109*, 734-747; c) N. Boens, W. Quin, N. Basarié, A. Orte, E. M. Talavera, J. M. Alvarez-Pez, *J. Phys. Chem. A.* **2006**, *110*, 9334-9340.

¹⁸⁵ a) *Femtosecond Chemistry*, VCH, T. Elsaesser. Weinheim, **1995**; b) T. H. Tran-Thi, T. Gustavsson, C. Prayer, S. Pommeret, J. T. Synes, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *329*, 421- 423; c) J. T. Hynes, T. H. Tran-Thi, G. Granucci, *J. Photochem. Photobiol. A.* **2002**, *154*, 3-11.

3.1. Reacciones ESPT en presencia de un aceptor/dador protónico

Las ESPT necesitan de un aceptor/dador protónico adecuado que median en la reacción. Las desprotonaciones en estado excitado hacia el agua, en general, pueden considerarse de primer orden con respecto al fluoróforo, al funcionar el exceso de moléculas de agua como aceptores. Sin embargo, como se ha citado anteriormente, en otras situaciones es necesaria la presencia de una cantidad suficiente de un aceptor/dador protónico adecuado.

Este comportamiento puede ser de fundamental importancia en medios fuertemente ácidos y/o en presencia de electrolitos, pues pueden inferir en gran medida en aplicaciones fluorimétricas y promover o alterar transferencias protónicas en el estado excitado. Esto se debe a que la presencia de otros aceptores/dadores de protones en la disolución, tales como las especies de un tampón, puede afectar a la cinética y al mecanismo de la ESPT. Esta situación ocurre habitualmente, ya que los sistemas amortiguadores del valor de pH se suelen emplear en cualquier aplicación fluorimétrica, incluso a altas concentraciones.

Davenport y colaboradores estudiaron las reacciones de transferencia protónica en estado excitado de d-equilenina y dihidroequinelinam tanto en disolución como en vesículas. Estos autores también analizaron el efecto de la adición de acetato, actuando como aceptor/dador protónico. El estudio en vesículas resulta bastante interesante ya que se realizan también medidas de anisotropía de fluorescencia, que ayudan a discernir la localización y comportamiento del fluoróforo en medios organizados. En este estudio se comprobó que, al igual que en otros sistemas, la adición de una cantidad adecuada de un aceptor/dador acelera la reacción ESPT. Sin embargo, en vesículas esta aceleración no es tan notable, ya que parte del fluoróforo se encuentra adsorbido a la doble capa de la vesícula y no

Bloque B. Introducción

resulta accesible al acetato. Además, determinaron que el contenido en colesterol en las membranas de las vesículas afectaba a esta accesibilidad, de manera que podría emplearse la ESPT como indicador de la concentración de colesterol en estos sistemas.^{176d}

En determinadas condiciones, la alta concentración de aceptor protónico en transferencias protónicas bimoleculares en el estado excitado, hace notable el control por difusión de las velocidades de reacción. En este sentido, Pines y colaboradores estudiaron el efecto en transferencias protónicas de diversos fotoácidos hacia el ión acetato, empleando concentraciones distintas de tampón acetato.¹⁸⁶

Una aplicación más reciente de las ESPT mediadas por especies de un aceptor/dador protónico es el diseño de quimiosensores, para controlar la eficiencia de la señal fluorescente. Esto permitiría emplear estos fluoróforos como sondas de pH o indicadores de la concentración de un aceptor/dador protónico.¹⁸⁷

En la Figura 18 se muestran las curvas de valoración normalizadas de emisión de fluorescencia del 2-naftol: (●) forma ácida en ausencia de tampón, (▲) forma básica en ausencia de tampón, (○) forma ácida en presencia de tampón acetato 0.1 M, (△) especie básica con tampón acetato 0.1 M.

¹⁸⁶ E. Pines, B. Z. Magnes, M. Lang, G. R. Fleming, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *281*, 413-420.

¹⁸⁷ F. Pina, M. J. Melo, M. A. Bernardo, S. V. Luis, E. García-España, *J. Photochem. Photobiol. A.* **1999**, *236*, 65-69.

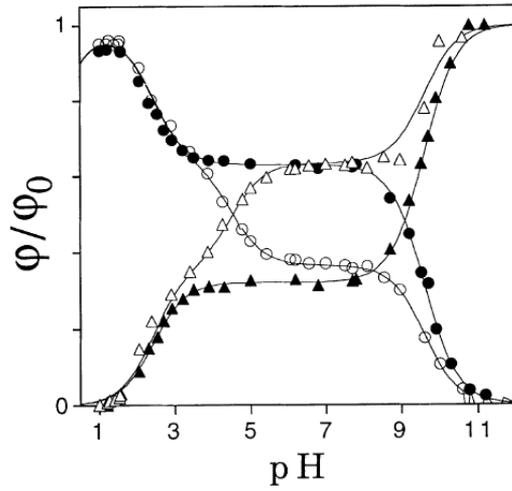


Figura 18

Por otro lado, en la Figura 19 se muestra la curva de valoración de emisión de fluorescencia del fenol en ausencia (\blacktriangle) y presencia (\circ) de tampón acetato 0.1 M.

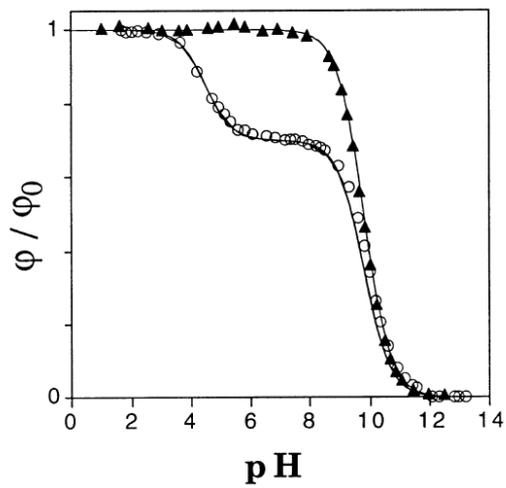
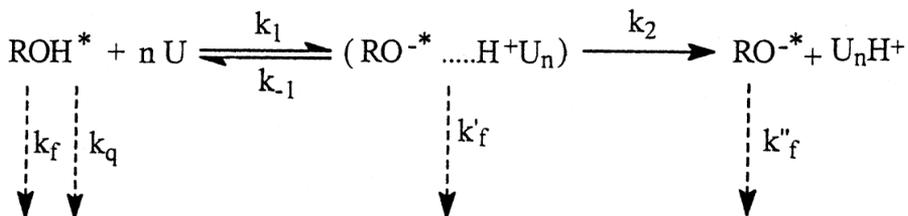


Figura 19

Bloque B. Introducción

Además de las especies de un tampón se han empleado otros aceptores protónicos, como por ejemplo la urea. El mecanismo de ESPT del 1-naftol en metanol planteado por Htun es el que se muestra en el Esquema 139. Este estudio permitió encontrar la reversibilidad de la reacción ESPT debida a la recombinación del par iónico fluoróforo excitado-urea tras la desprotonación.¹⁸⁸



Esquema 139

En resumen, la presencia de un aceptor/dador protónico adecuado favorece las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado.

¹⁸⁸ a) M. T. Htun, A. Suwaiyan, A. Baig, U. K. Klein, *J. Phys. Chem. A*. **1998**, *102*, 8230-8235; b) M. T. Htun, *J. Fluoresc.* **2003**, *13*, 323; c) M. T. Htun, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *328*, 437-445.

3.2. Reacciones ESPT de la fluoresceína

Los primeros estudios sistemáticos sobre el comportamiento de las diferentes formas prototrópicas de la fluoresceína en el estado excitado fueron realizadas por Rozwadowski en 1961, quién recogió los espectros de emisión en disolución acuosa en función del pH. También mostró una gráfica de tiempos de vida frente al pH que evidencia una transición alrededor de pH 6.5 y propuso que era debida a la reacción de intercambio protónico entre el monoanión y dianión, pero no presentó datos convincentes que pudieran soportar su propuesta.¹⁸⁹

Más tarde, Leonhardt y colaboradores midieron el rendimiento cuántico de fluorescencia de las cuatro formas prototrópicas, proporcionando también los valores de pK_a^* de los tres equilibrios ácido-base que describen el comportamiento del colorante frente al pH. Propusieron un valor de 6.9 para el equilibrio entre el monoanión y el dianión, suponiendo que la reacción en el estado excitado entre ambas formas prototrópicas ocurre con rapidez y llega a alcanzar el equilibrio en un tiempo menor que los tiempos de vida de las dos especies excitadas.¹⁴⁴

En 1975, Guyot y colaboradores cuantificaron el pK_a^* de los tres equilibrios mediante la aplicación del ciclo de Förster, obteniendo un valor de 5.7 para el equilibrio monoanión/dianión. Sin embargo, concluyeron que no se establecía el equilibrio prototrópico durante el tiempo de vida de los estados excitados. Ese mismo año y de manera independiente, Martin y Lidnqvist llegaron a esta misma conclusión.¹⁹⁰

¹⁸⁹ M. Rozwadowski, *Acta. Phys. Pol.* **1961**, *20*, 1005-1017.

¹⁹⁰ a) G. Guyot, R. Arnaud, J. Lemaire, *J. Chem. Phys.* **1975**, *72*, 648-653; b) M. Martin, L. Lindqvist, *J. Lumin.* **1975**, *10*, 381-390.

Bloque B. Introducción

Shan y colaboradores afirmaron que no es posible calcular el valor del pK_a^* del catión debido a la existencia de múltiples formas neutras, por lo que determinaron el pK_a^* a través del ciclo de Förster (veáse Ecuación 6), obteniendo un valor de -1.3.¹⁹¹ Posteriormente, Shah y Pant emplearon la técnica del contaje de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC) aplicada a la reacción ESPT de la forma catiónica de la fluoresceína y plantearon un esquema cinético en dos estados excitados reversibles. La solución teórica de las ecuaciones cinéticas supone la presencia de decaimientos biexponenciales. Sin embargo, en disolución acuosa de ácido sulfúrico y perclórico, los decaimientos obtenidos eran monoexponenciales, debido probablemente a que la resolución del instrumento no era la adecuada. Para reducir la constante cinética de la reacción emplearon mezclas glicerol/agua, de forma que la mayor viscosidad de las disoluciones redujera las constantes difusionales. Efectivamente, en un 60% de glicerol, consiguieron un tiempo de decaimiento corto de 300 ps. Así, calcularon los valores de las constantes cinéticas para diferentes mezclas glicerol/agua, con distinta viscosidad total, de forma que por extrapolación a la viscosidad de la disolución acuosa obtuvieron unos valores de $3.5 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ para la desprotonación y $9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la reprotonación, lo que significaba un valor de pK_a^* de -0.6, en contraste con el de -1.3 obtenido en el ciclo de Förster.^{191b}

En el grupo de investigación de J. M. Álvarez-Pez se abordó el estudio de las reacciones de transferencia protónica entre las especies monoaniónica y dianiónica, tanto de la fluoresceína como de algunos de sus derivados. Debido a la relevancia de la fluoresceína como fluoróforo y a su extendida aplicación en bioquímica, el conocimiento exhaustivo de estas reacciones supone una inestimable ayuda en la interpretación de los resultados obtenidos para su empleo como etiqueta

¹⁹¹ a) J. Shah, N. B. Joshi, D. Pant, *D. Curr. Sci.* **1983**, 53, 255-256; b) J. Shah, D. Pant, *D. Curr. Sci.* **1985**, 54, 1040-1043.

fluorescente. Así, en 1994 concluyeron que la ESPT entre el monoanión y el dianión únicamente se produce en presencia de un aceptor/dador protónico adecuado, mientras que en ausencia del mismo, ambas formas prototrópicas actúan como fluoróforos independientes. Mediante ajuste no lineal por mínimos cuadrados a la Ecuación 8 de los datos de fluorescencia en estado estacionario en presencia de bufer de fosfatos 1 M se obtuvo un pK_a^* de 6.31. En esta ecuación, los factores ϕ_M y ϕ_D están relacionados con los rendimientos cuánticos de cada especie, aunque su valor numérico es relativo a los de intensidad de fluorescencia.^{136a}

$$I = \frac{A\phi_M}{1 + 10^{pH - pK_M^*}} + \frac{A\phi_D}{1 + 10^{pK_M^* - pH}} \quad \text{Ecuación 8}$$

En la Figura 20 se representa la intensidad de fluorescencia frente al valor de pH de disoluciones de fluoresceína a alta concentración de tampón de fosfatos (1 M). La concentración de fluoresceína fue de 10^{-6} M y las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 437 y 512 nm respectivamente. La línea sólida sobre los puntos experimentales fue calculada con la ecuación Ecuación 8, y los parámetros $pK_M^* = 6.31$, $\phi_M = 0.188$ y $\phi_D = 1$, y la absorbancia calculada con: $pK_C = 2.19$, $pK_N = 4.4$, $pK_M = 6.48$, $\epsilon_C = 49800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_N = 11600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_M = 20000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_D = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

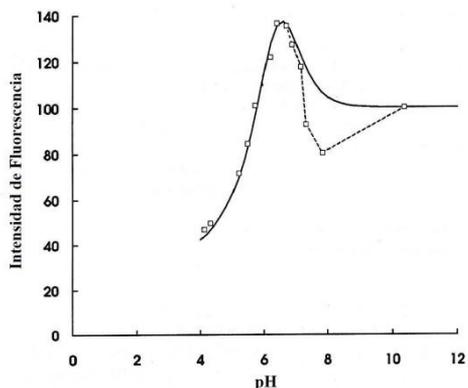


Figura 20

Posteriormente, este mismo grupo propuso el modelo cinético de la reacción ESPT entre el monoanión y dianión, incluyendo tanto la reacción llevada a cabo por las especies del aceptor/dador protónico como la ESPT del monoanión hacia el agua como la reacción de reprotonación bimolecular en el estado excitado del dianión. Mediante fluorimetría con resolución temporal de nanosegundos resolvieron la cinética de la ESPT entre el monoanión y dianión promovida por las especies del tampón fosfato 1 M. La metodología se basa en ajustes globales no lineales por mínimos cuadrados de los tiempos de decaimiento, de acuerdo con las ecuaciones derivadas del modelo cinético que figuran a continuación. En la Tabla 11 se recogen los resultados de las constantes cinéticas obtenidas, mientras que la Figura 21 muestra los ajustes del modelo a los resultados recuperados.¹³⁷

El modelo cinético seguido por Álvarez-Pez y colaboradores se basó en la extensión del utilizado por Laws y Brand,¹⁹² añadiéndole la presencia de un dador/aceptor (junto a las reacciones que provocan en los estados fundamental y

¹⁹² W. R. Laws, L. Brand, *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 795-802.

excitado) y el solapamiento de las emisiones de ambos.¹³⁷ Consta de dos especies del fluoróforo en el estado fundamental (1 y 2) y dos especies excitadas (1* y 2*), así como las correspondientes al tampón de fosfatos (R y RH). En el se considera la posibilidad de la desprotonación unimolecular de 1* en el estado excitado, cuya constante de velocidad fue denominada k_{21} , así como la existencia de desprotonación bimolecular promovida por la especie R del aceptor protónico, cuya constante de velocidad fue denotada como k_{21}^b . Asimismo, las constantes cinéticas de las protonaciones bimoleculares en estado excitado de la especie 2* a través de los protones y la especie RH del aceptor/dador protónico fueron denominadas respectivamente k_{12} y k_{12}^b . El modelo cinético propone el decaimiento de las especies excitadas a través de las ecuaciones:

$$-\frac{d[1^*]}{dt} = (k_{01} + k_{21} + k_{21}^b[R])[1^*] - (k_{12}[H^+] + k_{12}^b[RH])[2^*] \quad \text{Ecuación 9}$$

$$-\frac{d[2^*]}{dt} = (k_{02} + k_{12}[H^+] + k_{12}^b[RH])[2^*] - (k_{21} + k_{21}^b[R])[1^*] \quad \text{Ecuación 10}$$

Lo que supone una ley de decaimiento biexponencial. Sin embargo en este modelo, tanto los tiempos de decaimiento como los pre-exponenciales, dependerán de $[H^+]$ y de las concentraciones de R (Ecuación 11) y RH (Ecuación 12), que a su vez dependen del pK_a del tampón RH/R y de la concentración total del aceptor/dador protónico (C^{Buff}).

$$[R] = C^{Buff} \frac{K_a}{K_a + [H^+]} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$[RH] = C^{Buff} \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} \quad \text{Ecuación 12}$$

Bloque B. Introducción

Así, los tiempos de vida de los decaimientos biexponenciales vendrán dados por la Ecuación 13:

$$-\frac{1}{\tau_{1,2}} = \frac{X + Y \pm \sqrt{(Y - X)^2 + 4(k_{21} + k_{21}^b [R])(k_{12} [H^+] + k_{12}^b [RH])}}{2} \quad \text{Ecuación 13}$$

Siendo:

$$X = k_{01} + k_{21} + k_{21}^b [R] \quad \text{Ecuación 14}$$

$$Y = k_{02} + k_{12} [H^+] + k_{12}^b [RH] \quad \text{Ecuación 15}$$

Tabla11

τ_D (ns)	τ_M (ns)	k_{DM} (ns ⁻¹)	k_{MD} (ns ⁻¹)	k_{DM}^b (M ⁻¹ ns ⁻¹)	k_{DM}^b (M ⁻¹ ns ⁻¹)
4.34 ± 0.02	3.70 ± 0.03	(2.6 ± 1.3) × 10 ⁻³	0 ^b	0.92 ± 0.04	0.304 ± 0.009
					$\rho K_a^* = 6.4$

^bTiende a cero en el proceso de ajuste; ^c Calculado en la zona de concentraciones constantes en equilibrio de [M*] y [D*]

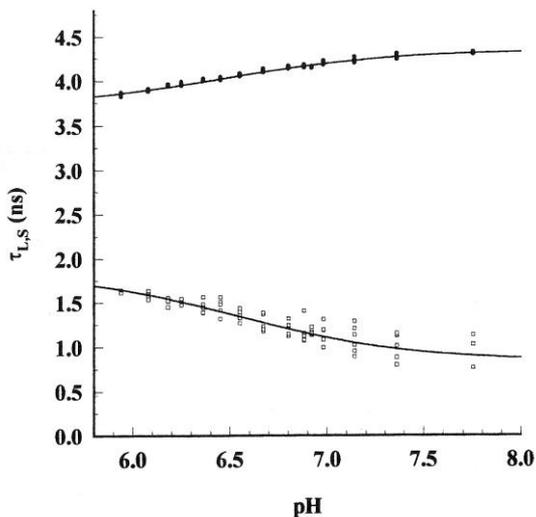


Figura 21

Como se observa, hay una excelente concordancia entre los tiempos de decaimiento largo (τ_L , ●) y corto (τ_S , □) obtenidos mediante análisis global de los decaimientos experimentales de disoluciones de fluoresceína en presencia de tampón de fosfatos 1 M y los tiempos de decaimiento calculados con los valores de las constantes cinéticas determinadas empleando el modelo propuesto y las expresiones derivadas de el, que son representados en la Figura 21 por las líneas continuas.¹³⁷

Existen otros compuestos que pueden actuar como aceptores/dadores protónicos adecuados para mediar las reacciones ESPT entre las especies mono y dianiónica de la fluoresceína. En este contexto, Crovetto y colaboradores determinaron las constantes cinéticas de esta reacción ESPT en presencia de ácido N-acetilaspártico, empleando las metodologías propuestas para la fluoresceína, a saber: por fluorimetría en estado estacionario y mediante fluorimetría con

Bloque B. Introducción

resolución temporal. Debido a la complejidad del sistema, motivada por la débil influencia del dador/aceptor protónico empleado, la cinética de este sistema se resolvió empleando el análisis global compartimental (GCA), una poderosa metodología de análisis que había sido empleada por Boens y colaboradores en reacciones ESPT sin necesidad de la adición de un dador/aceptor protónico adecuado. Ya que nunca se había resuelto con esta metodología un sistema de estas características, se modificó el modelo original del Prof. Boens introduciendo las nuevas reacciones mediadas por el bufer y se programó un nuevo software para su resolución. Asimismo, se propusieron también las condiciones experimentales necesarias para que los parámetros recuperados en el GCA fueran identificables de forma única. Los valores de las constantes cinéticas obtenidas se muestran en la Tabla 12.^{193,184a}

Tabla12

$k_{OM} + k_{DM}$ (ns ⁻¹) ₁₎	k_{OD} (ns ⁻¹)	k_{MD} (M ⁻¹ ns ⁻¹)	k_{DM}^b (M ⁻¹ ns ⁻¹)	k_{MD}^b (M ⁻¹ ns ⁻¹)
0.2765 ± 0.004	0.231 ^b	0 ^b	0.0336 ± 0.0015	0.0120 ± 0.0015

^bMantenidas fijas durante el proceso de ajuste.

De entre los derivados de fluoresceína resistentes a la fotodegradación, uno de los de mayor rendimiento cuántico es el denominado Oregon Green 488, el cual presenta valores de pK_a en el estado fundamental muy próximos entre sí, lo que permite desarrollar modelos cinéticos en tres estados y su aplicación a las reacciones

¹⁹³ N. Boens, N. Basarié, E. Novikov, L. Crovetto, A. Orte, E. M. Talavera, J. M. Alvarez-Pez, *J. Phys. Chem. A*. **2004**, *108*, 8180-8185.

ESPT del citado colorante en disolución acuosa. Este estudio fue llevado a cabo por Orte y colaboradores en 2005 y se resolvió mediante un análisis global tricompartmental. Los modelos propuestos junto a los parámetros recuperados permitieron predecir los tiempos de vida correspondientes a disoluciones de colorante en distintas condiciones experimentales. También permite el cálculo de la señal de fluorescencia en estado estacionario que se obtendría a partir de disoluciones con distintos valores de pH. Los valores de las constantes cinéticas obtenidas se muestran en la Tabla 13.^{194,184b}

Tabla 13

$k_{OM} + k_{DM}$ (ns ⁻¹)	k_{OD} (ns ⁻¹)	k_{MD} (M ⁻¹ ns ⁻¹)	k_{DM}^b (M ⁻¹ ns ⁻¹)	k_{MD}^b (M ⁻¹ ns ⁻¹)
0.297 ± 0.001	0.247 ± 0.001	0 ^b	0.970 ± 0.002	0.179 ± 0.001

^bMantenida fija durante el proceso de ajuste.

De esta manera, la sensibilidad de la emisión fluorescente frente al pH es una propiedad fundamental de estos derivados, ya que permite emplearlos como indicadores del pH.

¹⁹⁴ A. Orte, R. Bermejo, E. M. Talavera, L. Crovetto, J. M. Álvarez-Pez, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 2840-2846.

3.3. Identificabilidad del sistema compartimental

Como ya se ha mencionado, sólo algunos sistemas se han resuelto bajo el entorno del análisis global bicompartimental, como la fluoresceína en presencia de ácido N-acetilaspártico o el 2',7'-difluorofluoresceína en presencia de ácido acético y acetato^{195,184a,b}

Una característica muy importante en el ámbito del análisis global compartimental es la posibilidad de asignar un único conjunto de valores a los parámetros cinéticos y espectroscópicos, a partir de los decaimientos adquiridos. Esto se denomina *identificabilidad*. Se denomina *sistema globalmente identificable* al sistema en el que se tienen decaimientos suficientes para asignar un único valor a cada uno de los parámetros. Si existen varios conjuntos de soluciones, el sistema se denomina *localmente identificable*. El sistema compartimental será *no identificable* cuando no se logre obtener una solución única de los parámetros. El mayor problema de la identificabilidad estructural es la obtención de todos los parámetros de un sistema compartimental a través de medidas libres de error. Es evidente que esta situación no es real, sin embargo, los estudios de identificabilidad son clave a la hora de diseñar los experimentos y programar las superficies de decaimientos de fluorescencia para ser introducidas en un análisis global compartimental.^{193,196}

¹⁹⁵ A. Orte, E. M. Talavera, A. L. Maçanita, J. C. Orte, J. M. Alvarez-Pez, *J. Phys. Chem. A*. **2005**, *109*, 8705-8718.

¹⁹⁶ a) M. Ameloot, N. Boens, R. Andriessen, V. Van der Bergh, F. C. Schryver, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 2041-2047; b) N. Boens, A. Kowalczyk, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *260*, 326-330; c) N. Boens, A. Kowalczyk, E. Cielen, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 4879-4886; d) N. Boens, E. Novikov, M. Van der Auweraer, *Math. Bio.* **2007**, *209*, 624-643; e) L. Van Dommelen, N. Boens, M. L. Ameloot, F. C. Schryver, A. Kowalczyk, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 11738-11753; f) A. Kowalczyk, K. Meuwis, N. Boens, F. C. Schryver, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17349-17353.

BLOQUE B

**CAPÍTULO III. SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS
XANTÉNICOS FLUORESCENTES Y ESTUDIO DE SUS
PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

BLOQUE B
CAPÍTULO III. ANTECEDENTES

1. DERIVADOS XANTÉNICOS SIN GRUPO CARBOXÍLO: FAMILIA TOKYO GREEN

La molécula de fluoresceína consta de dos partes bien diferenciadas: la xanténica, que se excita directamente con luz correspondiente a la zona del visible, y la bencénica, que se excita con luz ultravioleta. Ambas mitades son ortogonales entre sí (Figura 22) y no existe ninguna interacción entre ellas ni en el estado fundamental ni en el excitado.²⁰⁶ Desde el trabajo de Linqvist y Lundeen se ha supuesto que el alto rendimiento cuántico (ϕ) de la fluoresceína era debido a la presencia del grupo carboxilo.¹⁹⁷

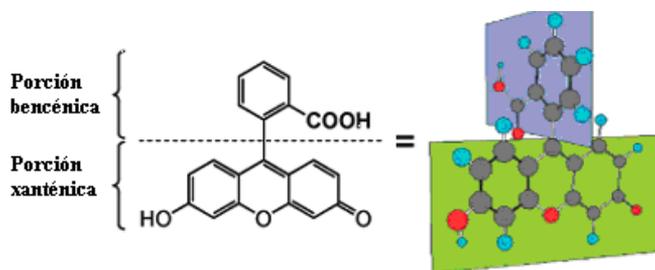


Figura 22

Pero en 2005, esta suposición fue rebatida por Urano y colaboradores, los cuales demostraron que el grupo carboxilo no desempeña un papel decisivo en las propiedades fluorescentes de la molécula, sino que tan sólo mantiene ortogonales las mitades bencénica y xanténica. Por tanto, éste podría reemplazarse por otro grupo funcional (Figura 23).¹⁵³

¹⁹⁷ a) L. Lindqvist, G. W. Lundeen, M. Martin, *J. Chem. Phys.* **1971**, 55, 3054-3055; b) D. W. Fink, C. R. Willis, *J. Chem. Phys.* **1970**, 53, 4720-4722.

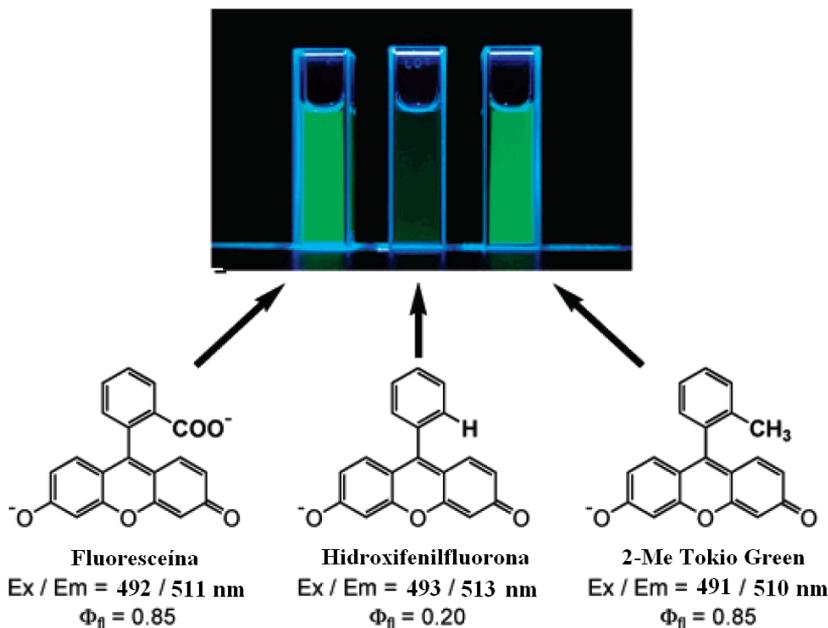


Figura 23

Como se observa en la Figura 23, los rendimientos cuánticos (ϕ) de algunos de los derivados de fluoresceína que carecen del grupo carboxilo indican que si la mitad xanténica está protonada (a pH ácido o neutro), el rendimiento cuántico de fluorescencia es igual o muy cercano a cero; pero a pH alcalino el rendimiento cuántico de la correspondiente forma aniónica es similar al de la fluoresceína. Además, el hecho de que la fluoresceína y el 2-MeTokyo Green tengan idénticos rendimientos cuánticos sugiere que incluso un grupo metilo es suficiente para mantener las porciones bencénica y xanténica ortogonales.

En base a estas consideraciones, Urano y colaboradores sintetizaron varios derivados modificando la densidad electrónica de la parte bencénica, introduciendo grupos metilo y metoxilo. Esta familia de compuestos se denominó Tokyo Greens. El hecho de que sus máximos de absorción y emisión sean similares a los de la

fluoresceína indica que las interacciones en el estado fundamental entre la parte bencénica y la xanténica es mínima en todos ellos. Por otro lado, el rendimiento cuántico puede variar considerablemente, dependiendo del potencial de oxidación y el nivel de energía HOMO de la porción bencénica, considerada como una unidad independiente (Tabla 14).

Tabla 14

R	Excitación máx.	Emisión máx.	Pot. de ox.	Energía HOMO	ϕ pH=13	ϕ pH=3.4
2-Me	491	510	2.19	-0.2356	0.847	0.319
2,4-DiMe	491	510	2.08	-0.2304	0.865	0.307
2,5-DiMe	491	510	1.98	-0.2262	0.887	0.319
2-OMe	494	515	1.75	-0.2174	0.860	0.076
2-Me-4-OMe	492	509	1.66	-0.2141	0.840	0.010
2-OMe-5-Me	494	514	1.57	-0.2098	0.500	0.004
2,4-DiOMe	494	513	1.44	-0.2063	0.200	0.001
2,5-DiOMe	494	512	1.26	-0.1985	0.010	0.000
Fluoresceína	492	511	-	-0.2646	0.85	0.30

De esta manera, la posibilidad de reemplazar el grupo carboxilo de la fluoresceína por otros sustituyentes ha permitido desarrollar nuevos fluoróforos para emplearlos como sensores, pues algunos se comportan como sondas “on/off” sensibles al valor de pH del medio en el que se encuentren (Figura 24).

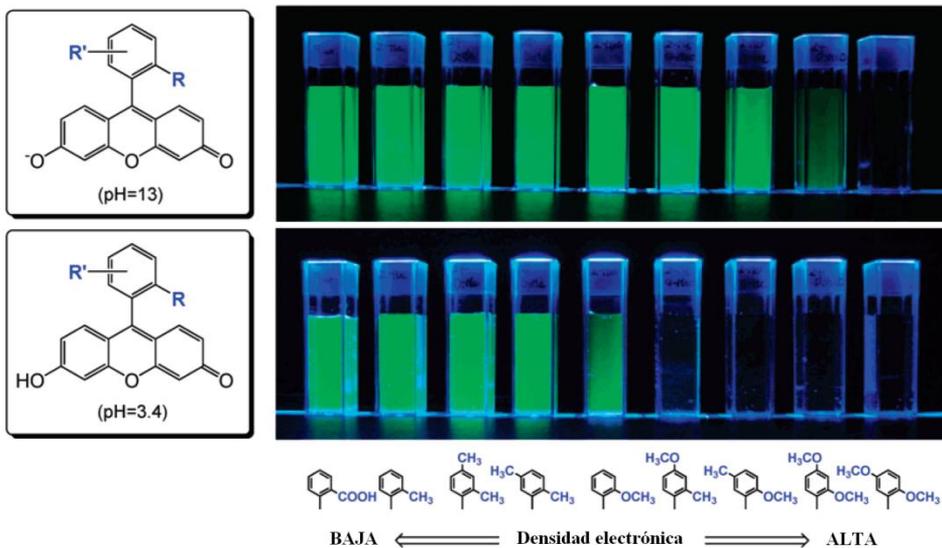


Figura 24

De entre estos Tokyo Green, los más interesantes desde un punto de vista fotofísico son los denominados TG-I y TG-II, porque poseen diferencias muy acusadas en el rendimiento cuántico de las especies neutra y aniónica, proporcionando una mayor sensibilidad cuando se produzca el cambio de especie prototrópica (TG-I y TG-II, Figura 25).

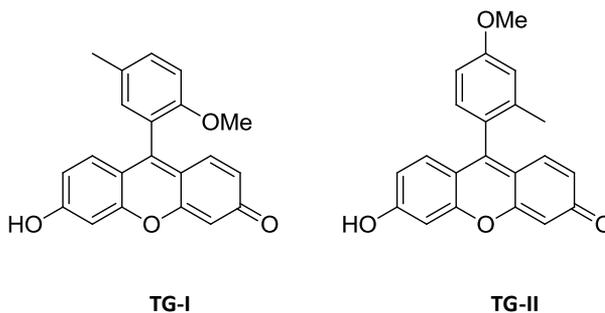


Figura 25

Urano y colaboradores emplearon el TG-II como sensor de la actividad β -galactosidasa, formando un complejo TG- β -gal por reacción del colorante con galactosidasa. Éste complejo presenta muy bajo rendimiento cuántico cuando el grupo fenólico de la parte xanténica permanece unido a la β -galactosa. En presencia de galactosidasa este enlace se rompe, quedando libre el TG-II en forma aniónica, originando una fluorescencia muy intensa, como se muestra en la Figura 26.¹⁵³

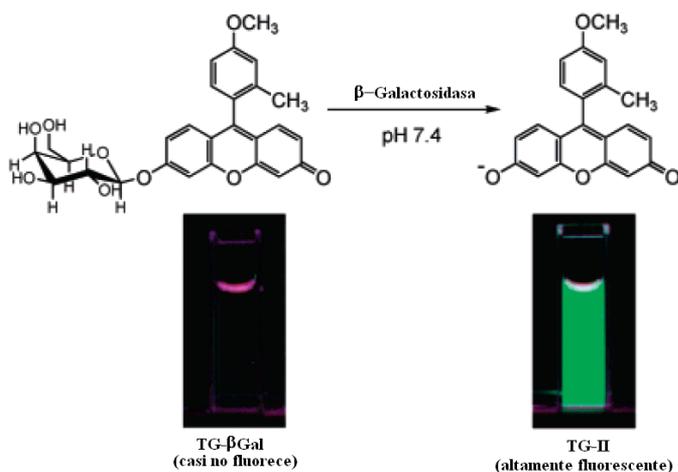


Figura 26

Si se compara este nuevo fluoróforo con la di-O- β -galactosa fluoresceína (FDG), se observa que en el segundo caso la reacción ocurriría en dos pasos: primero el FDG es transformado en la mono-O- β -galactosa fluoresceína (FMG), de mediana fluorescencia, que finalmente pasa a fluoresceína. Además, el incremento de la señal fluorescente es muy lento en el caso de la FDG, por lo que la sensibilidad es relativamente baja.¹⁵³

Debido a esto, el TG-II presenta ventajas sobre los sensores utilizados hasta el momento, especialmente en términos de sensibilidad y de imágenes en tiempo real en células vivas (Figura 27).¹⁵³

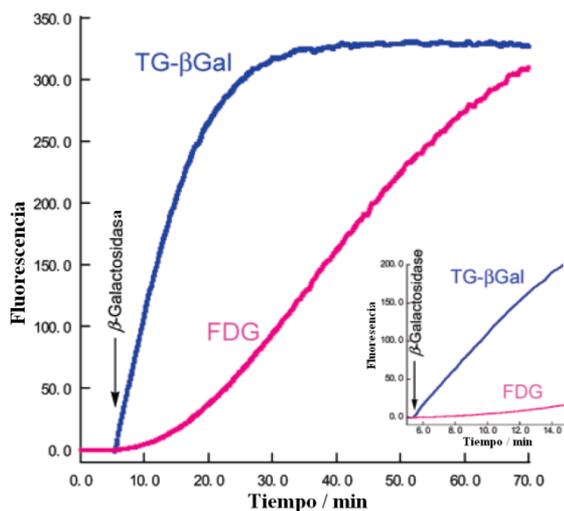


Figura 27

Estas diferencias se muestran en la imagen de microscopía de fluorescencia (Figura 28): la actividad β -galactosidasa con TG- β -gal y FDG en células vivas *lacZ*-positiva y *lacZ*-negativas. En la parte superior se observan las imágenes con TG- β -gal en células *lacZ*-positivas, en la parte intermedia aquellas con TG- β -gal en células *lacZ*-negativas, y en la parte inferior aquellas con FDG en células *lacZ*-positivas. Las imágenes de fluorescencia se muestran en el lado izquierdo, mientras que en el derecho se muestran las imágenes en campo de luz visible.¹⁵³

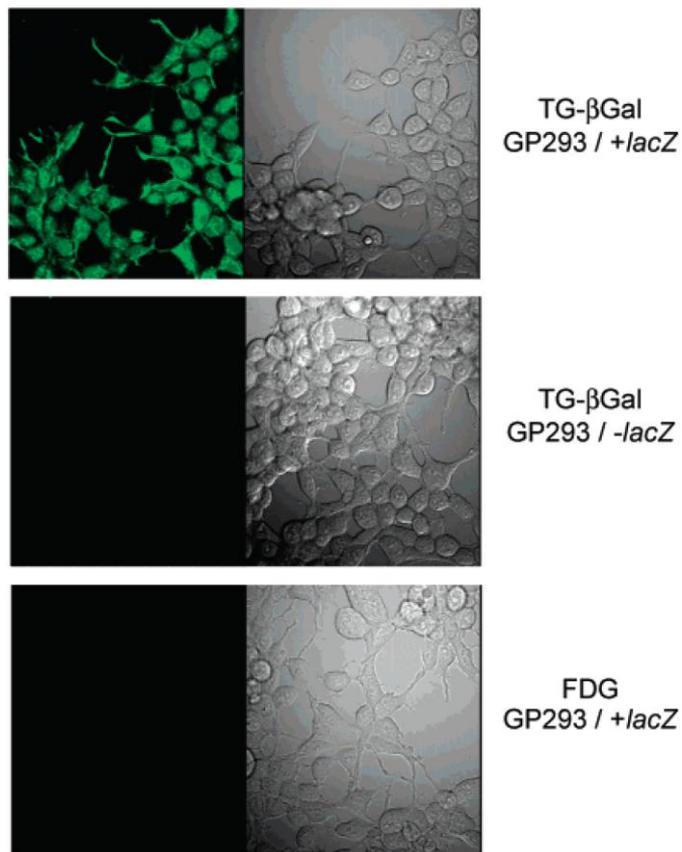


Figura 28

En 2008, el grupo de J. M. Álvarez-Pez empleó el Tokyo Green III (TG-III, Figura 29) como compuesto reactivo de aminas primarias, capaz de unirse de forma covalente a biopolímeros.¹⁹⁸

¹⁹⁸ L.Crovetto, R. Rios, R. J. M. Álvarez-Pez, J. M. Paredes, P. Lozano-Velez, C. delValle, E. M. Talavera, *J. Phys. Chem. B.* **2008**, *112*, 10082-10085.

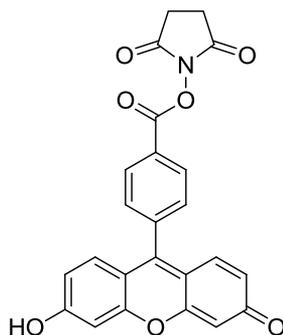


Figura 29, TG-III

Con este derivado se etiquetó el ácido polirribocitosínico (poli(C)) debido a que la intensidad de fluorescencia en estado estacionario y el tiempo de vida de fluorescencia eran sensibles al valor de pH de la disolución. De esta manera, se consiguió detectar la hibridación en disolución de TG-III-Poli(C) con su homopolinucleótido complementario ácido poli-inosínico (poli(I)), pues se produce un decrecimiento en la emisión fluorescente en estado estacionario con la hibridación. Este hecho se justificó mediante una variación aparente del pK_a del colorante antes y después de la hibridación, junto a un quencheo estático. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad del TG-III como sensor fluorescente en la detección de la hibridación de ácidos nucleicos en medios homogéneos.

Abarcando un rango pH de 2-7 de disoluciones del compuesto **LIII**, obtuvieron el espectro de absorción para la especie catiónica (A), neutra (B) y aniónica (C) a partir de un análisis global de los datos espectroscópicos de absorción (Figura 32), determinando un valor de $pK_a = 5.97$.

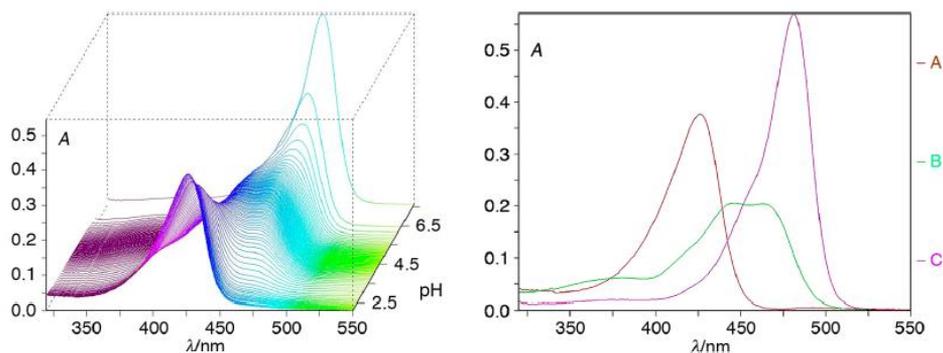
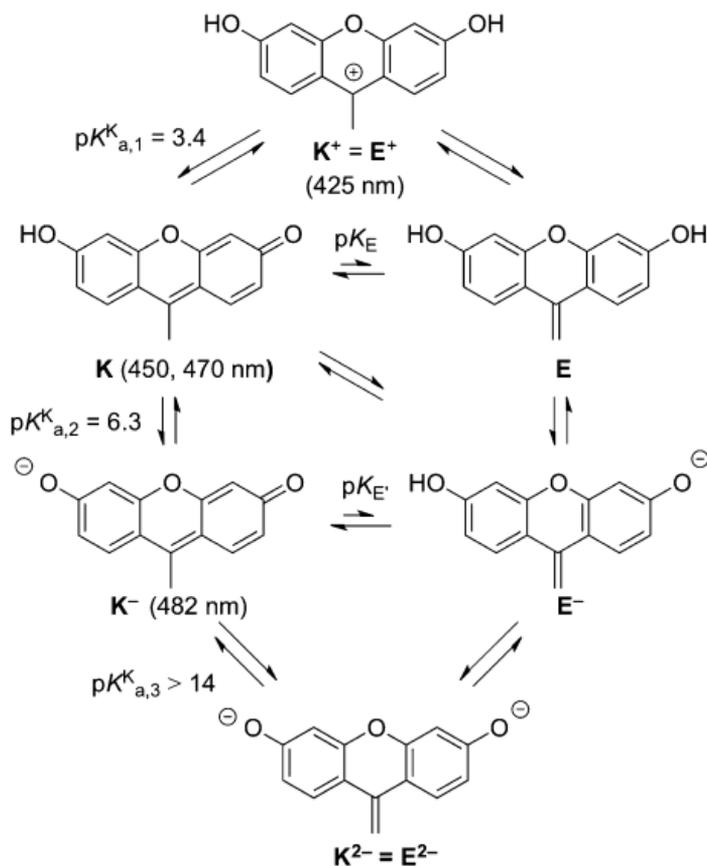


Figura 32

El espectro de absorción en el rango de la luz visible parece indicar que la forma cetónica de las especies aniónica (K^-) y neutra (K) son predominantes para pH superior a 13, en disolución acuosa. A pH neutro, el compuesto en disolución se presenta casi exclusivamente en la forma cetónica-aniónica (K^-). Las dos formas tautoméricas de la especie neutra y sus correspondientes aniones también pueden formar parte del equilibrio protomérico, en forma cetónica (K) o enólica (E) (Esquema 140).

La variación de la energía libre de Gibbs calculada para la forma cetónica y aniónica a temperatura ambiente fue 26.0 KJ/mol y 54.8 KJ/mol respectivamente. Además, determinaron el valor de las constantes de enolización $pK_E = 4.6$ y $pK_E = 9.4$.



Esquema 140

En este mismo trabajo, determinaron el espectro de emisión (Figura 33) en un rango de pH 2-7. Como se observa, éste presenta dos contribuciones distintas: una correspondiente a la especie aniónica y otra de la especie neutra, que se extiende a mayor longitud de onda. Así mismo, obtuvieron un valor de tiempo de vida de 3.5 ns para pHs comprendidos entre 3-11.

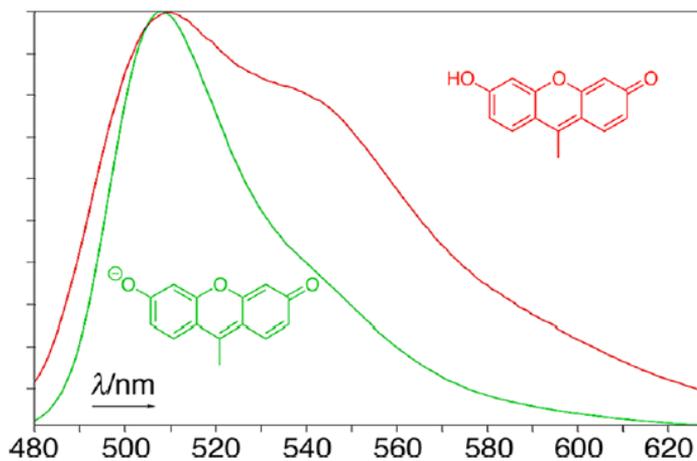


Figura 33

De esta manera, el empleo de este alquixanteno (**LIII**) como sonda fluorescente está limitado debido a su tiempo de vida corto (inferior al encontrado para los Tokyo Green) como por valor de pK_a calculado, dificultando su compatibilidad con el medio fisiológico celular. Además, su estabilidad en medio acuoso es limitada, tal y como se comentará en el siguiente apartado.

3. DERIVADOS XANTÉNICOS PARA DETECCIÓN DE IONES

En los últimos años se ha incrementado el interés en la detección y/o captura de iones con este tipo de estructuras, con objeto de localizar elementos en medios acuosos celulares y aplicarlo al diagnóstico de enfermedades.

A continuación se explicarán algunos de los derivados que han sintetizado distintos grupos de investigación para detección de diversos cationes y aniones.

Sodio

En 2003, Nagano y colaboradores demostraron que las propiedades de los derivados de la fluoresceína podían controlarse mediante transferencia electrónica intramolecular fotoinducida (PeT), que consiste en el quencheo de la fluorescencia por la transferencia de un electrón desde el donador hasta el aceptor.²⁰⁰ A partir de este estudio, sintetizaron un derivado xanténico capaz de detectar y capturar cationes sodio (Figura 34), sin la existencia de grupo amino en la molécula.²⁰¹ Tras estudiar los espectros de absorción y emisión de distintas muestras, concluyeron que la intensidad fluorescente se incrementaba de forma proporcional a la concentración de sodio en el medio. Además, comprobaron la selectividad de esta sonda, pues realizaron experimentos similares con potasio sin obtener resultados satisfactorios.

²⁰⁰ T. Miura, Y. Urano, K. Tanaka, T. Nagano, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8666-8671.

²⁰¹ S. Kenmoku, Y. Urano, K. Koujirou, K. Hirotatsu, K. Kazuya, T. Nagano, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11067-11073.

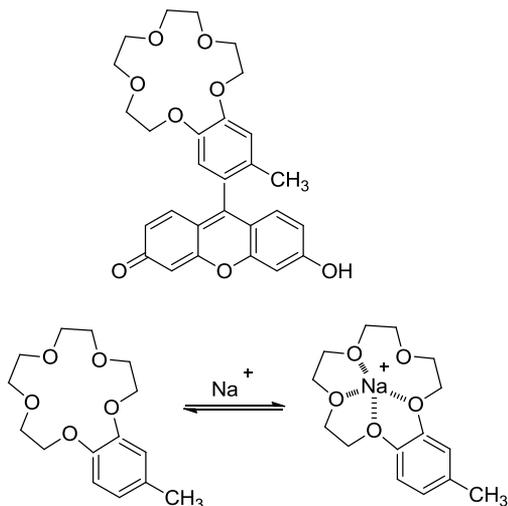


Figura 34

Cobre

Aunque se han desarrollado diversas sondas xanténicas para detectar iones cobre, fue en 2006 cuando Chen y Ma diseñaron una molécula (Figura 35) que cumplía esta función y era compatible con el medio celular, pudiéndose realizar experimentos con células vivas.²⁰²

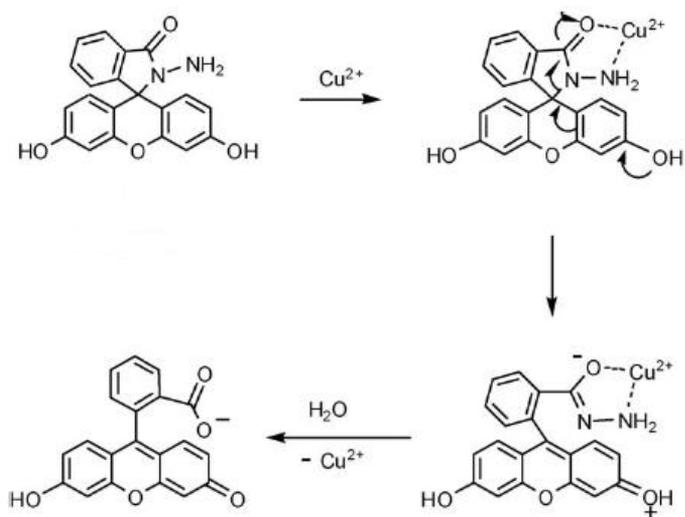


Figura 35

²⁰² a) R. Krämer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 772-773; b) A. Torrado, G. K. Walkup, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 609-610; c) R. H. Yang, Z. Zhang, K. A. Li, F. Liu, W. H. Chan, *Anal. Chim. Acta.* **2004**, *525*, 97-103; d) S. Bhattacharya, M. Thomas, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 10313-10317; e) X. Chen, H. Ma, *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *575*, 217-222.

Esta molécula no presenta fluorescencia, excepto cuando existen iones cobre en el medio. El mecanismo por el cual se produce el proceso fue desarrollado en este mismo trabajo, y se muestra en el Esquema 141.

Mediante la realización de distintos experimentos en presencia de otros iones, demostraron que esta estructura es selectiva para cationes cobre (Figura 36), y que su actividad no se inhibe cuando coexiste con otros iones.



Esquema 141

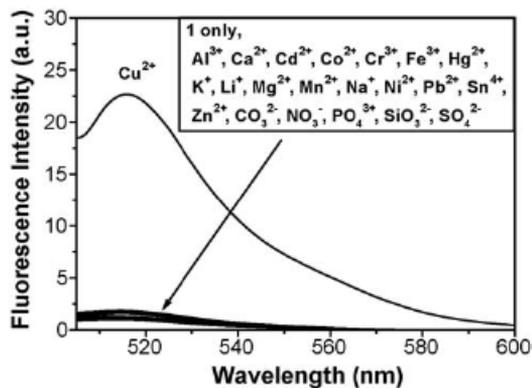
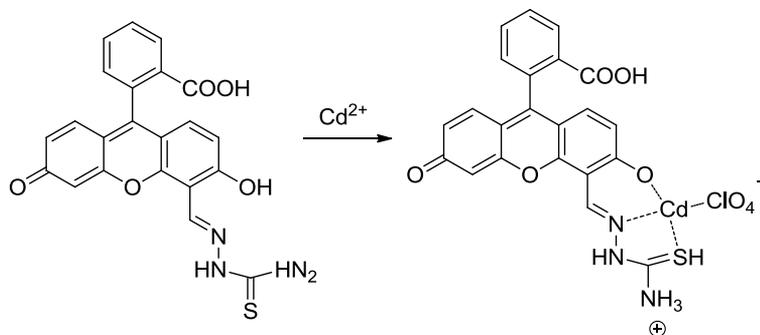


Figura 36

Cadmio

Liu y colaboradores sintetizaron en 2007 un quimiosensor sensible a los iones cadmio y determinaron mediante espectroscopía de resonancia magnetica nuclear su estructura cuando capturaba dicho metal (Esquema 142).²⁰³



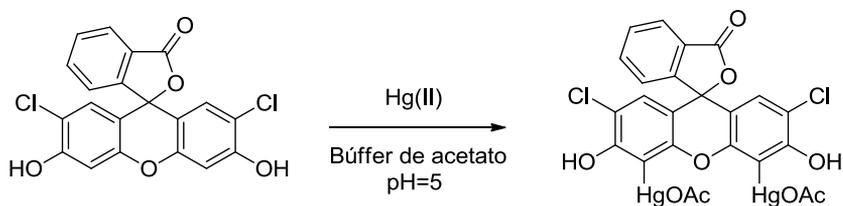
Esquema 142

²⁰³ W. Liu, L. Xu, R. Sheng, P. Wang, H. Li, S. Wu, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3829-3832.

Compararon el espectro de emisión y el rendimiento cuántico de este compuesto con el de la fluoresceína, siendo insignificantes las diferencias encontradas. Sin embargo, en presencia de otros cationes también se percibía un aumento de la intensidad de fluorescencia, por lo que no se puede considerar un detector totalmente selectivo.

Mercurio

El grupo de Chang empleó un derivado de la diclorofluoresceína para sintetizar un detector de iones mercurio en disoluciones buffer de acetato, a pH ácido (Esquema 143). La peculiaridad de este método de detección radica en que las disoluciones sin mercurio presentan un color amarillo, mientras que las disoluciones en presencia de este metal se tornan naranjas. Además, el compuesto original es fluorescente pero una vez formado el enlace con el acetato de mercurio, esta fluorescencia desaparece (Figura 37).²⁰⁴



Esquema 143

²⁰⁴ M. G. Choi, D. H. Ryu, H. L. Jeon, S. Cha, J. Cho, H. H. Joo, K. S. Hong, C. Lee, S. Ahm, S-K. Chang, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3717-3720.

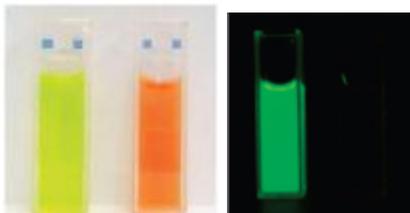
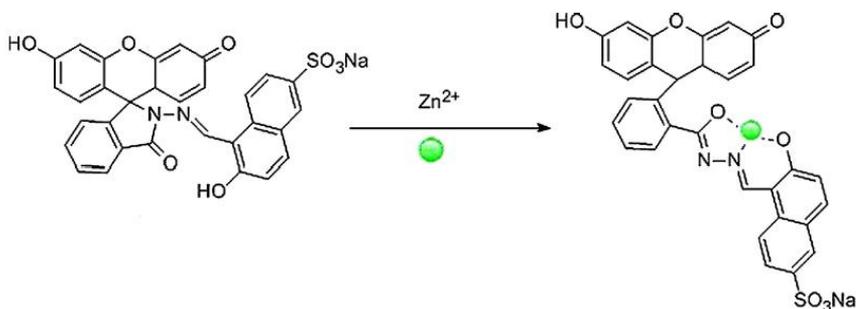


Figura 37

Cinc

Li y colaboradores sintetizaron en 2011 una sonda fluorescente hidrofílica capaz de detectar los cationes cinc (Esquema 144), empleando como receptor un β -naftol sulfonado. El mecanismo que rige la captación del ión es la transferencia de carga interna (ICT), incrementándose la fluorescencia del complejo en presencia de estos iones.²⁰⁵



Esquema 144

²⁰⁵ L. Jiang, L. Wang, M. Guo, G. Yin, R-Y. Wang, *Sens. Actuators. B.* **2011**, *156*, 825-831.

Al realizar experimentos con distintos cationes y normalizar la intensidad de fluorescencia determinaron que este compuesto era selectivo a iones cinc (Figura 38). Como se observa, la fluorescencia aumenta en presencia exclusiva de este catión y de mezclas de éste con otros elementos.

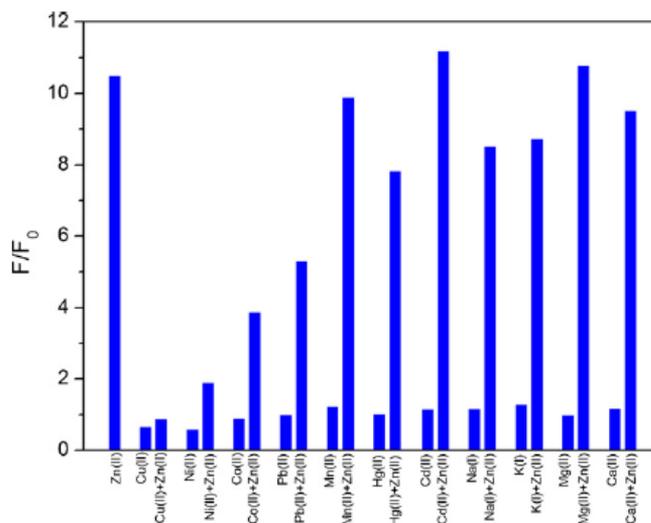


Figura 38

En este mismo trabajo comprobaron que la máxima intensidad fluorescente se recogía en valores próximos al pH fisiológico, por lo que llevaron a cabo experimentos en células vivas (Figura 39).

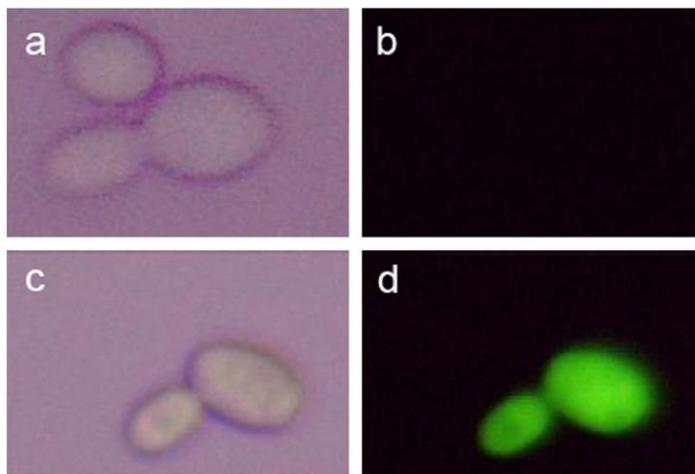


Figura 39

Empleando la técnica de microscopía confocal, no se percibía fluorescencia en el caso de no existir cinc en el medio (a y b). Al adicionar este elemento al medio, traspasó la membrana lipídica y se concentró en el citosol (c y d).

Cationes trivalentes

Aunque existen un gran número de ejemplos de sondas detectoras de hierro y aluminio, no son tantos los casos descritos en bibliografía para detectar iones cromo.²⁰⁶

²⁰⁶ a) K. M. Orcutt, W. S. Jones, A. McJonal, A. Schorock, J. Wallace, *Sensors* **2010**, *10*, 1326-1337; b) S. Fakih, M. Podinovskaia, X. Kong, H. L. Collings, V. E. Schoible, R. C. Hider, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4539-4246; c) Z. Jiang, L. Tang, F. Shao, G. Zheng, P. Lu, *Sens. Actuarors. B.* **2008**, *134*, 414-418; d) M. Daity, T. Govindaraju, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4499-4201; e) X. Jiang, B. Wang, Z. Yang, Y. Liu, T. Li, Z. Liu, *Inorg. Chem. Commun.* **2011**, *14*, 1224-1227; f) T. Ma, M. Dong, Y. Dong, Y. Wang, Y. Peng, *Chem. Eur. J.*

Así, el grupo de investigación de Ana María Costero diseñó un derivado de la fluoresceína capaz de detectar la presencia de aluminio, hierro y cromo (Figura 40).²⁰⁷

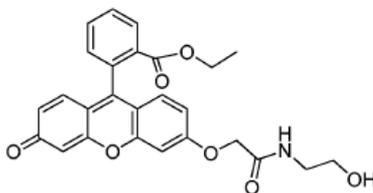
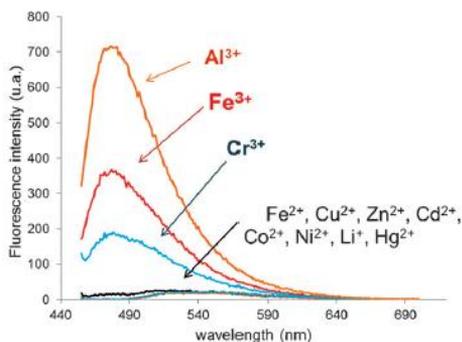


Figura 40

Al realizar experimentos con diversos cationes, comprobaron que tan sólo con estos tres elementos se detectaba fluorescencia (Figura 41).



2010, 16, 10313-10318; g) L. Wang, W. Qin, X. Tang, W. Dou, W. Liu, Q. Teng, X. Yao, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 3751-3757; h) Y. Wan, Q. Quo, X. Wang, A. Yia, *Anal. Chim. Acta.* **2010**, 665, 215-220; i) M. Sarkar, S. Banthia, A. Samanta, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 7575-7578.

²⁰⁷ A. Barba-Bon, A. M. Costero, S. Gil, M. Parra, J. Soto, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3000-3002.

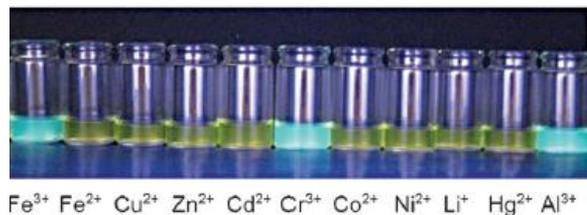


Figura 41

Cianuro

La necesidad de detectar iones cianuro se justifica debido a su extremada toxicidad en organismos vivos, pues inhiben la respiración celular.²⁰⁸ De esta manera, el grupo de Shiraishi ha desarrollado distintas sondas fluorescentes que permiten su detección, entre las que cabe destacar un derivado xanténico diseñado en 2012 (Esquema 145).²⁰⁹



Esquema 145

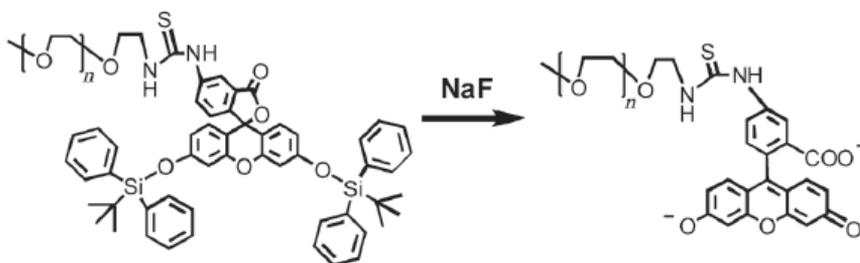
²⁰⁸ a) R. Koenig, *Science* **2000**, 287, 1737-1738; b) M. A. Holland, L. M. Kozlowski, *Clin. Pharm.* **1986**, 5, 737-741.

²⁰⁹ a) Y. Shiraishi, K. Adachi, M. Itoh, T. Hirai, *Org. Lett.* **2009**, 11, 3482-3485; b) Y. Shiraishi, M. Itoh, T. Hirai, *Tetrahedron* **2011**, 67, 891-897; c) S. Shigeiro, T. Doi, Y. Shiraishi, *Tetrahedron* **2012**, 68, 690-696.

Recogiendo datos de absorción, comprobaron que el máximo aparecía en 568 nm cuando no había presencia de iones cianuro en el medio. Sin embargo, en presencia de estos, el máximo de absorción aparecía a 512 nm. Mediante cálculos DFT concluyeron que este cambio se debía a la interacción nucleófila entre el anión y el espiro indol, promoviendo la localización de los electrones en la mitad xanténica de la molécula.

Flúor

Recientemente, Zheng y colaboradores han conseguido detectar anión fluoruro en disolución acuosa mediante un derivado de la fluoresceína, incorporando un grupo hidrofílico biocompatible (poly etilen glicol) a la molécula (Esquema 146). Al proteger los grupos fenólicos con tert-butildifenilsilil (TBDPS) se consigue quenchar la fluorescencia, de manera que al adicionar el ión al medio se libera este grupo protector recuperando la fluorescencia. Este sensor es altamente selectivo para los aniones fluoruro.²¹⁰

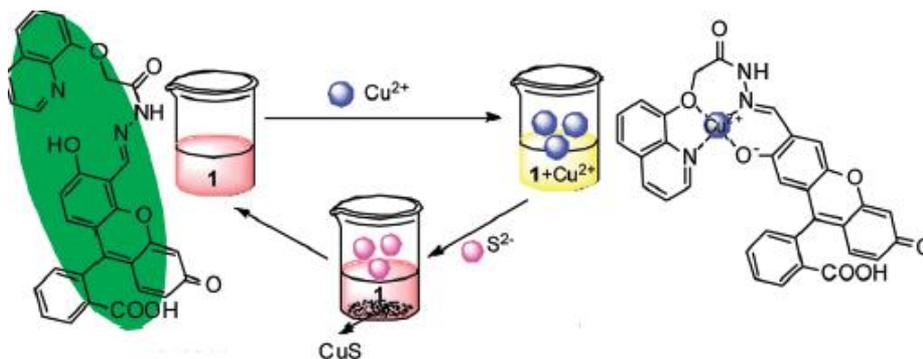


Esquema 146

²¹⁰ F. Zheng, F. Zeng, C. Yu, X. Hou, S. Wu, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 936 – 942.

Sulfuro

El grupo de Bai ideó en 2012 un nuevo método de detección de iones sulfuro, basado en la reacción inorgánica entre el cobre y este elemento. De esta manera, la fluorescencia de un derivado xanténico es quencheada por reacción con cobre, pero al introducir en el medio azufre se formará sulfuro de cobre y se recupera el fluoróforo de partida (Esquema 147).²¹¹

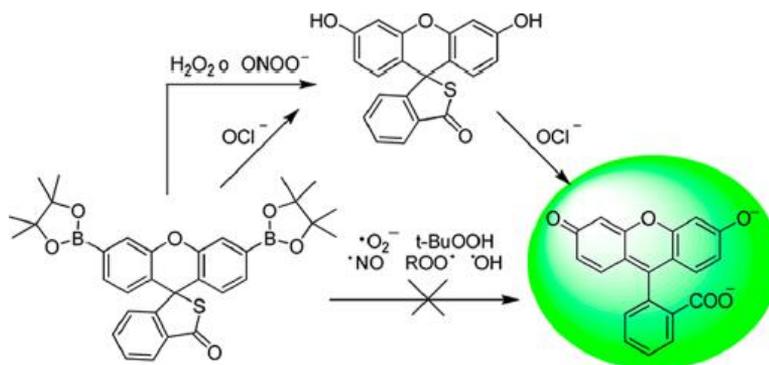


Esquema 147

Hipoclorito

El estrés oxidativo inducido por las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan un papel crucial en procesos fisiológicos y está relacionado con distintas enfermedades, como cáncer, inflamaciones crónicas y trastornos neurodegenerativos. Por este motivo, el grupo de Lee y Yoon ha desarrollado recientemente un derivado xanténico capaz de comportarse como sonda fluorescente en presencia de ácido hipocloroso (Esquema 148).

²¹¹ F. Hou, L. Huang, P. Xi, J. Cheng, X. Zhao, G. Xie, Y. Shi, F. Cheng, X. Yao, D. Bai, Z. Zeng, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 2454-2460.



Esquema 148

Su comportamiento es similar a las sondas explicadas anteriormente: el derivado xanténico de partida no presenta fluorescencia, pero al introducir en el medio este anión, aumenta la intensidad fluorescente, presentando una elevada selectividad (Figura 42).

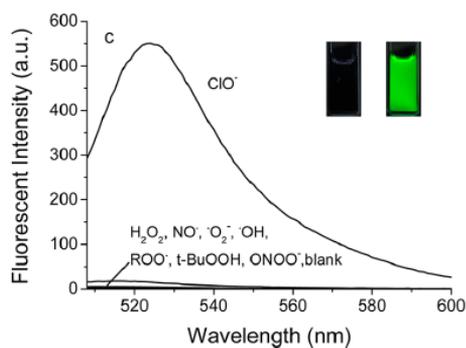


Figura 42

BLOQUE B
CAPÍTULO III. OBJETIVOS

El interés que suscitan las moléculas fluorescentes se basa en su aplicación como sondas y detectores en células vivas. Sin embargo, para que ello sea posible, el pK_a de dichos fluoróforos debe situarse cercano al pH fisiológico, para facilitar su penetración a través de la membrana celular.

Otra característica a nivel molecular es el tamaño de dichos compuestos, pues debe ser lo suficientemente pequeño para poder traspasar los poros de las membranas. Además deben de ser solubles y estables en agua, así como a la irradiación.

Hasta ahora, pocos son los compuestos que cumplen estas condiciones y que se hayan aplicado como sensores en células (fluoresceína y derivados, Tokyo Green...). En todos los casos, estas moléculas se componen de una parte xanténica y otra bencénica, pues parece necesaria esta estructura para mantener la ortogonalidad de la molécula y por tanto, las características fluorescentes.

El reconocimiento selectivo de aniones de interés biológico ha recibido una gran atención por parte de químicos y biólogos. En este aspecto, a nuestro grupo de investigación nos parece muy interesante estudiar la detección de iones fosfato, pues desempeñan un importante papel, no solo en el control del pH sanguíneo, sino también en la energética y metabolismo de las células.

En este sentido, la regulación y control de la captación de fosfato en osteoblastos es particularmente importante. Asimismo, los aniones fosfato intervienen en la transducción de señales y almacenamiento de energía en los sistemas biológicos y muchas de las enzimas comunes, tales como quinasas y fosfatasas, producen o consumen fosfato inorgánico que está también relacionado con la fosforilación de proteínas. De acuerdo con esto, la detección del aumento o disminución de la concentración de fosfato en los alrededores de estas enzimas es

una forma común de monitorizar la actividad enzimática o el proceso de fosforilación proteica.

Aunque distintos grupos de investigación han puesto su atención en la detección y discriminación de iones fosfato, hasta ahora se conocen muy pocos sensores no invasivos que muestren alta selectividad y sensibilidad en medios acuosos, y ninguno que pueda detectar cuantitativamente y a tiempo real el anión fosfato en el citoplasma de células vivas.

Teniendo en cuenta los antecedentes en este campo, los objetivos fijados en este estudio son los siguientes:

- Síntesis de nuevos 9-alkilxantenos y 9-aryl xantenos para estudiar sus propiedades de absorción y emisión.
- Cálculo del pK_a para determinar su compatibilidad con el pH fisiológico.
- Cálculo de tiempos de decaimiento y rendimiento fluorescente de estos fluoróforos.
- Medida de la fotoestabilidad a la radiación y sensibilidad a la concentración de fosfato en el medio.
- Estimar la concentración de fosfato presente en el citoplasma de células permeabilizadas, a través de la obtención de los tiempos de decaimiento de fluorescencia mediante microscopía de fluorescencia con excitación pulsada (FLIM) y la conversión en imágenes microscópicas de esos tiempos de decaimiento de fluorescencia.

Objetivos

- Seguimiento en tiempo real la penetración de fosfato soluble en el citoplasma de osteoblastos.

BLOQUE B
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. SÍNTESIS Y CARACTERÍSTICAS FOTOQUÍMICAS DE NUEVOS 9-ALQUILXANTENOS

En primer lugar, se decidió estudiar las consecuencias de sustituir el grupo bencénico por un grupo alifático electrón dador a la estructura xanténica, con objeto de determinar cómo afectaría a las propiedades ópticas y al valor de pK_a , comparándolo con la fluoresceína ($pK_a=6.43$). Según nuestra hipótesis de partida, la presencia de un grupo aromático en la posición 9 sólo es necesaria para evitar reacciones químicas sobre dicha posición pues es la más reactiva. Por otro lado, las propiedades fotofísicas de estas moléculas son intrínsecas del esqueleto xanténico y la inclusión de sustituyentes no debería modificarlas, sino tan sólo estabilizar la carga negativa de la especie aniónica.

Por ello se sintetizaron los 9-alkilxantenos **99-103** y el 9-alkenilxanteno **104** (Figura 43) a partir del sustrato comercial **105**, mediante un protocolo simple basado en la adición nucleofílica de derivados de Grignard a la xantenona **107** (Esquema 149).¹⁵³

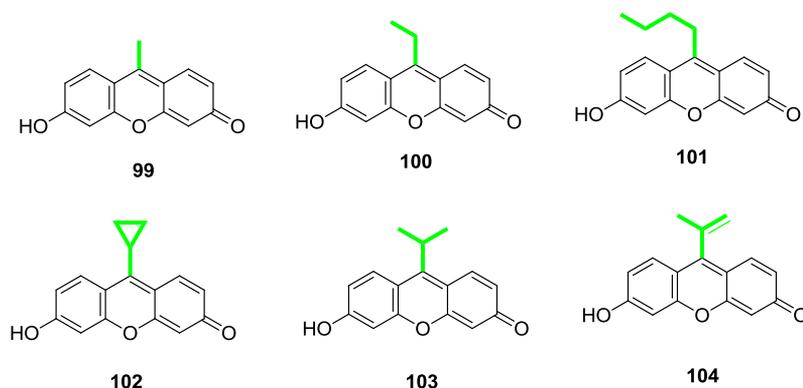
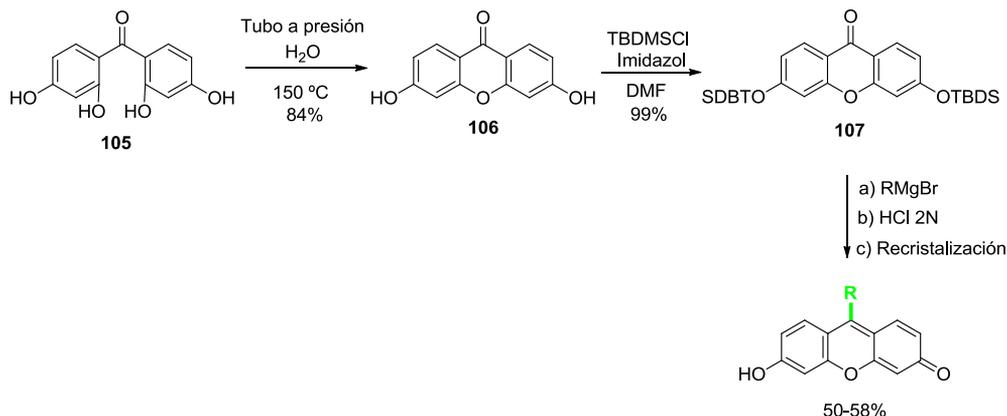


Figura 43

Bloque B. Capítulo III



Esquema 149

Una vez purificados y tras su recristalizaci3n para evitar la existencia de impurezas que alteren las medidas fotoqu3micas, se procedi3 a la caracterizaci3n espectrosc3pica mediante absorci3n y fluorescencia de todos ellos, prestando especial inter3s al pK_a y al rendimiento cu3ntico en disoluciones acuosas en buffer de fosfato 5 mM. La adici3n de tamp3n fosfato a baja concentraci3n nos permiti3 regular f3cilmente el pH de la disoluci3n, sin que se manifiesten las reacciones de transferencia prot3nica en el estado excitado caracter3sticas de estos compuestos.

En cada uno de los casos, se prepararon sendas disoluciones buffer 0.005 M de fosfato (Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4), y se adici3n3 el correspondiente fluor3foro hasta obtener una concentraci3n 5×10^{-6} M del mismo. Mezcl3ndolas y manteniendo el volumen final constante, se obtuvieron disoluciones con pH en el intervalo entre 4 y 12, recog3ndose los espectros de absorci3n y de fluorescencia de cada una. Adem3s, estas medidas se repitieron 48 horas despu3s, manteniendo las disoluciones a 5°C , para comprobar la reproducibilidad de los datos y la estabilidad de los compuestos en disoluci3n acuosa.

Aplicando este protocolo, se comenzó estudiando las propiedades ópticas del compuesto **99** y de la cetona **106**. En el primer caso, el compuesto se descompuso inmediatamente en las disoluciones, perdiendo sus propiedades fluorescentes, por lo que no se pudieron recoger datos fiables. En el segundo caso, el compuesto presentó baja absorción y débil fluorescencia en el rango de la luz visible, por lo que se descartó un estudio más exhaustivo de sus propiedades.

Por el contrario, el resto de compuestos presentaron propiedades fluorescentes similares a la fluoresceína y resultaron estables en disolución acuosa. Este hecho es debido probablemente al incremento del impedimento estérico en la posición 9 de la xantenona, evitando reacciones de adición nucleófila.

A continuación, se muestran los espectros de absorción y emisión de cada uno de ellos, en un intervalo de pH que abarca al fisiológico.

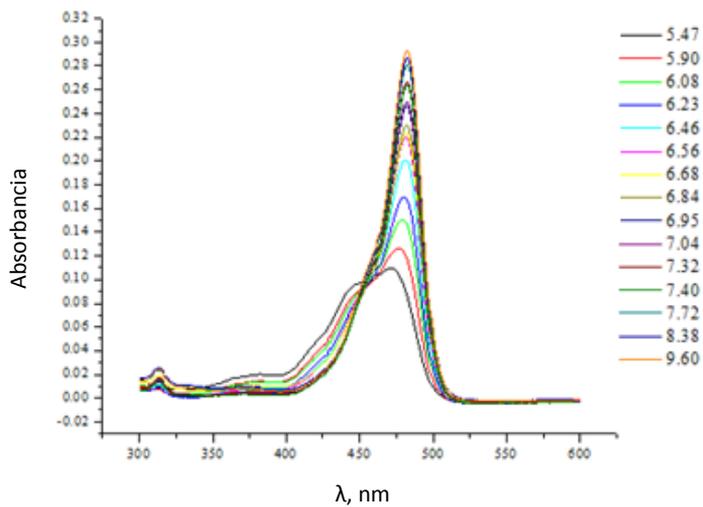
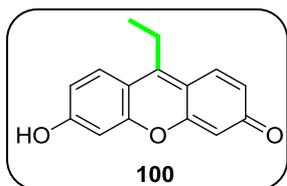


Figura 44

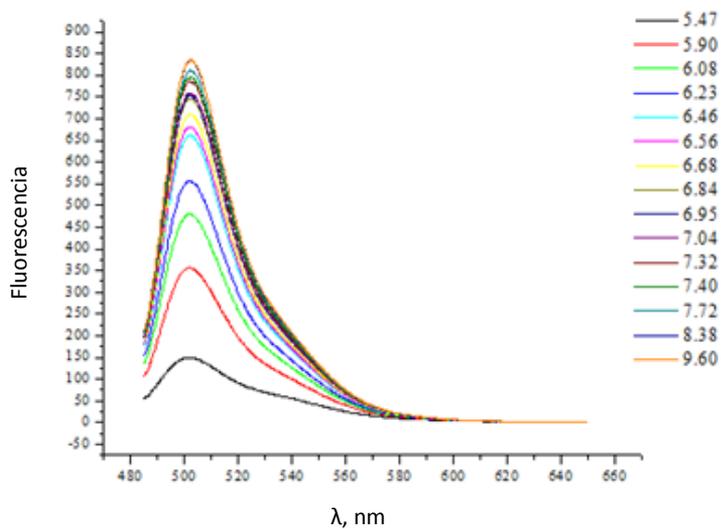
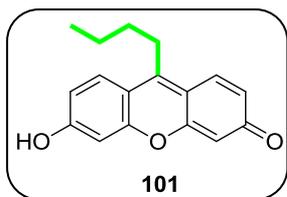


Figura 45



Absorbancia

λ , nm

Figura 46

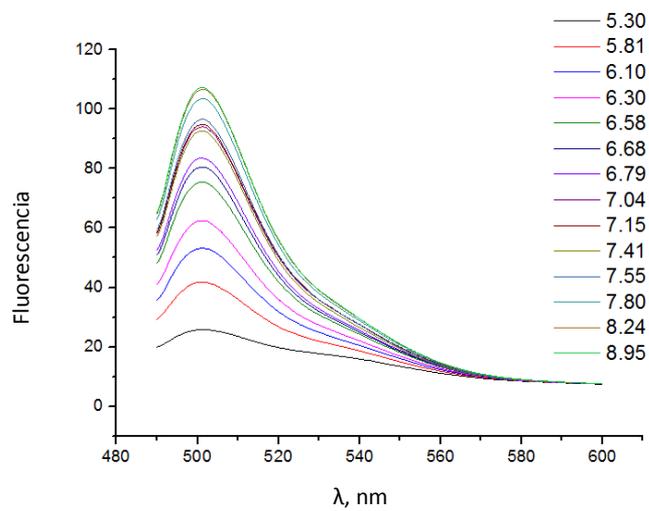


Figura 47

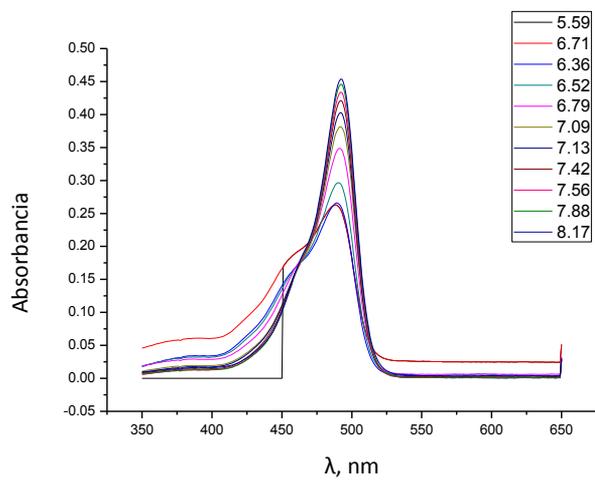
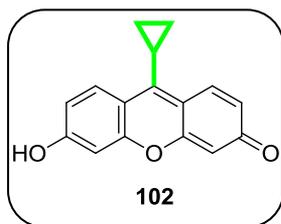


Figura 48

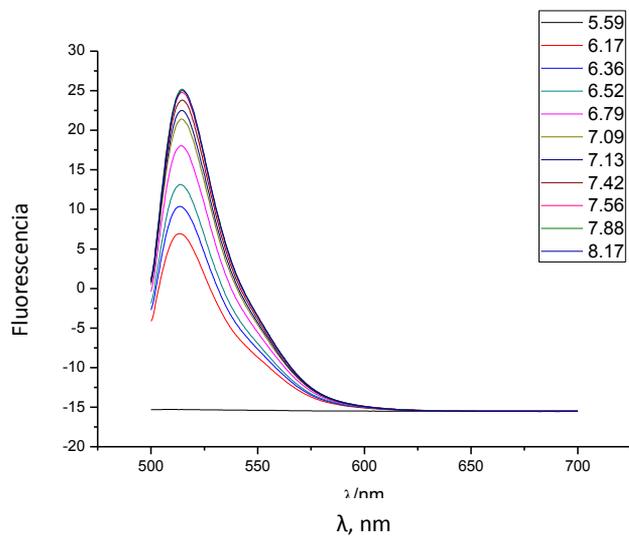


Figura 49

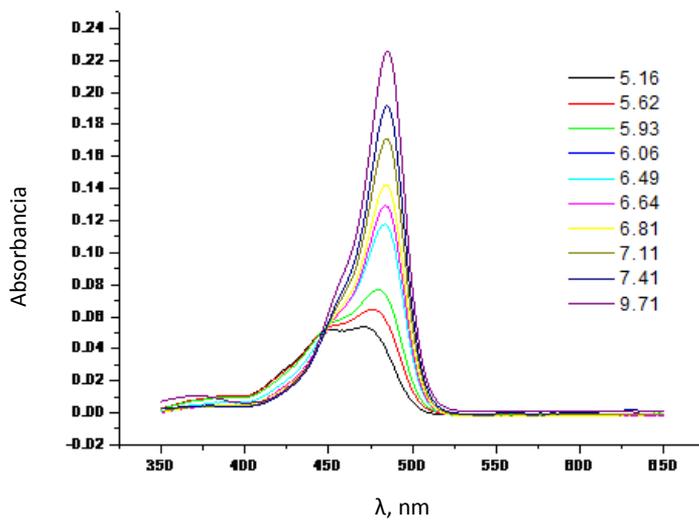
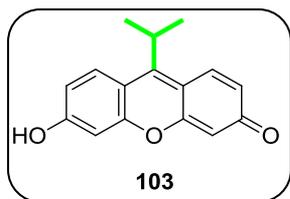


Figura 50

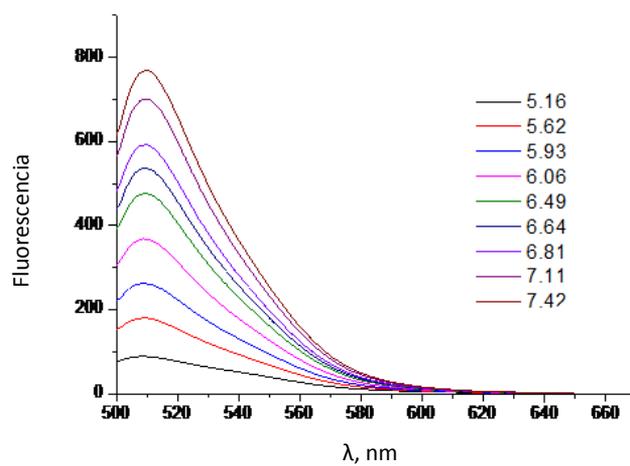


Figura 51

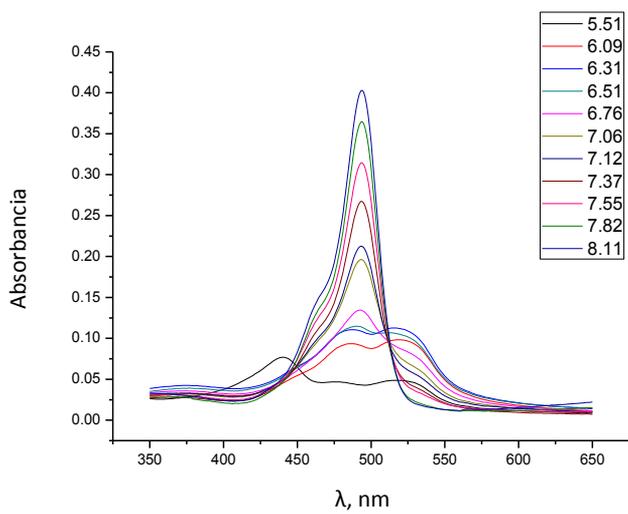
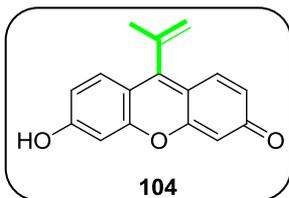


Figura 52

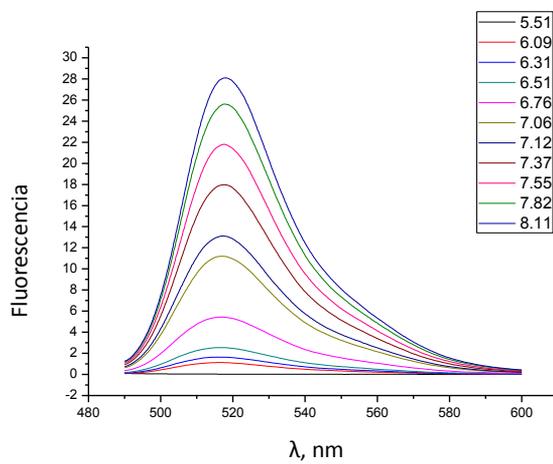


Figura 53

A partir de los datos recogidos de absorbancia y fluorescencia se realizó el cálculo del pK_a mediante ajuste no lineal por mínimos cuadrados, empleándose las siguientes ecuaciones:

$$A = C \left(\sum_i \alpha_i \varepsilon_i \right) \times d \quad \text{Ecuación 18}$$

$$I = C_T K_p [\phi_N (\alpha_C \varepsilon_C + \alpha_N \varepsilon_N) + \phi_M \alpha_M \varepsilon_M] \quad \text{Ecuación 19}$$

Donde C representa la concentración total del compuesto; α_i es la fracción molar de la forma prototópica i ; ε_i es el coeficiente de absorción molar de la forma prototópica i ; d es el paso de luz empleado en los experimentos; C_T es la concentración total de fosfato; ϕ_N y ϕ_M son las eficiencias relativas de fluorescencia de la especie neutra y aniónica a la longitud de onda de la emisión; y K_p es la constante de proporcionalidad entre los rendimientos cuánticos y las eficiencias relativas de las especies prototópicas. Los valores de ε_i dependen de la longitud de onda, mientras que los valores de α_i dependen del pH y de la constante de acidez en estado de equilibrio (valor de pK_a).

En la Ecuación 19 se relaciona la intensidad de fluorescencia con el pH, bajo el supuesto de que no se produce la reacción en el estado excitado entre la especie neutra y la aniónica (baja concentración de tampón). En este modelo se supone que los fluoróforos se comportan como fotoácidos, por lo que a valores de pH superiores a 5, la especie catiónica excitada se convierte rápidamente a especie neutra excitada, a través de reacciones de transferencia protónica muy rápidas que no se detectan en el estado estacionario. Así, la emisión sucede exclusivamente desde la especie neutra y la aniónica.

Bloque B. Capítulo III

Los rendimientos cuánticos se calcularon a partir de las medidas de fluorescencia en estado estacionario, tomando como referencia el valor de la fluorescencia en 0.1 M NaOH ($\Phi_{\text{fluor}} = 0.95$).

Finalmente, empleando la técnica de resolución temporal de la fluorescencia se determinaron los tiempos de vida de las especies neutra y aniónica.

En la Tabla 15 se resumen las características fotofísicas recogidas y calculadas.

Tabla 15

Compuesto	pK	pK*	Forma prototópica	$\lambda_{\text{mx}}(\text{abs})$	$\lambda_{\text{mx}}(\text{flu})$	τ/ns	ϕ
100	6.204±0.034	6.151±0.006	anión	482	502	3.67	0.74
			neutro	471 y 446	500	-	-
101	6.40±0.005	6.30±0.05	Anión	482	501	3.70	0.97
			neutro	468 y 446	500	2.80	0.22
102	6.47±0.026	6.38±0.02	anión	492	514	3.95	0.98
			neutro	460 y 488	Sin fluorescencia		
103	6.675±0.014	6.532±0.024	anión	485	510	3.95	0.81
			neutro	450 y 472	508	3.4	0.1
104	7.390±0.017	7.280±0.017	anión	492	518	Dos tiempos	0.15
			neutro	490 y 522	Sin fluorescencia		

Como se observa, el fluoróforo con valor más elevado de pK_a y un solo tiempo de vida es el **103**, por lo que se eligió como 9-alkilxanteno modelo para continuar el estudio de las propiedades físico-químicas de esta nueva familia.

Uno de los problemas más importantes a tener en cuenta en el uso de colorantes fluorescentes es su estabilidad tras una larga exposición a una fuente de excitación. Por ello, sometimos al compuesto **103** a un estudio de fotoestabilidad. El experimento fue llevado a cabo en glicerol, con el fin de obtener una alta viscosidad en el medio y a una concentración baja de fluoróforo (1×10^{-11} M) para evitar la renovación de moléculas susceptibles de ser excitadas, en el volumen irradiado. Las disoluciones fueron excitadas mediante una lámpara de Xe de manera continuada, con la mayor abertura de rendija disponible en el fluorímetro (20 nm) y se recogió la señal de fluorescencia con el tiempo, para compararla con la de la fluoresceína (Figura 54).

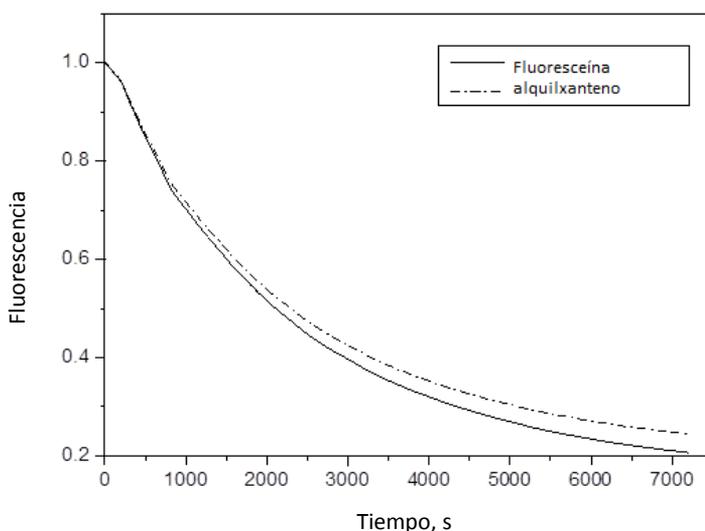


Figura 54

Como se observa, este nuevo derivado xanténico no sólo tiene un valor de pK_a superior al de la fluoresceína, sino que su fotoestabilidad es también ligeramente mayor.

Espectroscopía de absorción y equilibrio en el estado fundamental

Como paso inicial en el estudio de las propiedades fotofísicas del compuesto **103** en disolución acuosa, llevamos a cabo la caracterización espectroscópica de su estado fundamental. Así, estudiamos las constantes que definen los equilibrios ácido-base implicados (pK_a), así como los espectros de absorción de las especies prototrópicas presentes. La adquisición de los coeficientes de extinción molar, y las constantes de los equilibrios ácido-base es importante para el estudio de las reacciones en el estado excitado, ya que determinan el punto de partida tras la excitación, y por tanto influyen de manera importante en estos procesos dinámicos.

En este caso, se prepararon disoluciones acuosas en el intervalo de pH entre 1 y 9, sin tampón fosfato, y se recogieron sus espectros de absorción (Figura 55). Se obtuvieron dos puntos isobésticos: uno para bajos valores de pH a 443 nm y otro para valores moderados de pH a 450 nm. Estos datos sugieren la existencia de tres formas prototrópicas: catión (C), neutro (N), y anión (A); aunque sólo las dos últimas son relevantes desde el punto de vista biológico.

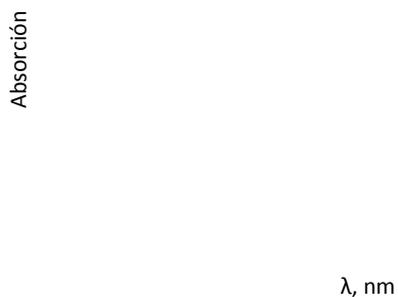
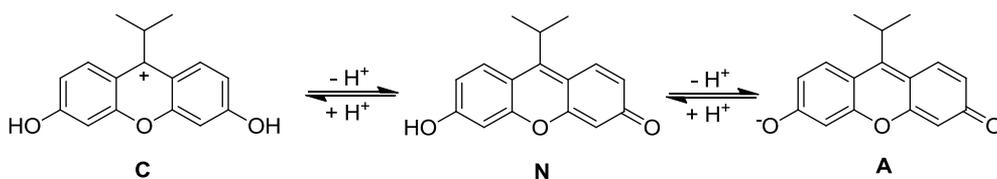


Figura 55

A pH básico se obtiene un máximo a 485 nm, correspondiente al anión. Por el contrario, a pH ácido el máximo de absorción aparece a 423 nm, y corresponde al catión. A pH moderado aparece la especie neutra, con dos máximos a 450 y 472 nm.

Los datos de absorción junto a la estructura del compuesto, sugieren los equilibrios ácido-base que se muestran en el Esquema 142, con dos valores de pK_a implicados:



Esquema 150

De acuerdo con la Ecuación 18 y los equilibrios del esquema anterior, las fracciones molares de cada especie en función del valor del pH vienen dadas por las siguientes expresiones:

$$\alpha_C = \frac{[H^+]^2}{P} \quad \text{Ecuación 20}$$

$$\alpha_N = \frac{[H^+]K_C}{P} \quad \text{Ecuación 21}$$

$$\alpha_A = \frac{K_C K_N}{P} \quad \text{Ecuación 22}$$

en donde $P = [H^+]^2 + K_C [H^+] + K_C K_N$ Ecuación 23

Las ecuaciones anteriores se ajustaron a los datos de absorbancia para determinar los coeficientes de extinción molar de las diferentes especies presentes a las diversas longitudes de onda de interés (Figura 56).

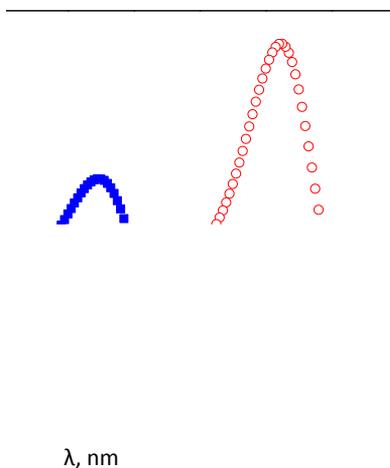


Figura 56

- *Obtención de ε_A*

Para la determinación del coeficiente de extinción molar de la especie aniónica, y teniendo como referencia el pK_a del equilibrio monoanión-dianión de la fluoresceína, se llevaron las disoluciones a valores de pH suficientemente elevados, en donde exclusivamente existe la especie aniónica. De esta manera, la Ecuación 24 puede simplificarse como:

$$A = C_T \varepsilon_A d \quad \text{Ecuación 24}$$

Se recogieron los espectros de absorción de disoluciones acuosas del colorante a concentraciones comprendidas entre 1.25×10^{-6} M y 5.0×10^{-5} M, y una concentración constante de NaOH (1.27×10^{-3} M), y se llevaron a pH 10.00.

Con los datos recogidos, se realizó un ajuste lineal A vs C_T por mínimos cuadrados, para las longitudes de onda comprendidas entre 360 y 520 nm, en intervalos de 2 nm. Al emplearse cubetas de 1 cm de paso óptico, la pendiente de las representaciones proporciona directamente el coeficiente de extinción molar de la especie aniónica (Figura 56, ○) a cada longitud de onda determinada. Todos los ajustes ofrecieron un coeficiente de regresión mayor a 0.95 y un error asociado menor del 1%.

- *Obtención de ε_N*

Los puntos isobésticos determinados experimentalmente se presentaron a 443 nm para bajos valores de pH y 560 nm a valores moderados de pH. La aparición de dos puntos isobésticos nos indica la existencia de dos equilibrios y la imposibilidad de aislar experimentalmente la especie neutra para el cálculo de su

Bloque B. Capítulo III

coeficiente de extinción molar, ya que siempre se encontrará en equilibrio con alguna de las otras dos especies. Debido a que el equilibrio entre las formas aniónica y neutra ocurre en un rango de pH cercano al fisiológico, se ha optado por estudiar este equilibrio y obtener tanto el pK_a como el coeficiente de extinción molar de la especie neutra, mediante un ajuste global de todas las curvas de A vs pH.

Para ello, se prepararon las disoluciones de los colorantes con un gradiente de valor de pH, entre 5 y 9. El procedimiento seguido para la realización del ajuste global no lineal por mínimos cuadrados, basado en el algoritmo de Levenberg-Marquardt, se explica a continuación:

Se parte de la ecuación general que proporciona la absorbancia conjunta de las especies involucradas en el equilibrio a estudiar, en este caso, la forma neutra y la forma aniónica:

$$A = C_T (\alpha_N \varepsilon_N + \alpha_A \varepsilon_A) d \quad \text{Ecuación 25}$$

donde α_i representa las fracciones molares de cada especie, que fueron anteriormente definidas en las ecuaciones 20-22. Dividiendo por la concentración total y por el coeficiente de extinción molar de la especie aniónica ya calculado y haciendo $d=1$ cm (paso de luz), se obtiene:

$$\frac{A}{C_T \varepsilon_A} = \frac{\varepsilon_N}{\varepsilon_A} \alpha_N + \alpha_A \quad \text{Ecuación 26}$$

Para cada longitud de onda el cociente $\varepsilon_N/\varepsilon_A$ varía, mientras que las constantes de los equilibrios ácido-base, implícitas en las definiciones de α_i , son comunes para todas las curvas de A vs pH. Con estas consideraciones, la ecuación usada finalmente en el ajuste es la siguiente:

$$\frac{A}{C_T \varepsilon_A} = \frac{R_N 10^{-pH} + 10^{-pK_N}}{P} \quad \text{Ecuación 27}$$

en donde $\frac{A}{C_T \varepsilon_A}$ es la variable dependiente y el pH la variable independiente. Se ha denotado por R_N al cociente $\varepsilon_N / \varepsilon_A$ y P es el polinomio dado por la Ecuación 28.

$$P = 10^{-pH} + 10^{-pK} \quad \text{Ecuación 28}$$

Una vez conocidos la relación $\varepsilon_N / \varepsilon_A$ y ε_A , es fácil la obtención del ε_N . Así se obtiene el espectro de la especie neutra mediante la representación de los coeficientes de de extinción molar a cada longitud de onda (Δ , Figura 56).

- *Obtención de ε_C*

Una vez obtenido el coeficiente de extinción molar de la especie neutra, procedimos a la obtención del coeficiente de absortividad molar para la especie catiónica. Para ello se recogieron los espectros de absorción a una concentración de 6×10^{-6} , y en un rango de pH comprendido entre 2 y 5. Partiendo de la ecuación general de absorbancia para las especies involucradas en este equilibrio:

$$A = C_T (\alpha_C \varepsilon_C + \alpha_N \varepsilon_N) d \quad \text{Ecuación 29}$$

Y una vez conocido el coeficiente de absorción molar de la especie neutra podemos transformar la ecuación anterior, dividiendo por la concentración total y por el coeficiente de extinción molar de la especie neutra, obteniéndose:

$$\frac{A}{C_T \varepsilon_N} = \frac{\varepsilon_C}{\varepsilon_N} \alpha_C + \alpha_N \quad \text{Ecuación 30}$$

La ecuación 30 se puede ajustar a la superficie de A vs pH, al objeto de obtener el cociente $\varepsilon_C/\varepsilon_N$ para cada longitud de onda y la constante del equilibrio ácido-base. Esta constante está implícita en las definiciones de α_i , y es común para todas las curvas de A vs pH. Realizando las sustituciones pertinentes, la ecuación finalmente ajustada es la siguiente:

$$\frac{A}{C_T \varepsilon_N} = \frac{R_C 10^{-pH} + 10^{-pK_C}}{P'} \quad \text{Ecuación 31}$$

en donde $\frac{A}{C_T \varepsilon_N}$ es la variable dependiente y el pH la variable independiente. Se ha denotado por R_C al cociente $\varepsilon_C/\varepsilon_N$ y P' es el polinomio dado por la Ecuación 32.

$$P' = 10^{-pH} + 10^{-pK_C} \quad \text{Ecuación 32}$$

Una vez obtenidos los valores de $\varepsilon_C/\varepsilon_N$, se obtiene el espectro de la especie catiónica representando los coeficientes de extinción molar frente a las longitudes de onda correspondientes (■, Figura 56).

Espectroscopía de emisión de fluorescencia en estado estacionario

Con objeto de conocer los perfiles espectrales de emisión de las distintas especies prototrópicas a tres longitudes de onda de excitación (420, 440 y 490 nm), se prepararon disoluciones acuosas manteniendo constante la fuerza iónica. Para recoger el espectro de emisión de la especie catiónica, se empleó HClO_4 9.5 M para alcanzar un rango de pH lo suficientemente bajo que asegurase la inexistencia de otras especies en ese intervalo. Mediante la adición de NaOH se consiguieron valores de pH alrededor de 13.

El espectro de emisión normalizado (Figura 57) muestra la existencia de diferentes perfiles en el amplio intervalo de pH abarcado. A pH elevado, en el que solo existe la especie aniónica, aparece una banda de emisión centrada en 510 nm. Una banda parecida centrada a 508 nm con un hombro alrededor de 545 nm, corresponde a la forma neutra. La banda centrada a 469 nm corresponde al catión. Aunque la forma catiónica se manifestó en los espectros de absorción a valores de pH entre 1.27 y 3.2, en el caso de la emisión solo se detectó a valores de pH muy inferiores a 1.27. Cabe destacar que la emisión de las especies neutra y catiónica en el proceso de normalización debieron multiplicarse por factores 30 y 100, respectivamente.

Fluorescencia

λ , nm

Figura 57

El fenómeno anteriormente descrito es típico de un compuesto que presenta fotoacidez, es decir que es más ácido en el estado excitado que en el estado fundamental. Por este motivo, para poder recoger la banda de emisión que se muestra en la Figura 48, se tuvieron que emplear mayores concentraciones de ácido perclórico que las que se utilizaron al recoger los espectros de absorción. Así se puede concluir que este colorante se comporta como un súper-fotoácido, tal y como ocurre con la fluoresceína.

Estudio de las reacciones de transferencia protónica en estado excitado mediante fluorimetría en estado estacionario y fluorimetría con resolución temporal

Las reacciones de intercambio protónico en estado excitado se pueden detectar comparando la gráfica de absorbancia vs pH, con la de intensidad de fluorescencia vs pH. Cuando los valores de pK_a^* en el estado excitado difieren de los correspondientes valores en el estado fundamental y si las reacciones de transferencia protónica son lo suficientemente rápidas como para ocurrir durante el tiempo de vida del estado excitado, entonces las gráficas de intensidad de fluorescencia vs pH mostrarán las transiciones inducidas por el valor de pH en el estado excitado, en adición a las transiciones en el estado fundamental observadas en las representaciones de absorbancia vs pH.

Una vez descartada la posibilidad de la presencia de reacciones en el estado fundamental, y caracterizados los perfiles espectrales de la emisión, realizamos los experimentos necesarios para demostrar la existencia o no de reacciones ESPT cuando en el medio está presente un aceptor/dador protónico apropiado que promueve estas reacciones durante el tiempo de vida del estado excitado. Decidimos emplear el tampón fosfato, pues en trabajos anteriores se había demostrado ser un aceptor / dador protónico adecuado para mediar las reacciones en fluoresceína.¹⁵¹ Además, el pK_a del tampón fosfato utilizado es 6.80 por lo que resulta muy favorable para el estudio de la mencionada reacción de transferencia protónica, dado que el valor pK_a del equilibrio entre las especie neutras y aniónicas del compuesto **97** es 6.67, calculado anteriormente. Estas características permiten que se pueda variar el valor de pH de las disoluciones experimentales con relativa amplitud y conseguir así que predomine la excitación de la especie neutra o bien, de la especie aniónica, según interese para la mejor interpretación y discusión de los resultados.

Bloque B. Capítulo III

Es posible demostrar la existencia de la reacción ESPT mediada por la presencia de un aceptor/dador protónico a partir de la Figura 58, que muestra los espectros de emisión registrados con excitación a 420 nm, de disoluciones acuosas del compuesto **103**, a concentraciones de tampón fosfato crecientes y a un valor de pH constante de 6.53.

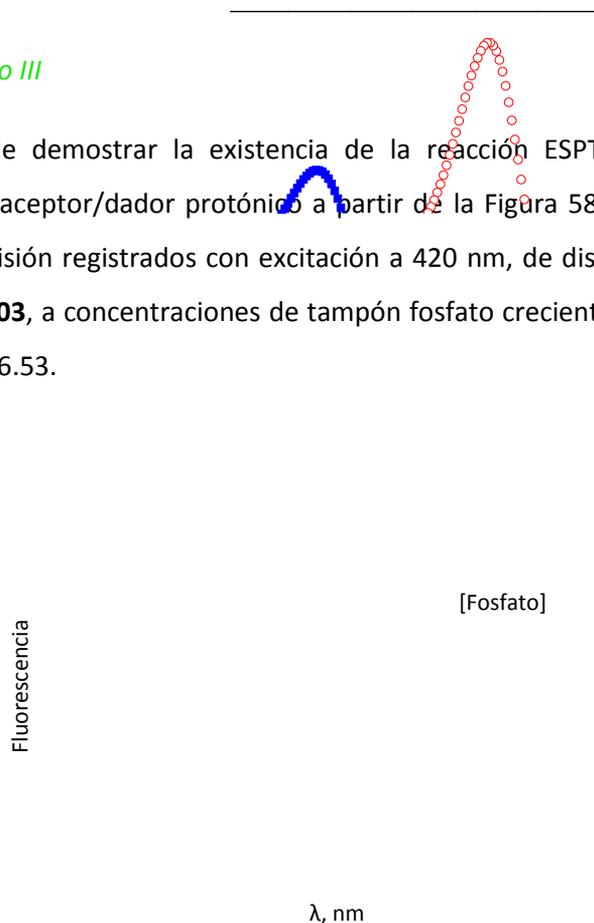


Figura 58

El incremento en la concentración de fosfato en el rango 0.01 a 0.8 M produce un aumento significativo en la intensidad del espectro de emisión, no ocurriendo lo mismo con el espectro de absorción. Esto se explica como sigue: a 420 nm la absorbancia de la especie neutra es superior a la del anión, por lo que a esa longitud de onda se excita preferentemente la especie neutra. Como al pH del experimento la relación anión/neutro en el estado excitado es superior a la relación inicialmente alcanzada por la excitación a 420 nm, la presencia de la reacción ESPT se manifiesta mediante el aumento de la concentración de la especie aniónica y consecuentemente de la intensidad de fluorescencia emitida. Además, el aumento sucesivo de la concentración de fosfato, aumenta la velocidad de la reacción ESPT, lo

que permite que, durante el tiempo de vida del estado excitado, se forme una mayor cantidad de especie aniónica. En este punto se debe de recordar que el rendimiento cuántico de la especie aniónica es muy superior al de la especie neutra.

En la Figura 59 se muestra el descenso en la emisión de la especie neutra, debido a la conversión en especie aniónica en el estado excitado. Como se puede observar, la señal de fluorescencia correspondiente a la especie neutra disminuye a 550 nm (hombro característico de la especie neutra) cuando la concentración de bufer aumenta de (–) 0.010 M a (···) 0.8 M, manteniendo constante el pH.

Fluorescencia

λ , nm

Figura 59

En resumen, la excitación preferente de la forma neutra a 420 nm provoca un aumento relativo de la concentración de dicha especie en el estado excitado, que no corresponde a la relación dictada por el pK_a^* , al pH al que se realizaron los experimentos. Entonces, durante el tiempo de vida del estado excitado, parte de cantidad de forma neutra excitada se convierte en anión excitado que, al tener

mayor rendimiento cuántico, fluoresce con mayor intensidad que la que correspondería si no se hubiese producido la reacción ESPT.

En este punto resultó de fundamental importancia el empleo de fluorimetría con resolución temporal, y en concreto, la técnica TCSPC para resolver cinéticas de procesos en el estado excitado. Asimismo, la aplicación del Análisis Global Compartimental (GCA) a los procesos fotofísicos ha resultado una herramienta de inestimable apoyo en lo que se refiere al cálculo de las constantes cinéticas y de las características espectrales de las especies implicadas. La presencia de reacciones ESPT afecta también al tiempo de decaimiento del compuesto **103**, que puede variar en función del pH y de la concentración de fosfato.

Por ello, en ausencia de bufer de fosfatos, se realizó un análisis global empleando dos longitudes de onda de excitación (440 y 485 nm) y seis longitudes de onda de emisión (505, 515, 525, 535, 545 y 555 nm), para determinar los valores de τ_i (tiempos de decaimiento) y α_i . Los datos obtenidos en un rango de pH de 1 a 5.4 se ajustaron bien a una función biexponencial, mostrando un tiempo corto de 3.4 ns y uno largo de 3.95 ns, ambos independientes del pH. Se debe de resaltar que el tiempo corto de decaimiento presentó una contribución α_i muy pequeña.

Cuando el pH supera el valor de 5.4, los decaimientos pasan a ser monoexponenciales, aunque se mantiene el tiempo de vida largo. Esto se debe al bajo valor del coeficiente de extinción, lo que junto al bajo rendimiento cuántico de la especie neutra, hace que nuestro instrumento no detecte el decaimiento de la mencionada especie neutra y por eso los decaimientos de fluorescencia a mayores valores de pH pasan a ser monoexponenciales y caracterizados por el tiempo de vida del anión τ_2 . Esto indica también que, en ausencia de búffer de fosfatos, las

reacciones ESPT no ocurren y que los decaimientos de la especie neutra y aniónica son independientes uno del otro.

Para profundizar en el estudio de las ESPT mediante fluorimetría en tiempo resuelto, se recogieron datos de los decaimientos de fluorescencia del compuesto **103** a pH= 6.53, con distintas disoluciones con concentraciones crecientes de fosfato (de 0.01 a 0.8 M), a las longitudes de onda antes citadas (Figura 60). El análisis global mostró la existencia de una tendencia biexponencial, dependiente del pH y de la concentración de fosfato, con preexponencial negativa para el decaimiento corto. Estas características son concordantes con la presencia de reacciones ESPT.

τ , ns

[Fosfato], M

Figura 60

Según los datos recogidos, el incremento en la concentración de fosfato hasta 0.8 M provoca una disminución del tiempo de decaimiento corto desde 3.9 hasta 1.6 ns, a pH= 6.53. Este hecho certifica que los parámetros de fluorescencia del compuesto en estudio son sensibles a la concentración de fosfato en el medio, por lo

que se puede emplear como sonda fluorescente en la detección de iones fosfato a pH neutro.

La solubilidad en agua y la permeabilidad de la membrana celular son factores determinantes para que un compuesto sea útil como sonda fluorescente. Por ello pensamos que, debido al pequeño tamaño del compuesto **103**, traspasaría la membrana celular espontáneamente.

Se realizó un experimento en el que se emplearon preosteoblastos en medio PBS, y se monotorizó con microscopia de imagen de tiempos de vida de fluorescencia, la penetración del colorante en el citoplasma celular. La Figura 61 demuestra que el compuesto traspasó la membrana y se acumuló en el citoplasma, sin penetrar en el núcleo celular. Sin embargo, se debe de resaltar que, debido a su pequeño tamaño el compuesto traspasó la membrana hacia el medio exterior con igual facilidad, es decir que no se retiene selectivamente en el citosol. Será necesario añadirle al compuesto algún grupo funcional que aumente su hidrofilia dentro del citoplasma, como puede ser un grupo éster, al que las esterasas de la célula hidrolicen aumentando la polaridad del compuesto e impidiendo la salida del interior celular. Como también se puede observar, se detectó mayor intensidad fluorescente en los orgánulos y vesículas celulares.

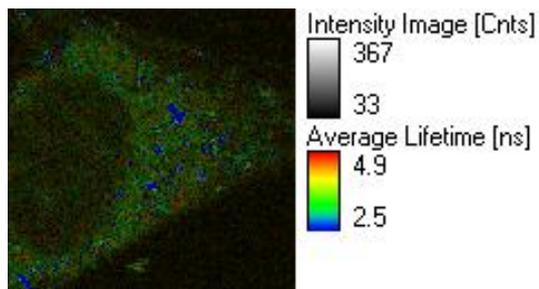


Figura 61

Esto nos permite pensar el posible empleo de este alquilxanteno **103** como detector químico de orgánulos celulares, por lo que seguimos desarrollando actualmente esta metodología con la mencionada finalidad.

2. SÍNTESIS DE NUEVOS 9-ARILXANTENOS Y SU APLICACIÓN COMO SONDAS FLUORESCENTES EN CÉLULAS VIVAS: GRANADA GREEN

En primer lugar, se decidió la síntesis de distintas estructuras arilxanténicas (**109-111**, Figura 62), similares a los Tokyo Green, pero diseñadas de tal manera que los sustituyentes garanticen un mayor efecto Hammett donador y por consiguiente, un aumento del pK_a y el concomitante aumento de sensibilidad frente al fosfato.^{212,153} Al igual que para la síntesis de alquilxantenos, partimos del sustrato comercial **105** (Esquema 151) y mediante la adición nucleofílica de derivados de Grignard a la xantenona **107** obtuvimos los productos buscados (Esquemas 152-155). El compuesto **108** se preparó como modelo para estudiar el comportamiento fotoquímico del resto de compuestos.

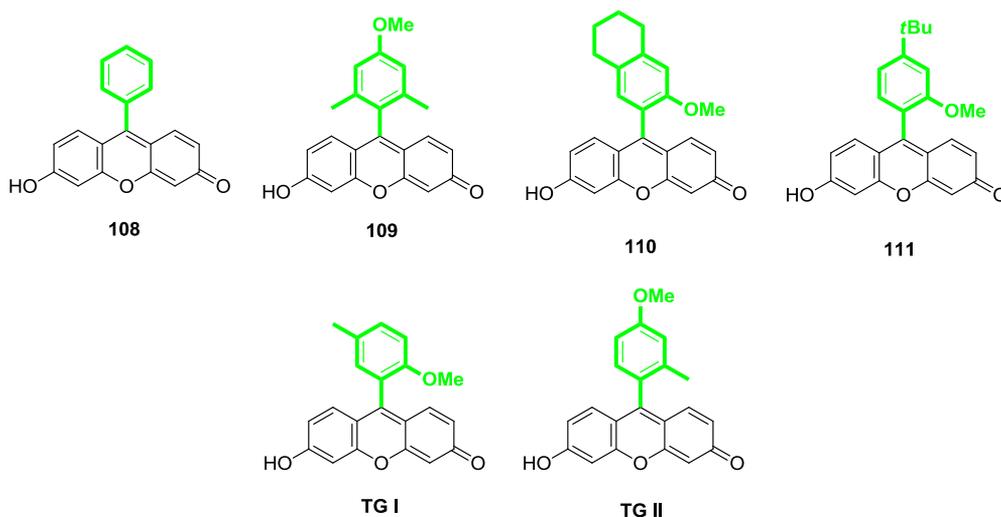
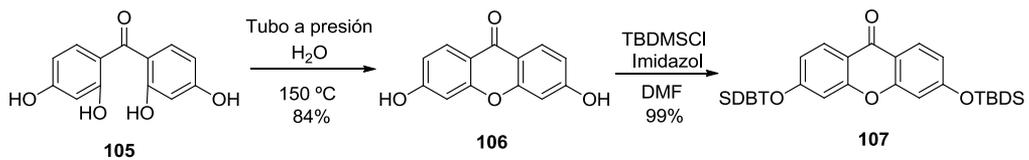
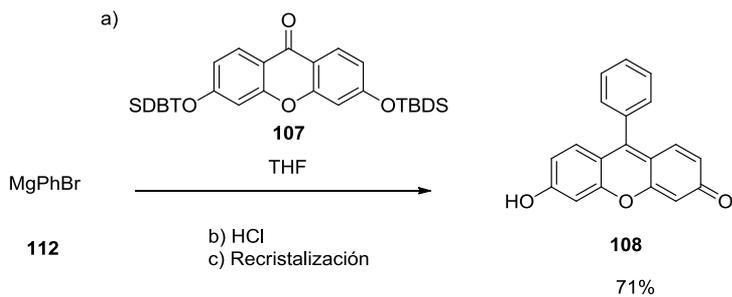


Figura 62

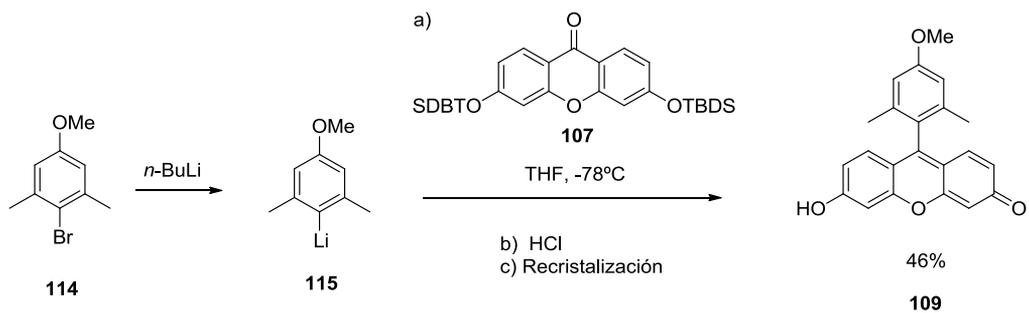
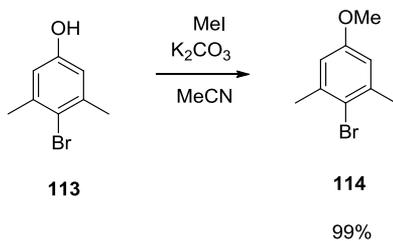
²¹² C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165-195.



Esquema 151

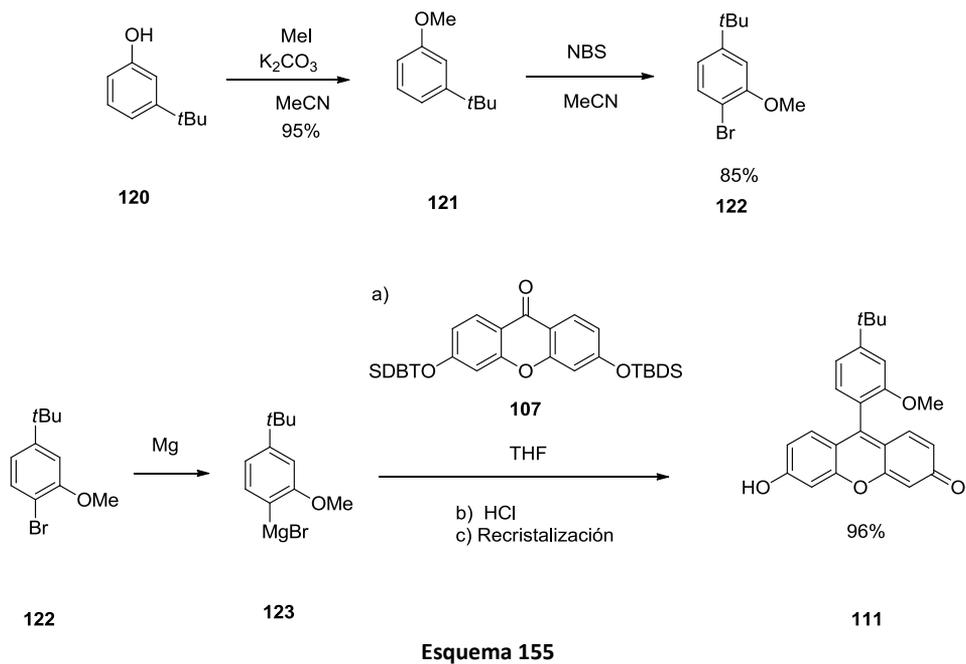
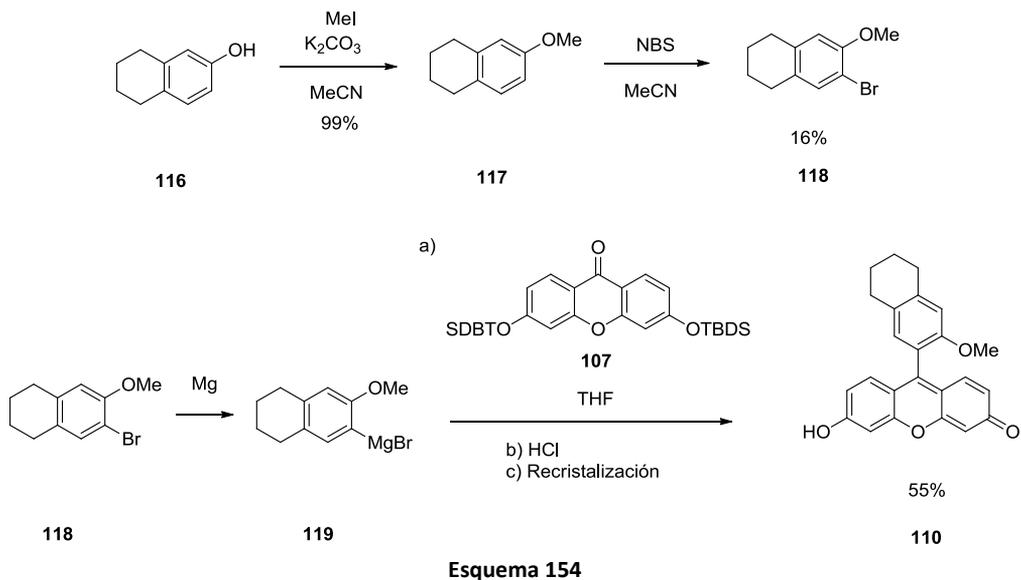


Esquema 152



Esquema 153

Bloque B. Capítulo III



Una vez purificados y tras su recristalización, se procedió a la determinación del rendimiento cuántico y del valor de pK_a empleando las técnicas de absorción y fluorescencia descritas anteriormente. Estas medidas se realizaron con disoluciones buffer de fosfato 5 mM, porque como se indicó en el capítulo III la adición de tampón fosfato a baja concentración permite regular el pH, evitando la aparición de reacciones de transferencia protónica en el estado excitado.

En cada uno de los casos, se prepararon sendas disoluciones buffer 0.005 M de fosfato, de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 , y se adicionó el correspondiente fluoróforo hasta obtener una concentración 5×10^{-6} M del mismo. Mezclándolas y manteniendo el volumen final constante, se consiguió obtener nuevas disoluciones con rango de pH entre 4-12, recogiendo los datos de absorbancia y fluorescencia de cada una. Además, estas medidas se repitieron 48 horas después, manteniendo las disoluciones a 5°C, para comprobar la reproducibilidad de los datos y la estabilidad de los compuestos en disolución acuosa.

Aplicando este protocolo, se comenzó estudiando las propiedades ópticas de los compuestos **108-111**, detectando que las estructuras **108** y **110** no presentan fluorescencia. El resto de compuestos sí resultaron fluorescentes y estables en disolución acuosa. A continuación, se presentan los espectros de absorción y emisión de cada uno de ellos.

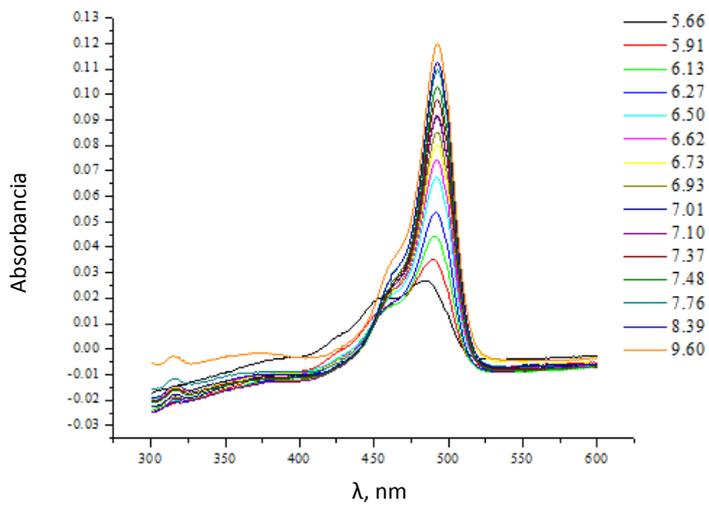
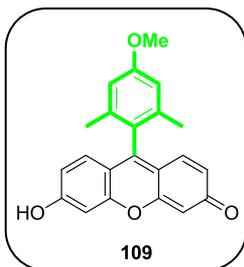


Figura 63

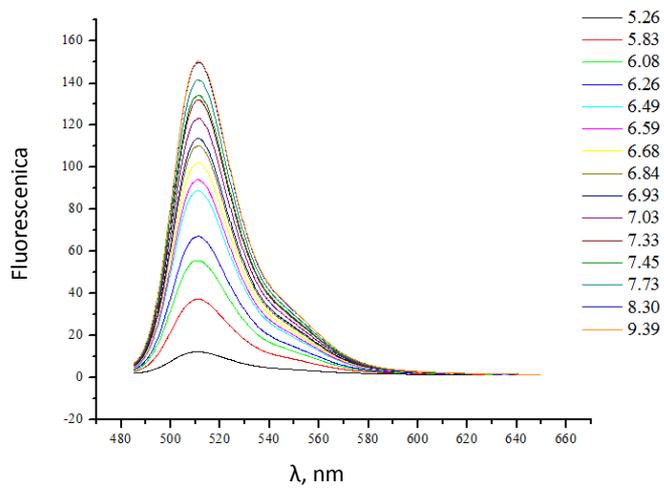
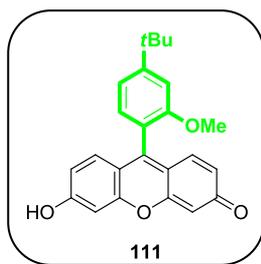


Figura 64



Absorbancia

λ , nm

Figura 65

Fluorescencia

λ , nm

Figura 66

El cálculo del pK_a a partir de los datos recogidos de absorbancia y fluorescencia se realizó mediante ajuste no lineal por mínimos cuadrados, empleando las Ecuaciones 18 y 19. Los rendimientos cuánticos se calcularon a partir de las medidas de fluorescencia en estado estacionario, tomando como referencia el valor que toma la fluoresceína a 0.1 M NaOH ($\Phi_{\text{fluo}} = 0.95$).

Finalmente, empleando la técnica de fluorescencia en tiempo resuelto se determinaron los tiempos de vida de la especie neutra. En la Tabla 16 se resumen las características fotoquímicas medidas y calculadas.

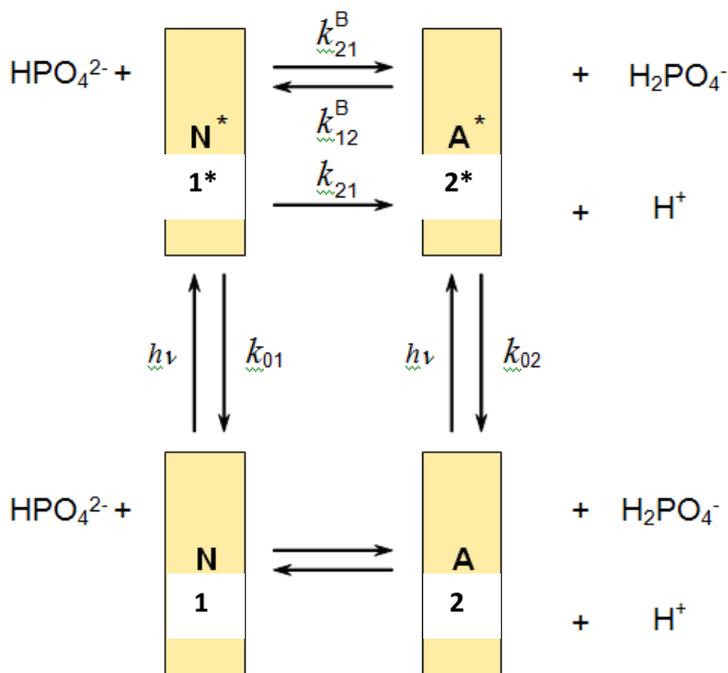
Tabla 16

Compuesto	pK	pK*	$\lambda_{\text{mx}}(\text{abs})$	$\lambda_{\text{mx}}(\text{flu})$	τ/ns	ϕ
108	6.24±0.028	6.482±0.017	492		Sin fluorescencia	
109	6.511±0.072	6.405±0.013	493	511	2.59	0.94
110		6.391±0.019			Sin fluorescencia	
111	7.39±0.074	7.26±0.019	494	517	3.97	0.97

Como se observa, el fluoróforo **111** presenta un valor elevado de pK_a , lo que indica su potencial interés como sonda fluorimétrica al pH fisiológico. Por ello, nos propusimos a continuación estudiar la existencia de reacciones de transferencia protónica en estado excitado empleando el modelo compartimental, con objeto de determinar el valor de las constantes cinéticas.

Estudio de las reacciones de transferencia protónica en el estado excitado (ESPT). Sistema compartimental

La introducción de un aceptor/dador protónico en el esquema cinético de una reacción de transferencia protónica en el estado excitado supone transformaciones de considerable importancia en las ecuaciones generales. El sistema cinético que consideramos es el que se muestra en el Esquema 156, basándose en un sistema compartimental para una reacción ESPT en dos estados y promovida por las especies de un aceptor/dador protónico.



Esquema 156[U1]

Consideramos un sistema intermolecular, dinámico, lineal e independiente del tiempo, que consiste en dos tipos de especies diferentes en el estado fundamental del compuesto **111**, con sus dos correspondientes especies en el estado excitado.

La excitación con radiación electromagnética creará las especies excitadas 1^* y 2^* . La constante de velocidad para los procesos de desactivación viene dada por $k_{oi} = k_{Fi} + k_{NRi}$, para la especie i^* . k_{21} representa la constante cinética de la disociación unimolecular $1^* \rightarrow 2^* + H^+$, mientras que k_{12} es la constante de segundo orden para la asociación $2^* + H^+ \rightarrow 1^*$. k_{21}^B y k_{12}^B son las constantes cinéticas para la transferencia protónica en el estado excitado mediada por las especies del aceptor/dador protónico. k_{21}^B es la constante de segundo orden para la reacción $1^* + HPO_4^{2-} \rightarrow 2^* + H_2PO_4^-$ y k_{12}^B es la constante de segundo orden para la reacción inversa $2^* + H_2PO_4^- \rightarrow 1^* + HPO_4^{2-}$. Todas estas constantes k_{ij} son positivas. Las formas ácida y básica del aceptor/dador protónico se representan por $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-} respectivamente, no afectan el equilibrio del estado fundamental de las formas 1 y 2 del compuesto **111**.

Al excitar el sistema por un pulso δ de luz en el tiempo $t = 0$, sin alterar significativamente las concentraciones de las especies en el estado fundamental, la evolución temporal de las concentraciones de las especies excitadas 1^* y 2^* viene expresada por la ecuación diferencial de primer orden:

$$\dot{x}(t) = Ax(t) \quad \text{con } t \geq 0 \quad \text{Ecuación 33}$$

$x(t)$ es un vector 2×1 , con las concentraciones de las especies del estado excitado 1^* y 2^* en función del tiempo:

$$\begin{pmatrix} x_1(t) \\ x_2(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} [I^*](t) \\ [2^*](t) \end{pmatrix} \quad \text{Ecuación 34}$$

La derivada temporal del vector de las concentraciones en el estado excitado es $\dot{x}(t)$. Por su parte, A es la matriz compartimental 2x2:

$$A = \begin{bmatrix} -(k_{01} + k_{21} + k_{21}^B [R]) & k_{12} [H^+] + k_{12}^B [RH] \\ k_{21} + k_{21}^B [R] & -(k_{02} + k_{12} [H^+] + k_{12}^B [RH]) \end{bmatrix} \quad \text{Ecuación 35}$$

La función impulso-respuesta del decaimiento, $f(t)$, depende de la longitud de onda de excitación (λ^{ex}) y de emisión (λ^{em}), de la concentración de protones $[H^+]$ y de la concentración total de aceptor/dador protónico ($C^{buff} = [R] + [RH]$). Esta función viene dada por (con $t \geq 0$):

$$f(t) = \kappa \tilde{c} U \exp(t\Gamma) U^{-1} \tilde{b} \quad \text{Ecuación 36}$$

En esta expresión $U = [U_1, U_2]$ es la matriz de los dos vectores propios U_i de la matriz compartimental A . γ_1 y γ_2 son los autovalores de A correspondientes a los autovectores U_1 y U_2 respectivamente, de forma que:

$$\exp(t\Gamma) = \begin{pmatrix} e^{\gamma_1 t} & 0 \\ 0 & e^{\gamma_2 t} \end{pmatrix} \quad \text{Ecuación 37}$$

\tilde{b} es el vector 2 x 1 con los elementos $\tilde{b}_i = \frac{b_i}{\sum_i b_i}$, donde b_i es la concentración de la especie i^* a tiempo cero ($b_i = x_i(0)$). Este vector \tilde{b} depende, por lo tanto, de las características de absorción de las diferentes especies en el estado fundamental, así como de las concentraciones iniciales de cada especie, y con el

valor de pH donde la dependencia vendrá dada por la constante de acidez del fluoróforo **111** en estado fundamental K_a . Los elementos \tilde{b}_i se calculan a través de la Ecuación 38, en donde ϵ_i son los coeficientes de extinción molar de las especies, mientras que α_i corresponde a la fracción molar de cada especie.

$$\tilde{b}_i = \frac{\epsilon_i \alpha_i}{\sum_i \epsilon_i \alpha_i} \quad \text{Ecuación 38}$$

Por su parte, \tilde{c} es el vector 1×2 de elementos $\tilde{c}_i(\lambda^{em}) = \frac{c_i}{\sum_i c_i}$ de los factores de emisión normalizados a cada longitud de onda de emisión, con:

$$c_i(\lambda^{em}) = k_{Fi} \int_{\Delta\lambda^{em}} \rho_i(\lambda^{em}) d\lambda^{em} \quad \text{Ecuación 39}$$

En esta expresión k_{Fi} es la constante cinética de desactivación por fluorescencia de la especie i^* , $\Delta\lambda^{em}$ es el intervalo de emisión alrededor de $d\lambda^{em}$ donde se monitoriza la señal fluorescente, y $\rho_i(\lambda^{em})$ es la densidad de emisión de i^* a la longitud de onda de emisión considerada y normalizada con el espectro completo de fluorescencia en estado estacionario F_i de la especie i^* . $\rho_i(\lambda^{em})$ viene dado por:^{196a}

$$\rho_i(\lambda^{em}) = \frac{F_i(\lambda^{em})}{\int_{\text{banda completa de emisión}} F_i d\lambda^{em}} \quad \text{Ecuación 40}$$

Finalmente, k es una constante de proporcionalidad que viene dada por la expresión:

$$\kappa = \sum_{\forall_i} b_i \sum_{\forall_i} c_i \quad \text{Ecuación 41}$$

La Ecuación 36 supone una ley biexponencial, por lo que puede escribirse de la forma:

$$f(t) = p_1 e^{\gamma_1 t} + p_2 e^{\gamma_2 t} \quad \text{Ecuación 42}$$

Los autovalores γ_i ($i=1, 2$) de la matriz compartimental A están relacionados con los tiempos de decaimiento τ_i ($i=1, 2$) según la expresión:

$$\gamma_i = -1/\tau_i \quad \text{Ecuación 43}$$

y vienen dados por:

$$\gamma_i = \frac{a_{11} + a_{22} \pm \sqrt{(a_{22} - a_{11})^2 + 4a_{12}a_{21}}}{2} \quad \text{Ecuación 44}$$

Siendo a_{ij} los elementos de la matriz compartimental A (Ecuación 35).

Así, los factores exponenciales γ_i , y consecuentemente los tiempos de decaimiento τ_i , dependen tanto de las constantes cinéticas de los procesos en el estado excitado, como del valor de pH y la concentración total de aceptor/dador protónico. Por su parte, los factores pre-exponenciales p_i son dependientes de las constantes cinéticas y de las características de excitación y emisión de cada decaimiento, es decir de \tilde{b}_i y \tilde{c}_i :

$$p_i = \kappa(\tilde{c}_1 \beta_{11} + \tilde{c}_2 \beta_{21}) \quad p_i = \kappa(\tilde{c}_1 \beta_{12} + \tilde{c}_2 \beta_{22}) \quad \text{Ecuación 45}$$

siendo:

$$\beta_{11} = \frac{[\tilde{b}_1(a_{11} + \gamma_2) - \tilde{b}_2 a_{12}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)}$$

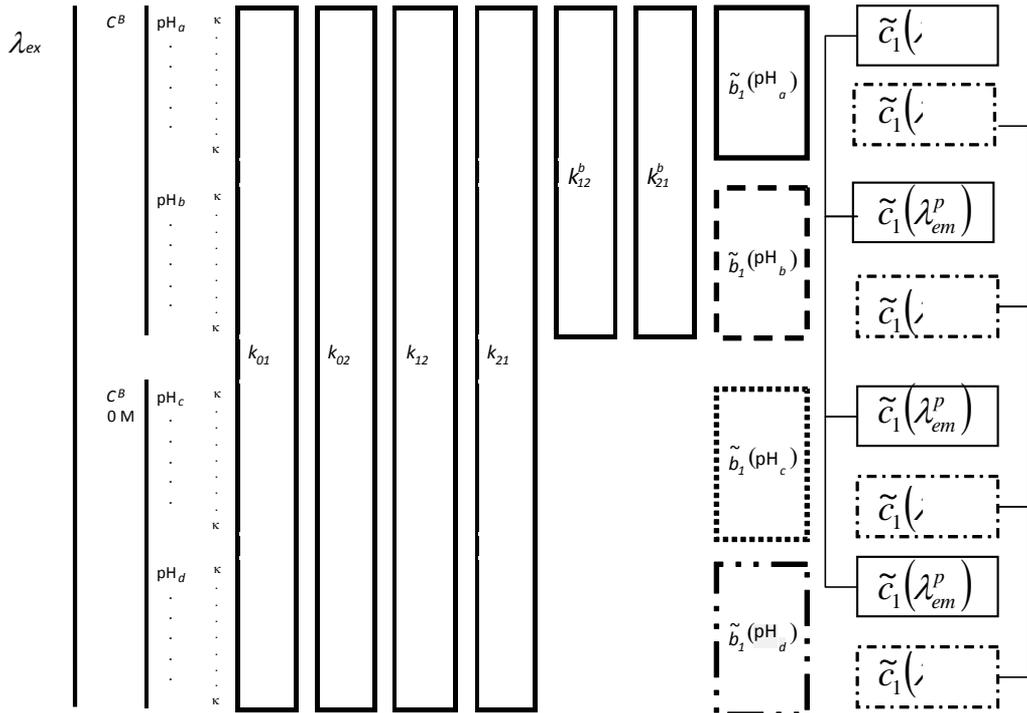
$$\beta_{12} = \frac{-[\tilde{b}_1(a_{11} + \gamma_1) - \tilde{b}_2 a_{12}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)}$$

$$\beta_{21} = \frac{[\tilde{b}_2(a_{22} + \gamma_2) - \tilde{b}_1 a_{21}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)}$$

Ecuación 46

$$\beta_{22} = \frac{-[\tilde{b}_2(a_{22} + \gamma_1) - \tilde{b}_1 a_{21}]}{(\gamma_2 - \gamma_1)}$$

Para llevar a cabo el análisis global compartimental de una superficie de decaimientos de fluorescencia concreta, los parámetros independientes que debe poseer el decaimiento son: el valor de pH, la concentración total de aceptor/dador protónico C^{buff} y su constante de acidez K_a^{buff} . Siendo κ una constante de proporcionalidad, el uso de \tilde{b}_i y \tilde{c}_i normalizados permite aprovechar las relaciones entre decaimientos a la misma longitud de onda de excitación y valor de pH, por un lado, y a la misma longitud de onda de emisión por otro lado. En la implementación del análisis global compartimental, empleando este modelo cinético, se ajustan directamente las constantes k_{01} , k_{02} , k_{21} , k_{12} , k_{21}^B y k_{12}^B , la concentración normalizada a tiempo cero de la especie 1^* , \tilde{b}_1 , a cada valor de pH y longitud de onda de excitación, y el parámetro de emisión normalizado de la especie 1^* , $\tilde{c}_1(\lambda^{em})$. Así, en el Esquema 157 se muestra la organización del ligado de los diferentes parámetros a lo largo de la superficie de decaimientos de fluorescencia completa.



Esquema 157

La relación entre los valores del pK_a^* del estado excitado y las constantes de velocidad de las reacciones en este estado k_{21} y k_{12} , viene dada por la Ecuación 47. Igualmente, las constantes cinéticas de las reacciones mediadas por las especies del aceptor/dador de protones se relaciona con el valor del pK_a^* y del pK_a^{buff} del aceptor/dador protónico a través de la ley de acción de masas, resultando la Ecuación 48.

$$K_a^* = \frac{k_{21}}{k_{12}}$$

Ecuación 47

$$pK_a^* = \log(k_{21}^B) - \log(k_{12}^B) + pK_a^{buff} \quad \text{Ecución 48}$$

Para recoger un número suficiente de datos experimentales, se prepararon disoluciones del compuesto **111** con una concentración de 6×10^{-6} M del mismo, variando la concentración de tampón fosfato (0.005, 0.15, 0.3 y 0.6 M), y se recogieron los decaimientos de fluorescencia en el intervalo de pH de 5 a 9, a iguales longitudes de onda de excitación y emisión. Los valores de las constantes cinéticas de velocidad antes descritas, calculadas por CGA mediante el modelo anterior, se recogen en la Tabla 17, en la que se incluyen además los valores calculados y publicados con anterioridad para los Tokyo Green.²¹³

Tabla 17

	TG I	TG II	111
$k_{01} (s^{-1}) \times 10^{-9}$	12.9	5.2	4.16
$k_{02} (s^{-1}) \times 10^{-9}$	0.421	0.271	0.25
$k_{21} (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{-9}$	0.003	0.011	-
$k_{12}^B (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{-9}$	0.640	0.38	0.27
$k_{21}^B (M^{-1}s^{-1}) \times 10^{-9}$	0.0261	1.8	66

²¹³ Tesis Doctoral. José Manuel Paredes Martínez, 2010.

Detección de iones fosfatos en el interior de células vivas y en tiempo real, mediante microscopía de fluorescencia (FLIM)

Para que un compuesto se comporte como una sonda FLIM intracelular, idealmente debe presentar decaimientos monoexponenciales y un tiempo de vida, en la región del pH fisiológico, dependiente de los parámetros experimentales que se desean investigar (en nuestro caso, el pH del interior celular o la concentración intracelular de fosfato).

El compuesto **111** demostró ser sensible a la concentración de iones fosfato, pues al llevar a cabo los experimentos pertinentes, se obtuvieron similares resultados a los recogidos con el compuesto **103**. Este hecho nos animó a estudiar su comportamiento en células vivas, para emplearlo como detector intracelular FLIM de los niveles de fosfato, basándonos en las reacciones de transferencia protónica (ESPT) estudiadas anteriormente.

Con este fin, se llevaron a cabo una serie de experimentos con preosteoblastos MC3T3-E1 tratados con α -toxina y bañados en PBS con distintas concentraciones de buffer de fosfato a pH 7.35. En todos los casos, observamos que el compuesto atravesaba espontáneamente la membrana celular, concentrándose en el citoplasma. Es importante destacar que el compuesto permaneció en el interior de la célula a lo largo del experimento, sin traspasar sensiblemente la membrana hacia el medio exterior.

En las imágenes recogidas durante el proceso, se muestra la sensibilidad al fosfato en el interior del citoplasma celular. Los experimentos se realizaron con las siguientes concentraciones de buffer de fosfatos: 25 mM (Figura 67), 50 mM (Figura 68), 100 mM (Figura 69) y 180 mM (Figura 70).

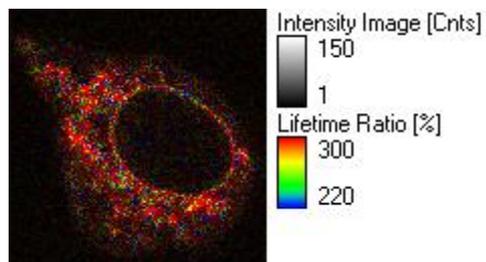


Figura 67

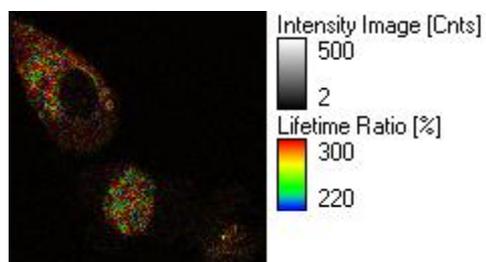


Figura 68

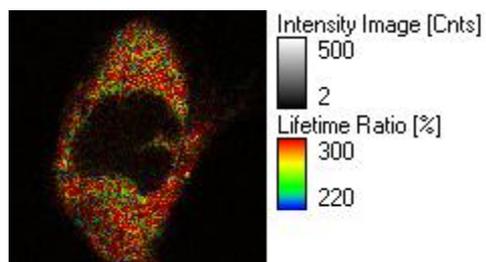


Figura 69

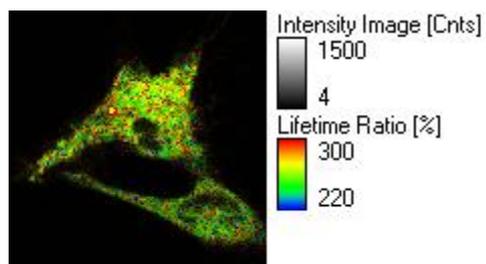


Figura 70

Como se puede observar, el color de la escala arbitrariamente establecida por nosotros, varía desde un color predominantemente rojo, hasta el color predominantemente verde, lo que indica las distintas concentraciones de fosfato en el interior celular. A partir de estos datos experimentales, que relacionan la concentración de fosfato con el tiempo de decaimiento de fluorescencia, resulta posible la determinación de la concentración existente en el interior celular. Así, esta nueva metodología se podría emplear en la detección de trastornos relacionados con el exceso o deficiencia de fosfatos en osteoblastos en fase de diferenciación. Por lo que el compuesto **111** resulta de gran interés como sonda fluorescente para detectar iones fosfato en células vivas. Por este motivo, hemos querido denominar al citado compuesto, **Granada Green (GG)** y tanto su estructura como su aplicación como sensor fluorescente se encuentran ahora bajo un proceso de patente.

SECTION B
CHAPTER III. CONCLUSIONS

We have demonstrated that 9-substituted xanthenones with different aliphatic pendant groups can be easily prepared and purified. Remarkably they retain similar fluorescent properties than fluorescein, including the ESPT reaction with phosphate, demonstrating for the first time that the requirement of an aryl group at C-9 is no longer needed. This fact represents a breakthrough in the comprehension of the optical properties of fluorescein taking into account the similarities between the properties of the new derivatives and such parent compound. Our results open the possibility to obtain a new fluorescence sensor family taking into account the patent differences in aromatic and aliphatic chemistry. Such development is currently in progress.

We also prepared and purified arylxanthenones in order to compare their fluorescent yield with fluorescein one. Based on the ESPT reaction of the GG dye in the presence of phosphate and the rapid incorporation of the dye into the cells, we measured the changes in the intracellular phosphate concentration using FLIM. By using osteoblastic MC3T3-E1, permeabilized with α -toxin, we observed a strong correlation between the fluorescence decay time from the dye and the extra- and intracellular concentration of phosphate. Our results showed that the intracellular levels of phosphate, as evidenced by the decrease in the decay time of the dye, correlated with the extracellular activity of alkaline phosphatase.

EXPERIMENTAL SECTION

GENERAL INFORMATION

For the reactions employing titanocene complex, all solvents and additives were rigorously deoxygenated prior to use. THF was previously distilled and dried over sodium. All commercially available reagents and solvents used in extraction and purification, dichlorometane, ether, hexane and ethyl acetate, were obtained from standard chemical suppliers and used without further purification. TLC was performed on aluminium-backed plates coated with silica gel 60 (230-240 mesh) with F_{254} indicator. The spots were visualized with UV light (254 nm) and/or staining with Ce/Mo reagent or phosphomolybdic acid solution and subsequent heating.

NMR Spectra were measured at room temperature. ^1H NMR spectra were recorded at 300, 400 or 500 MHz. Chemical shifts are reported in ppm using residual solvent peak as reference (CHCl_3 : 7.26). Data are reported as follows: chemical shift, multiplicity (s: singlet, bs: broad singlet, d: doublet, t: triplet, q: quartet, quint: quintuplet; m: multiplet, dd: doublet of doublets, dt: doublet of triplets, dq: doublet of quartets, td: triplet of doublets), coupling constant (J in Hz) and integration. ^{13}C -NMR spectra were recorded at 75, 100 or 125 MHz using broadband proton decoupling and chemical shifts are reported in ppm using residual solvent peaks as reference (CDCl_3 : 77.16). Carbon multiplicities were assigned by DEPT techniques.

High resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a Micromass AutoSpec using EI at 70eV or FAB.

Experimental Section

CHAPTER I

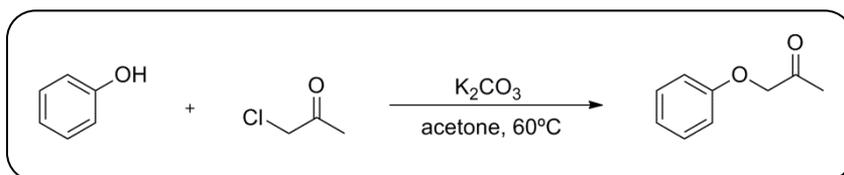
General procedure for the synthesis of allyl carbonates from alcohols (GP 1):

Ethylchloroformate (2.0 mmol) was slowly added to a mixture of 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (0.3 mmol), pyridine (3.0 mmol) and the corresponding alcohol (1.0 mmol) in dry CH₂Cl₂ (25 mL). The reaction mixture was stirred for 3 h and subsequently washed with 10% aqueous HCl solution, 10% aqueous NaOH solution and brine. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄ and the solvent was removed in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane) to give the corresponding carbonate.

Following GP 1 compounds **3**,²¹⁴ **24**,²¹⁵ **25** and **26**²¹⁶ were prepared.

Starting materials:

The following known compounds were isolated as pure samples and NMR spectra matched those previously reported **22**,⁸⁵ **27** and **29**.²¹⁷

Synthesis of compound 20:

²¹⁴ G. Cravotto, G. Giovenzana, M. Sisti, G. Palmisano, *Tetrahedron*. **1998**, *54*, 1639-1646.

²¹⁵ M. J. Pouy, A. Leitner, D. J. Weix, S. Ueno, J. F. Hartwig, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3949-3952.

²¹⁶ S. Cacchi, G. Fabrizi, P. Pace, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1001-1004.

²¹⁷ J. L. C. Kachinsky, R. G. Salomon, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1393-1401.

Experimental Section

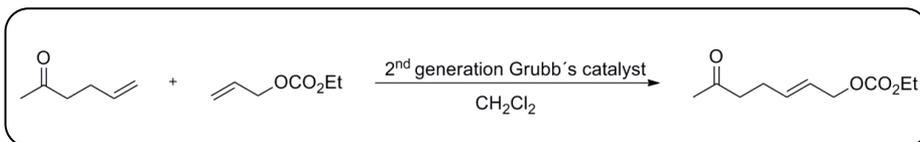
A mixture of phenol (470 mg, 5 mmol), chloroacetone (693 mg, 7.5 mmol) and K_2CO_3 (1 g, 7.5 mmol) in acetone (10 mL) was stirred at 60°C for 3 hours. Then, K_2CO_3 was filtered and the solvent removed under reduced pressure. The residue was submitted to flash chromatography (EtOAc:Hexane, 1:9) to give **20** (618 mg, 82%) as a colourless oil.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.31 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.00 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.54 (s, 2H), 2.29 (s, 3H).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 205.7 (C), 157.7 (C), 129.7 (2xCH), 121.7 (CH), 114.5 (2xCH), 72.9 (CH_2), 26.6 (CH_3).

HRMS (EI): m/z calcd. for $C_9H_{10}O_2$ [M] $^+$: 150.0681; found:150.0681.

Synthesis of compound **31**:

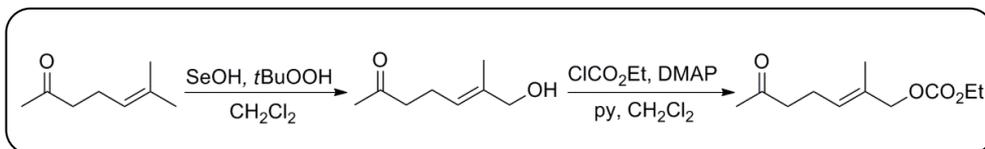


Allyl ethyl carbonate (260 mg, 2 mmol) was added to a solution of Grubb's 2nd generation catalyst (21 mg, 0.025 mmol) and 5-hexen-2-one (98 mg, 1 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) and the mixture was stirred under reflux for 24h. The solvent was removed and the residue was submitted to flash chromatography (EtOAc: Hexane, 1:9) to give **31** (70 mg, 78 %) as a colourless oil.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.85-5.74 (m, 1H), 5.65-5.56 (m, 1H), 4.54 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 4.18 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.53 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.32 (dd, J = 14.1, 7.1 Hz, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 207.8 (C), 155.1 (C), 135.1 (CH), 124.4 (CH), 68.2 (CH_2), 64.1 (CH_2), 42.6 (CH_2), 30.1 (CH_2), 26.3 (CH_3), 14.4 (CH_3).

HRMS (EI): m/z calcd. for $C_7H_{10}O$ [$M-OCO_2Et$] $^+$: 110.0732; found:110.0713.

Synthesis of compound **33**:

To a solution of 6-methylhept-5-en-2-one (2 g, 15.8 mmol) in CH_2Cl_2 (100 mL) *t*-BuOOH (1.9 mL, 15.8 mmol) was added. The solution was stirred vigorously and then SeO_2 (1.76 g, 15.8 mmol) was added. The resulting mixture was stirred for 2 hours and then was diluted with CH_2Cl_2 , washed with NaOH (10%) and dried over anhydrous Na_2SO_4 .

The crude alcohol (642 mg, 4.6 mmol), DMAP (111 mg, 0.9 mmol), pyridine (711 mg, 9 mmol), were dissolved in CH_2Cl_2 and ethylchloroformate (500 mg, 4.6 mmol) was slowly added to the mixture. The reaction was stirred for 4 h and then subsequently washed with 10 % aqueous HCl, 10% aqueous NaOH and brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 and the solvent removed. The residue was submitted to flash chromatography (EtOAc: Hexane, 2:8) to give **33** (925 mg, 94 %) as a colourless oil.

$^1\text{H-NMR}$ (401 MHz, CDCl_3): δ = 5.41 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 4.45 (s, 2H), 4.15 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.46 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.27 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.10 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 207.9 (C), 155.0 (C), 130.6 (C), 128.2 (CH), 73.0 (CH_2), 63.8 (CH_2), 42.7 (CH_2), 29.8 (CH_3), 21.8 (CH_2), 14.2 (CH_3), 13.7 (CH_3).

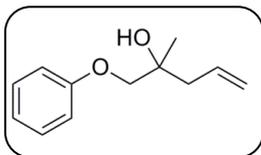
HRMS (EI): m/z calcd. for $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_2$ [$\text{M-OCO}_2\text{Et}$] $^+$: 141.0916; found: 141.0917.

Experimental Section

General procedure for the Ni⁰/Ti^{III}-catalyzed allylation of carbonyl compounds with carbonates (GP 2):

Rigorously dried and deoxygenated THF (20 mL) was added to a mixture of Cp₂TiCl₂ (0.4 mmol), Ni(PPh₃)₂Cl₂ (0.1 mmol), and Mn dust (8.0 mmol) under Ar atmosphere, and the suspension was stirred at room temperature until it turned dark green (about 5 min). A solution of the carbonyl compound (1.0 mmol), the allyl carbonate (4.0 mmol), and 2,4,6-collidine (7.0 mmol) in THF (2 mL) and Me₃SiCl (4.0 mmol) were then added. The mixture was stirred at room temperature for 16 h and then diluted with EtOAc and washed with 10% aqueous HCl solution and brine. The organic phase was dried with anhydrous Na₂SO₄, and the solvent was removed in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane).

Following GP 2 compounds **7**, **9**, **11**, **13**, **15**, **17** and **19** were isolated as pure samples and NMR spectra matched those previously reported.⁸⁵



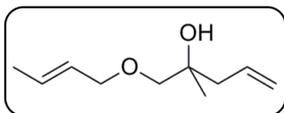
Compound 21

Following GP 2, **21** was obtained as a colourless oil.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.43-7.28 (m, 5H), 5.74 (dt, J=18.0, 9.1 Hz, 1H), 5.10 (d, J=10.2 Hz, 1H), 4.96 (d, J=17.0 Hz, 1H), 3.85 (s, 6H), 3.21-3.14 (m, 1H), 2.79-2.70 (m, 1 H), 2.66 (d, J= 11.0 Hz, 1 H), 2.58 (d, J=10.6 Hz, 1H), 2.08 (ddd, J=13.4, 4.5, 2.3 Hz, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 167.8 (C), 163.3 (C), 130.1 (C), 129.2 (CH), 123.7 (2xCH), 120.4 (2xCH), 123.4 (CH), 114.3 (CH₂), 87.8 (C), 53.1 (C), 48.0 (2xCH₃), 46.1 (CH), 43.8 (CH₂), 29.2 (CH₂).

HRMS (EI): *m/z* calcd. for C₁₇H₂₀O₅Na [M+Na]⁺: 327.1208; found: 327.1210.

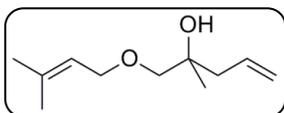
**Compound 28**

Following GP 2, **28** was obtained as a colourless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.85 (dt, *J* = 23.6, 7.4 Hz, 1H), 5.70 (dt, *J* = 11.9, 5.9 Hz, 1H), 5.64-5.52 (m, 1H), 5.15-5.03 (m, 2H), 3.95 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.28 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 3.22 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 2.38-2.17 (m, 3H), 1.72 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.16 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 134.1 (CH), 129.5 (CH), 127.6 (CH), 118.2 (CH₂), 76.6 (CH₂), 72.2 (CH₂), 71.8 (C), 43.8 (CH₂), 23.9 (CH₃), 17.9 (CH₃).

LRMS (EI): *m/z* calcd. for C₁₀H₁₈O₂ [M]⁺: 170.13; found: 170.13. A good HRMS of this compound could not be obtained.

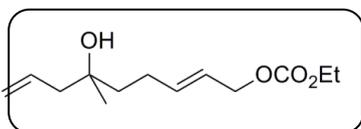
**Compound 30**

Following GP 2, **30** was obtained as a colourless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.85 (ddd, *J* = 23.1, 15.6, 7.9 Hz, 1H), 5.34 (dd, *J* = 6.8, 5.5 Hz, 1H), 5.10 (dd, *J* = 13.6, 3.5 Hz, 2H), 4.00 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.28 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.22 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 2.40-2.16 (m, 3H), 1.75 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.16 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 137.0 (C), 134.1 (CH), 121.2 (CH), 118.2 (CH₂), 76.6 (CH₂), 71.8 (C), 67.9 (CH₂), 43.8 (CH₂), 25.8 (CH₃), 23.8 (CH₃), 18.2 (CH₃).

LRMS (EI): *m/z* calcd. for C₁₁H₂₀O₂ [M]⁺: 184.15; found: 184.15. A good HRMS of this compound could not be obtained.

**Compound 32**

Following GP 2, **32** was obtained as a colourless oil.

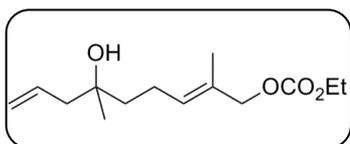
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.83 (tt, *J* = 7.1, 4.0 Hz, 2H), 5.59 (dt, *J* = 19.8, 5.9 Hz, 1H), 5.11 (dd, *J* = 13.4, 12.1 Hz, 2H), 4.54 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.17 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H),

Experimental Section

2.21 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.18-2.10 (m, 2H), 1.58 (bs, 1H), 1.53 (dd, $J = 10.5, 6.3$ Hz, 2H), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.16 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 155.1$ (C), 137.2 (CH), 133.9 (CH), 123.5 (CH), 119.0 (CH₂), 72.0 (C), 68.4 (CH₂), 64.0 (CH₂), 46.5 (CH₂), 40.7 (CH₂), 26.8 (CH₂), 26.7 (CH₃), 14.3 (CH₃).

HRMS (EI): m/z calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{O}_4$ $[\text{M}-1]^+$: 241.1440; found 241.1449.



Compound 34

Following GP 2, **34** was obtained as a colourless oil.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.94$ -5.78 (m, 1H), 5.51 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.22-5.05 (m, 2H), 4.50 (s, 2H), 4.19 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.23 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.13 (dd, $J = 16.5, 7.1$ Hz, 2H), 1.69 (s, 3H), 1.55-1.43 (m, 3H), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.19 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 155.3$ (C), 133.9 (CH), 130.4 (CH), 129.8 (C), 118.9 (CH₂), 73.6 (CH₂), 72.1 (C), 64.0 (CH₂), 46.5 (CH₂), 41.0 (CH₂), 26.8 (CH₃), 22.4 (CH₂), 14.4 (CH₃), 14.0 (CH₃).

HRMS (EI): m/z calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}$ $[\text{M}-\text{OCO}_2\text{Et}]^+$: 166.1358; found: 166.1358.

CHAPTER II

General procedure for the epoxidation of alkenes with MCPBA (GP 3):

A sample of MCPBA (2 mmol, 70% purity) was added to a solution of alkene (1 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) and the mixture was stirred at room temperature until the starting material was consumed (checked by TLC). CH₂Cl₂ was then added and the solution washed with 2N NaOH. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄ and the solvent was removed in vacuo. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane) to give the corresponding epoxide.

Following GP 3 compounds **78**,²¹⁸ **81**,²¹⁹ **84**,²²⁰ **85**,¹¹⁰ **86**,²¹⁸ **88**,²²¹ **87**⁴¹ and **95**²²² were prepared.

General procedure for preparation of epoxides from ketones (GP 4):

A solution of ketone (1 mmol), CH₂Br₂ (2 mmol) in THF (15 mL) was cooled to -78 °C and then BuLi (2.5M in hexane, 1.1 mmol) was added dropwise for 5 min. The mixture was stirred for 5 min. at -78 °C and then for 24 h at rt. Then, AcOEt was then added and the organic layer was washed with saturated solution of NH₄Cl, dried over anhydrous Na₂SO₄ and the solvent removed. The residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane) to give the corresponding epoxide.

Following GP 4 compound **82**²²³ was prepared.

²¹⁸ T. Jiménez, A. G. Campaña, B. Bazdi, M. Paradas, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, J. E. Oltra, R. Robles, J. Justicia, J. M. Cuerva, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 22, 4288-4295.

²¹⁹ J. Nokami, K. Maruoka, T. Souda, N. Tanaka, *Tetrahedron* **2007**, 63, 9016–9022.

²²⁰ T. Mukaiyama, K. Imagawa, T. Yamada, T. Toshihiro, *Chem. Lett.* **1992**, 2, 231-234.

²²¹ K. Surenda, C. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8865-8869.

²²² T. Isaka, m H. Hasegawa, H. Toshima, *Bios. Biotechnol. Biochem.* **2001**, 75, 2213-2222.

Experimental Section

Starting materials:

The following known compounds were isolated as pure samples and NMR spectra matched those previously reported **37**¹¹⁹ and **73**.²²⁴

General procedure for pinacol cross coupling reaction of aromatic aldehydes and ketones mediated by titanocene(IV) complex (GP 5):

Strictly deoxygenated THF (20 mL) was added to a mixture of titanocene(IV) complex (1 mmol) and Zn dust (8 mmol) under an Ar atmosphere and the suspension was stirred at room temperature until it turned lime green (after about 10 min). Then, a solution of aldehyde or keton (1 mmol) in THF (1 mL) was added and the solution was stirred for 16h. The reaction was then quenched with brine and extracted with EtOAc, dried (anhyd. Na₂SO₄) and the solvent removed. Products were purified by flash chromatography on silicagel (hexane/EtOAc) and characterised by spectroscopic techniques.

Following GP 5 compounds **46**,²²⁵ **47**,²²⁶ **48**,²²⁷ **49**,²²⁸ **50**,¹⁰⁵ **51**²²⁹ and **52**²³⁰ were isolated as pure samples and NMR spectra matched those previously reported.

²²³ I. Osprian, W. Stampfer, K. Faber, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 3779–3785.

²²⁴ G. R. Labadie, R. Viswanathan, C. D. Poulter, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9291 – 9297.

²²⁵ S.Voltrova, J. Srogl, *Synlett*, **2013**, *24*, 394-396.

²²⁶ A. Clerici, N. Pastori, O. Porta, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1825 – 1828.

²²⁷ B. Basu, S. Das, Saja, P. Das, A. Nanda, K. Ashish, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8591 – 8593.

²²⁸ K. Fukui, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3176 - 3181

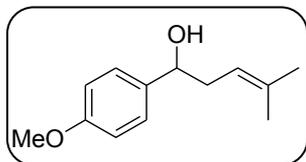
²²⁹ T. Hayashi, K. Sasaki, *Chem. Lett.* **2011**, *40*, 492 – 494.

²³⁰ H. Mosher, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2154-2155.

General procedure for Barbier-type prenylations of aromatic aldehydes and ketones mediated by titanocene(IV) carboxylate (GP 6):

Strictly deoxygenated THF (10 mL) was added to a mixture of titanocene(IV) carboxylate (1 mmol) and Mn dust (8 mmol) under an Ar atmosphere and the suspension was stirred at room temperature until it turned lime green (after about 10 min). Then, a solution of aldehyde or keton (1 mmol) in THF (1 mL) was added. Subsequently, a solution of prenyl's type chloride (1.5 mmol) in THF (0.5M) was slowly added and the solution was stirred for 2h. The reaction was then quenched with saturated solution of HCl 10 % and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried (anhyd. Na₂SO₄) and the solvent removed. Products were purified by flash chromatography on silicagel (hexane/EtOAc) and characterised by spectroscopic techniques.

Following GP 6 compounds **54**,²³¹ **57**,²³² **63**,²³³ **65**,²³³ **67**,²³² **69**²³³ and **71**²³³ were isolated as pure samples and NMR spectra matched those previously reported.



Compound 61

Following GP 6, **61** was obtained as a colourless oil.

²³¹ M. Atobe, F. Amemiya, K. Fuse, T. Kashiwagi, T. Fuchigami, M. Matsumoto, C. Kurodo, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4256-4265.

²³² F. Amemiya, K. Fuse, T. Fuchigami, M. Atobe, *Chem. Comm.* **2010**, *46*, 2730-2732.

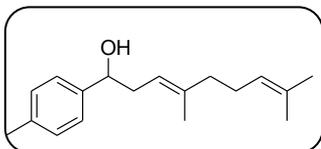
²³³ L-H. Zhao, H-S. Jin, L-J. Wan, L-H. Zhang, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1831-1837.

Experimental Section

General procedure for Barbier-type allylation of aldehydes and epoxides mediated by titanocen(IV) carboxylate (GP 7):

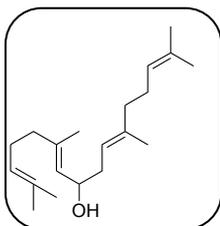
Strictly deoxygenated THF (10 mL) was added to a mixture of titanocene(IV) carboxylate (1.5 mmol) and Mn dust (8 mmol) under an Ar atmosphere and the suspension was stirred at room temperature until it turned lime green (after about 10 min). Then, a solution of aldehyde (1 mmol) in THF (1 mL) was added. Subsequently, a solution of prenyl's type chloride (3 mmol) in THF (0.5M) was slowly added and the solution was stirred for 2h. The reaction was then quenched with saturated solution of brine and extracted with EtOAc. The organic layer was dried (anhyd. Na₂SO₄) and the solvent removed. Products were purified by flash chromatography on silicagel (hexane/EtOAc) and characterised by spectroscopic techniques.

Following GP 7 compounds **68** and **74** were isolated as pure samples and NMR spectra matched those previously reported.⁹



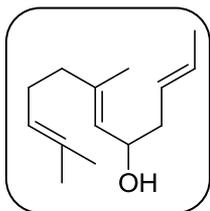
Compound 59

Following GP 7, **59** was obtained as a colourless oil.



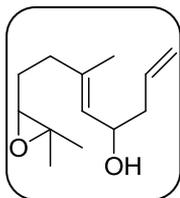
Compound 72

Following GP 7, **72** was obtained as a colourless oil.



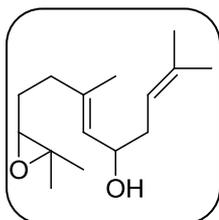
Compound 77

Following GP 7, **77** was obtained as a colourless oil.



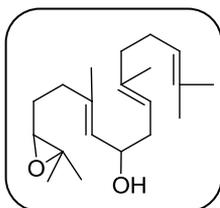
Compound 90

Following GP 7, **90** was obtained as a colourless oil.



Compound 91

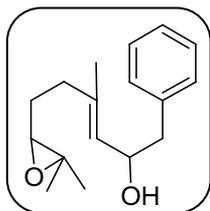
Following GP 7, **91** was obtained as a colourless oil.



Compound 92

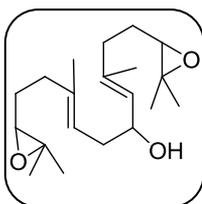
Following GP 7, **92** was obtained as a colourless oil.

Experimental Section



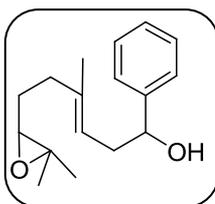
Compound 94

Following GP 7, **94** was obtained as a colourless oil.



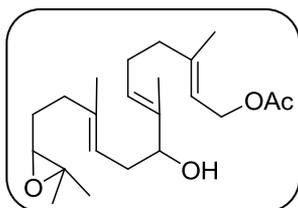
Compound 96

Following GP 7, **96** was obtained as a colourless oil.



Compound 97

Following GP 7, **97** was obtained as a colourless oil.



Compound 98

Following GP 7, **98** was obtained as a colourless oil.

CHAPTER III

General procedure for the physic-chemical studies of fluorescent compounds**(GP 8):***Preparation of Solutions*

For the preparation of phosphate buffer ($pK_a^B = 6.8$ at 20 °C) solutions, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (both Fluka, puriss. p.a.) were used. To adjust the pH of the aqueous solutions (without buffer), 0.01 M solutions of NaOH and HClO_4 were used. NaOH (Aldrich, platelets) and HClO_4 (Aldrich) were of spectroscopic grade quality. All the solutions were performed using Milli-Q water as solvent. All the chemicals were used as received without further purification.

A stock solution of all compounds (10^{-4} M) in 1.27×10^{-3} M NaOH was prepared using MilliQ water. Using this stock solution, the concentrations required of the compound in the appropriated concentrations of NaH_2PO_4 or Na_2HPO_4 solutions, were prepared. The required volumes of these two solutions were then mixed to reach the pH values used in the experiments. Solutions of all compounds for time-resolved fluorescence measurements were prepared so that the absorbance of the final solutions at λ_{ex} was lower than 0.1. Solutions were kept cool in the dark when not in use to avoid possible deterioration by exposure to light and heat. The solutions were not degassed.

Instrumentation

Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 650 UV/vis spectrophotometer with a temperature-controlled cell.

Experimental Section

Steady-state fluorescence emission spectra were performed on a JASCO FP-6500 spectrofluorometer equipped with a 450 W Xenon lamp for excitation, with temperature controller ETC-273T at 20 °C. The pH of the solutions was measured just before the fluorescence measurements at the same temperature.

Fluorescence decay traces of compounds in the absence and in the presence of phosphate buffer were recorded by the single-photon timing method, using the FluoTime 200 fluorometer (Figure 71). The excitation was by a 485 and 440-nm laser-pulsed PicoTA (PicoQuant, Inc.), and the observation was through a monochromator at different wavelengths. The pulse repetition rate was 20 MHz. Fluorescence decay histograms were collected in 1320 channels using 10 × 10 mm cuvettes. The time increment per channel was 36 ps. Histograms of the instrument response functions (using LUDOX scatterer) and sample decays were recorded until they typically reached 2×10^4 counts in the peak channel. The total width at half maximum of the instrument response function was ~ 60 ps. Fluorescence decays were recorded at six λ_{em} for all samples. The fluorescence decay traces were individually analyzed using an iterative deconvolution method with exponential models using FluoFit software (PicoQuant).

Fluorescence lifetime images were recorded with a MicroTime 200 fluorescence lifetime microscope system (Figure 72) and the time-tagged time-resolved (TTTR) methodology, which permits fluorescence decay histograms to be reconstructed from molecules in the confocal volume. The excitation source consisted of the LDH 485 nm pulsed laser described previously. The light beam was directed onto a dichroic mirror (510dcsr) to the oil immersion objective (1.4 NA, 100×) of an inverted microscope system IX-71 (Olympus). The collected fluorescence light was filtered by a long-pass filter HP500LP (AHF/Chroma) and focused onto a 75- μm confocal aperture. After the aperture, the transmitted light was refocused onto 2

single photon avalanche diodes SPCM-AQR 14 (Perkin Elmer) after the signal was separated by a 50/50 beam splitter. The data acquisition was performed with a TimeHarp 200 TCSPT module (PicoQuant, Inc.) in TTTR mode, which enabled the reconstruction of the lifetime histogram. Raw images were recorded by raster scanning an area of $80 \times 80 \mu\text{m}$ with a resolution of 512×512 pixels. The photons of each pixel were temporally sorted with respect to the excitation pulse in the histograms with a time resolution of 29 ps/channel.

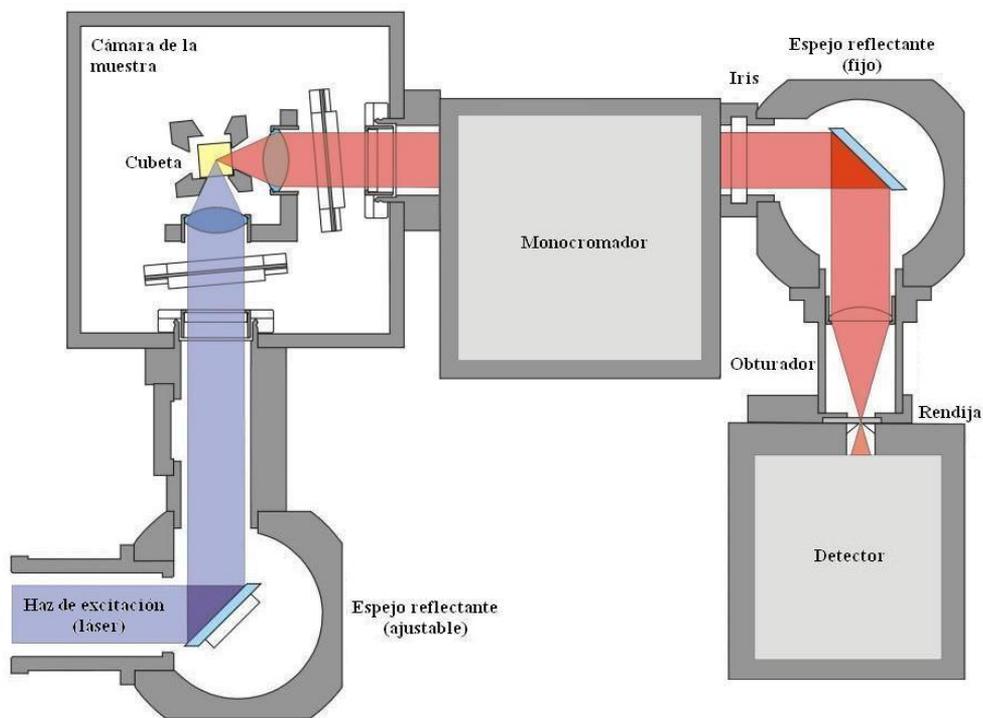


Figure 71

Experimental Section

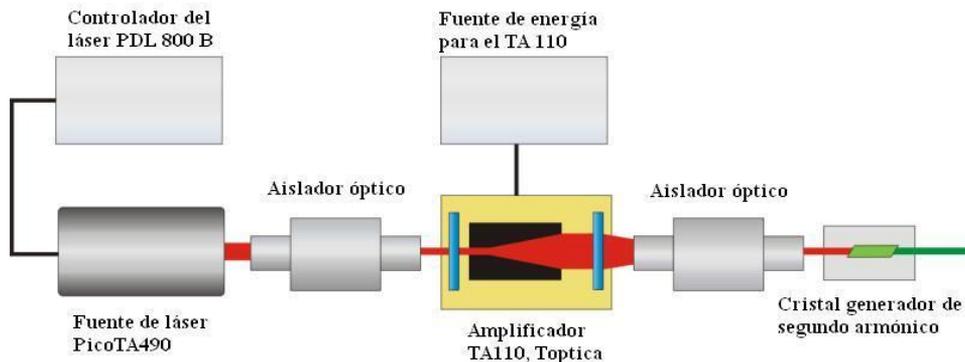


Figure 72

Photostability

Should be noted that solutions as diluted as 1×10^{-10} M were stable after continuous irradiation when they were dissolved in pure (or buffered) water without glycerol.

Cell culture

MC3T3-E1 preosteoblast (ECACC 99072810) cell lines were provided by the Cell Culture Facility, University of Granada. MC3T3-E1 cells were grown in alpha minimum essential medium (α MEM) containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin–streptomycin in a humidified 5% CO₂ incubator, as described previously.²³⁴

For the FLIM microscopy experiments, cells were seeded onto 20-mm coverslips in 12-well plates at a density of 11,250 cells/cm². The coverslips were translated to the MicroTime 200 fluorescence lifetime microscope system and washed with PBS before adding work solutions. On the day of the experiment, the

²³⁴ H. Sudo, H. Kodama, Y. Amagi, S. Yamamoto, S. Kasai, *J. Cell Biol.* **1983**, *96*, 191-198.

cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and were perforated by incubation for 15 min at 37° C with 2 µg/ml α-toxin in permeabilization buffer (20 mM potassium Mops, pH 7.0, 250 mM mannitol, 1 mM potassium ATP, 3 mM MgCl₂, and 5 mM potassium glutathione).²³⁵ Afterwards, the cells were washed twice with PBS and analyzed by FLIM.

FLIM instrumentation

Fluorescence lifetime images were recorded with a MicroTime 200 fluorescence lifetime microscope system (PicoQuant, Inc.) and the time-tagged time-resolved (TTTR) methodology, which permits fluorescence decay histograms to be reconstructed from molecules in the confocal volume. The excitation source consisted of the LDH 485 nm pulsed laser described previously. The light beam was directed onto a dichroic mirror (510dcsr) to the oil immersion objective (1.4 NA, 100×) of an inverted microscope system IX-71 (Olympus). The collected fluorescence light was filtered by a long-pass filter HP500LP (AHF/Chroma) and focused onto a 75-µm confocal aperture. After the aperture, the transmitted light was refocused onto 2 single photon avalanche diodes SPCM-AQR 14 (Perkin Elmer) after the signal was separated by a 50/50 beam splitter. The data acquisition was performed with a TimeHarp 200 TCSPC module (PicoQuant, Inc.) in TTTR mode, which enabled the reconstruction of the lifetime histogram. Raw images were recorded by raster scanning an area of 80×80 µm with a resolution of 512 × 512 pixels. The photons of each pixel were temporally sorted with respect to the excitation pulse in the histograms with a time resolution of 29 ps/channel.

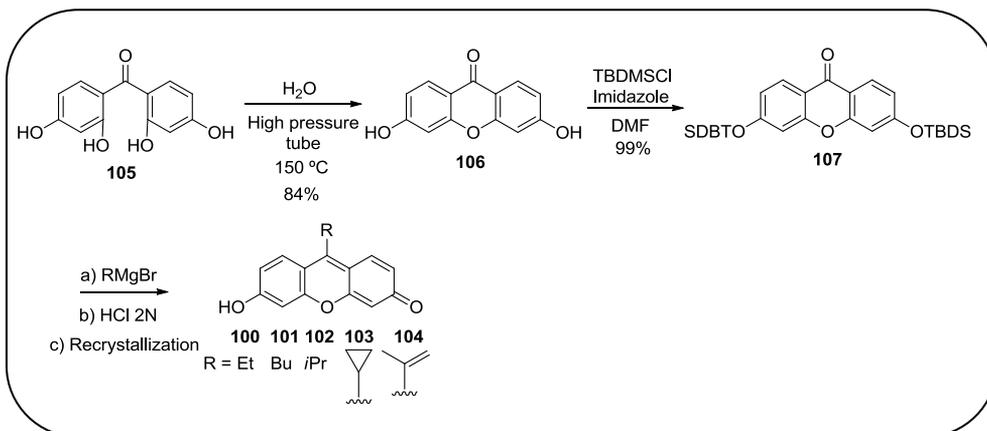
²³⁵ M. D. Giron, C. M. Havel, J. A. Watson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1994**, *91*, 6398-6402.

Experimental Section

FLIM images analysis

The FLIM image data were analyzed using SymphoTime software (PicoQuant). To obtain the fitted FLIM images, a reconstructed instrument response function was employed to analyze the fluorescence decay histogram of each pixel within the whole image using a biexponential model. A short decay time of 1.5 ns was fixed to account for the short-lived autofluorescence of the cell, whereas the second decay time was a freely adjustable parameter. All decay histograms were fitted by applying the maximum likelihood estimator (MLE), which yields correct parameter sets for low count rates.²⁸ Binning of 5×5 pixels and prehistogramming of 4 temporal channels (for a final resolution of 116 ps/channel) were used to achieve a larger number of counts in each pixel.

Synthesis of compounds 100-104:



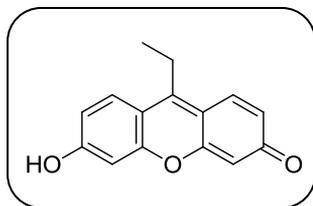
^1H and ^{13}C NMR of compounds **106**²³⁶ and **107**²³⁷ matched with previously described.

²³⁶ J. Shi, X. Zhang, D. C. Neckers, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4418-4421.

²³⁷ R. L. M. Teeuwen, S. S. van Berkel, T. H. H. van Dulmen, S. Schoffelen, S. A. Meeuwissen, F. A. de Wolf, H. Zuilhof, J. C.M. van Hest, *Chem. Commun.* **2009**, *47*, 4022-4024.

General procedure for the synthesis of 9-Alkyl Substituted Xanthenones (GP 9):

To a solution of compound **107** (1 mmol) in THF (5 mL), the corresponding Grignard reagent (5 mmol) was added,²³⁸ and the solution was stirred at room temperature for 2 h. Then, 2N HCl (10 mL) was added and the mixture was stirred for additional 10 min. The resulting solid was filtered and washed with water and diethyl ether. These compounds were extensively purified by recrystallization in MeOH.



Compound 100

Following GP 9, **100** was obtained as a yellow solid.

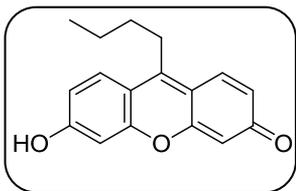
¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 8.55 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 7.38 (dd, J = 9.3, 2.3 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 3.75 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.51 (t, J = 7.6 Hz, 3H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 174.3 (C), 172.4 (C), 160.8 (C), 132.4 (CH), 121.2 (CH), 117.3 (C), 103.5 (CH), 23.7 (CH₂), 16.8 (CH₃) (one carbon signal was not observed).

HRMS (EI): m/z calcd. for C₁₅H₁₃O₃ [M⁺+H]: 241.0865, found: 241.0850.

²³⁸ The use of Grignard derivatives is mandatory owing to lithium nucleophiles yield important side reactions.

Experimental Section



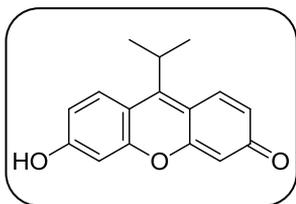
Compound 101

Following GP 9, **101** was obtained as a red solid.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 8.54 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 7.41 (dd, J = 9.3, 2.2 Hz, 2H), 7.31 (d, J = 2.2 Hz, 2H), 3.72 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.89-1.73 (m, 2H), 1.66 (hex, J = 7.2 Hz, 2H), 1.06 (t, J = 7.2, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 172.3 (C), 160.5 (C), 132.5 (CH), 121.2 (CH), 117.5 (C), 103.4 (CH), 36.0 (CH₂), 24.3 (CH₂), 14.2 (CH₃), (two carbon signals were not observed).

HRMS (EI): m/z calcd. for C₁₇H₁₇O₃ [M⁺+H]: 269.1178, found: 269.1165.



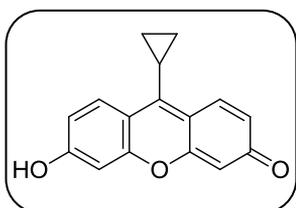
Compound 103

Following GP 9, **103** was obtained as an orange solid.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 8.74 (d, J = 9.4 Hz, 2H), 7.40 (dd, J = 9.5, 2.2 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 2.2 Hz, 2H), 4.57 (hept, J = 7.2 Hz, 1H), 1.82 (d, J = 7.2, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 178.3 (C), 172.1 (C), 160.9 (C), 132.9 (CH), 120.8 (CH), 117.4 (C), 103.6 (CH), 32.0 (CH), 23.3 (CH₃).

HRMS (EI): m/z calcd. for C₁₆H₁₅O₃ [M⁺+H]: 255.1021, found: 255.0987.



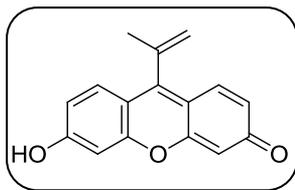
Compound 102

Following GP 9, **102** was obtained as a red solid.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 8.81 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 7.39 (dd, *J* = 9.4, 2.0 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 2.79-2.67 (m, 1H), 1.75-1.65 (m, 2H), 1.13-1.04 (m, 2H).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ = 172.5 (C), 160.8 (C), 133.4 (CH), 120.9 (CH), 119.6 (C), 103.2 (CH), 13.4 (CH), 9.9 (CH₂), (one carbon signal was not observed).

HRMS (EI): *m/z* calcd. for C₁₆H₁₃O₃ [M⁺+H]: 253.0865, found: 253.0831.



Compound 104

Following GP 9, **104** was obtained as a orange solid.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 8.28 (d, *J* = 9.1, 2H), 7.39 (dd, *J* = 9.1, 2.2 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.00 (s, 1H), 5.38 (s, 1H), 2.38 (s, 3H).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD): δ = 173.0 (C), 170.7 (C), 161.4 (C), 138.6 (C), 134.2 (CH), 121.9 (CH₂), 121.4 (CH), 116.6 (C), 103.5 (CH), 24.1 (CH₃). **HRMS** (EI): *m/z* calcd. for C₁₆H₁₃O₃ [M⁺+H]: 253.0865, found: 253.0822.

Experimental Section

General procedure for methylation of phenolic compounds (GP 10):

To a solution of a phenolic compound (1 mmol) in MeCN (5 mL), K₂CO₃ (1.5 mmol) and MeI (2 mmol) were added, and the solution was stirred at 78°C for 16 h. Then, the solvent was removed and the residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane).

Following GP 10 compounds **114**,²³⁹ **117**,²⁴⁰ and **121**²⁴¹ were prepared.

General procedure for bromination of aromatics compounds (GP 11):

To a solution of an aromatic compound (1 mmol) in MeCN (5 mL), NBS (1 mmol) were added slowly, and the solution was stirred at room temperature for 16 h. Then, the solvent was removed and the residue was purified by flash chromatography (EtOAc/hexane).

Following GP 11 compounds **118**²⁴² and **122**²⁴³ were prepared.

General procedure for the synthesis of 9-Aryl Substituted Xanthenones (GP 12):

To a solution of compound **107** (1 mmol) in THF (5 mL), the corresponding Grignard reagent (5 mmol) was added,²³⁸ and the solution was stirred at room temperature for 2 h. Then, 2N HCl (10 mL) was added and the mixture was stirred for additional 10 min. The resulting solid was filtered and washed with water and diethyl ether. These compounds were extensively purified by recrystallization in MeOH.

²³⁹ A. Bugarin, B. T. Connell, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 7218-7220.

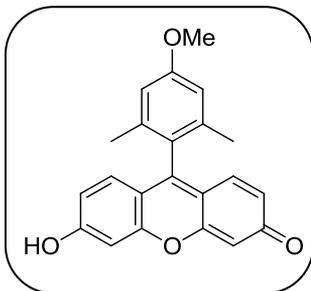
²⁴⁰ S. Kiren, A. Padwa, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 7781-7789.

²⁴¹ S. Bhadra, I. W. Dzik, L. J. Goossen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 2959 - 2962,4

²⁴² PHARMACIA and UPJOHN COMPANY Patent: WO2003/91225 A1, **2003**.

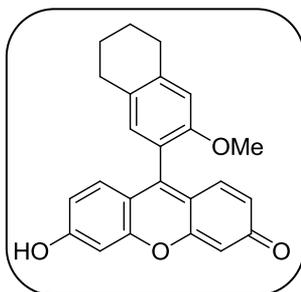
²⁴³ H. Konishi, K. Aritomi, T. Okano, J. Kiji, *Bull. Chem. Soc. J.*, **1989**, 62, 591 – 593.

^1H and ^{13}C NMR of compound **108**²⁴⁴ matched with previously described.



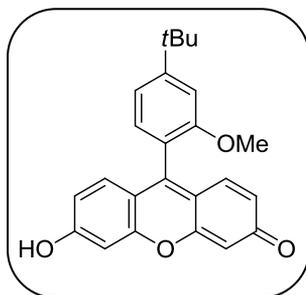
Compound 109

Following GP 12, **109** was obtained as a yellow solid.



Compound 110

Following GP 12, **110** was obtained as a red solid.



Compound 111

Following GP 12, **105** was obtained as a orange solid.

²⁴⁴ Y. Yang, J. O. Escobedo, A. Wong, C. M. Schowalter, M. C. Touchy, L. Jiao, W. E. Crowe, F. R. Fronczek, R. M. Strongin, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6907-6912.

Experimental Section

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones y patentes científicas:

- *Ti/Ni-Based Multimetallic System for the Efficient Allylation of Carbonyl Compounds.* A. Martínez-Peragón, A. Millán, A. G. Campaña, I. Rodríguez-Márquez, S. Resa, D. Miguel, L. Álvarez de Cienfuegos, J. M. Cuerva, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 1499-1503.
- *Synthesis and Photophysics of a New Family of Fluorescent 9-alkyl Substituted Xanthenones.* A. Martínez-Peragón, D. Miguel, R. Jurado, J. Justicia, J. M. Álvarez-Pez, J. M. Cuerva, L. Crovetto, **2013**, *enviada*.
- *Procedimiento para la estimación de la concentración de fosfatos en células vivas, colorante xanténico y síntesis del mismo.* Solicitud de patente, **2013**, *enviada*.
- *New advances in Titanocene(III) chemoselectivity: Barbier-type reaction vs homolytic epoxyde opening.* A. Martínez-Peragón, S. P. Morcillo, V. Jacoby, J. Justicia, J. M. Cuerva, A. Gansäuer, **2013**, *enviada*.

