



Síntesis y propiedades de nuevos azocompuestos como interruptores moleculares quirales y nuevos inhibidores de la fluorescencia

Santiago Guisán Ceinos

Directoras:

Profesora María del Carmen Carreño García,

Catedrática (UAM)

Profesora María Ribagorda Lobera,

Profesora titular (UAM)

Madrid, Septiembre 2019

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la dirección de la Dra. M. Carmen Carreño García y la Dra. María Ribagorda Lobera.

El trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y del Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyectos: CTQ2014-53894-R y CTQ2017-85454-C2-2-P).

ABREVIATURAS EMPLEADAS

En esta tesis Doctoral se han empleado las abreviaturas y acrónimos recomendados en “*Guidelines for Author*” (*J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 26A).

A	Amperios
Bibl.	Bibliografía
DC	Dicroísmo Circular
ee	Exceso enantiomérico
EM	Espectroscopía de masas
EMAR	Espectroscopía de masas de alta resolución
equiv	Equivalentes
IE	Impacto electrónico
P.f.	Punto de fusión
rdto.	Rendimiento
t.a.	Temperatura ambiente
Tol/p.Tol	<i>p</i> -Tolilo
V	Voltios

NOTA

En la presente tesis doctoral la numeración de esquemas, figura, tablas, referencias y productos es independiente en cada capítulo

ÍNDICE

CAPITULO 1: <i>INTRODUCCIÓN GENERAL</i>	11
1. INTODUCCIÓN	13
1. 1. AZOBENCENOS	13
1. 1. 2. SINTESIS DE AZOBENCENOS	20
1. 1. 3. APLICACIONES	25
1. 1. 3. 1. INTERRUPTORES MOLECULARES	25
1. 1. 3. 2. AZOCOMPUESTOS COMO INHIBIDORES DE LA FLUORESCENCIA	29
1. 2. OBJETIVOS	33
CAPITULO 2: <i>SÍNTESIS DE NUEVOS FERROCENILAZOBENCENOS QUIRALES Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES</i>	35
2. 1. INTRODUCCIÓN	37
2. 1. 1. INTERRUPTORES MOLECULARES	37
2. 1. 2. AZOBENCENOS COMO FOTOINTERRUPTORES MOLECULARES	39
2. 1. 3. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN	42
2. 1. 4. FERROCENOS HOMOQUIRALES	46
2. 1. 5. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	49
2. 2. OBJETIVOS	53
2. 3. RESULTADOS	54
2. 3. 1. RETROSÍNTESIS	54
2. 3. 2. SÍNTESIS DE AZOBENCENOS HALOGENADOS	55
2. 3. 3. SÍNTESIS DE SULFINILFERROCENIL AZOBENCENOS	59
2. 3. 4. SÍNTESIS DE SULFENILFERROCENIL AZOBENCENOS	61
2. 3. 5. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL	63
2. 3. 6. PROPIEDADES FOTOCRÓMICAS	69
2. 3. 6. 1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN UV/VISIBLE Y DICROISMOCIRCULAR EN AZOBENCENOS	69
2. 3. 6. 2. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FOTOCRÓMICAS	74
2. 3. 6. 2. 1. <i>p</i> -TOLILSULFINILFERROCENIL AZOBENCENOS ENANTIOPUROS	74
2. 3. 6. 2. 2. <i>p</i> -TOLILSULFENILFERROCENIL AZOBENCENOS ENANTIOPUROS	84
2. 4. PARTE EXPERIMENTAL	91
2. 4. 1. TÉCNICAS Y APARATOS	91

2. 4. 2. DISOLVENTES, REACTIVOS Y CONDICIONES DE REACCIÓN	93
2. 4. 3. MÉTODOS DE SÍNTESIS	94
2. 4. 3. 1. PROCEDIMIENTOS GENERALES	98
2. 4. 3. 2. COMPUESTOS RACÉMICOS	125
<i>CAPITULO 3: SÍNTESIS DE NUEVOS AZO-NFQ BASADOS EN BODIPY Y POSTERIOR ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES Y APLICACIONES</i>	127
3. 1. INTRODUCCIÓN	129
3. 1. 1. BODIPYs	129
3. 1. 1. 1. SÍNTESIS DE BODIPYs	131
3. 1. 1. 2. REACTIVIDAD DE BODIPYs	134
3. 1. 2. AZOBENCENOS COMO FOTOCONTROLADORES DE PROPIEDADES	141
3. 1. 2. 1. AZOBENCENOS COMO INHIBIDORES DE FLUORESCENCIA	141
3. 1. 3. AZOCOMPUESTOS COMO SENSORES DE MEDIOS REDUCTORES	146
3. 2. ANTECEDENTES	152
3. 3. OBJETIVOS	155
3. 4. RESULTADOS	156
3. 4. 1. SINTESIS DE AZO-BODIPY CABEZA DE SERIE	157
3. 4. 2. REACCIONES DE FUNCIONALIZACIÓN DEL ESQUELETO DE AZO-BODIPY	162
3. 4. 3. REACCIONES DE RUPTURA REDUCTORA DEL ENLACE AZO (N=N) DE LOS AZO-BODIPYS	165
3. 4. 4. PROPIEDADES FOTOFÍSICAS	168
3. 4. 4. 1. ESPECTROS DE UV-VIS Y EMISIÓN DE LOS BODIPY-AZOS	168
3. 4. 4. 2. ESPECTROS DE UV-VIS Y EMISIÓN DE BODIPY-NH ₂	172
3. 4. 5. BODIPY-NH ₂ COMO FOTOSINETIZADORES	177
3. 4. 6. ESTUDIOS BIOLÓGICOS	181
3. 4. 6. 1. ESTUDIOS DE REDUCCIÓN ENZIMÁTICA	181
3. 4. 6. 1. 2. REDUCCIÓN AZOREDUCTASA BACTERIANA	182
3. 4. 6. 1. 3. REDUCCIÓN CON AZOREDUCTASA HUMANA	186

3. 4. 6. 1. 4. COMPARATIVA DE LA ACTIVIDAD DE LAS DOS AZOREDUCTASAS	187
3. 4. 6. 2. ESTUDIOS BIOLÓGICOS CELULARES	189
3. 4. 6. 2. 1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE BODIPY-NH ₂	189
3. 4. 6. 2. 2. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD PER SE SOBRE HELA ("DARK TOXICITY")	190
3. 4. 6. 2. 3. EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTODINÁMICO: TERAPIA FOTODINÁMICA (PDT)	191
3. 4. 6. 3. CONCLUSIONES ESTUDIOS BIOLÓGICOS	196
3. 5. PARTE EXPERIMENTAL	197
3. 5. 1. TÉCNICAS Y APARATOS	198
3. 5. 2. DISOLVENTES, REACTIVOS Y CONDICIONES DE REACCIÓN	199
3. 5. 3. MÉTODOS DE SÍNTESIS	200
3. 5. 3. 1. PROCEDIMIENTOS GENERALES	205
3. 5. 5. ENSAYOS ENZIMÁTICOS	242
3. 5. 6. ENSAYOS CELULARES	248
CAPITULO 4: <i>Resumen y Conclusiones</i>	251
4. 1. RESUMEN Y CONCLUSIONES	253
4. 1. 1. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL CAPITULO 2	253
4. 1. 2. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL CAPITULO 3	257

Capítulo 1

Introducción general.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 AZOBENCENOS

Los azobencenos son una familia de colorantes orgánicos cuya estructura consta de dos anillos aromáticos unidos a través de un enlace N=N. Su variada gama de colores junto a su baja toxicidad les ha situado como uno de los colorantes más usados, conocidos en la industria como colorantes FD&C (siglas inglesas food, drug and cosmetics).^[1,2] Los colorantes azoicos representan actualmente el 60-70% de la producción de colorantes (Figura 1. 1. 1).

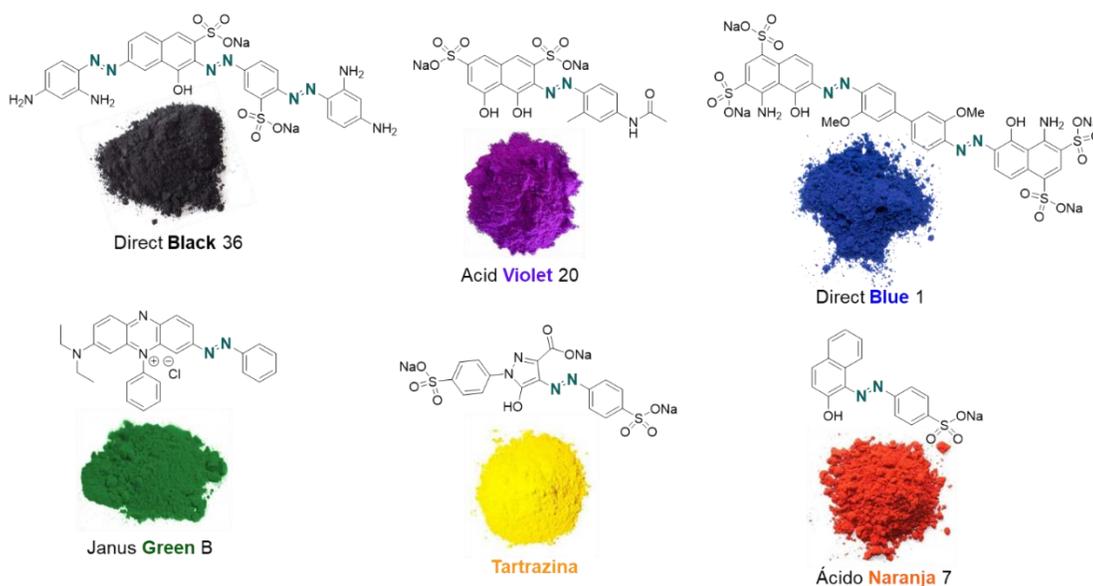


Figura 1. 1. 1.

Los azobencenos poseen dos isómeros estructurales *E* (*trans*) y *Z* (*cis*) que pueden interconvertirse entre ellos por medio de la irradiación con luz de una determinada longitud de onda.^[3] El proceso de foto-isomerización *E*→*Z* del azobenceno tiene una barrera de energía del estado foto-excitado del orden de $\sim 23 \text{ Kcal mol}^{-1}$ (1.0 eV), de forma que el isómero *trans* es el predominante en la oscuridad y a temperatura ambiente.^[4] Ambos isómeros tienen diferentes propiedades físicas, geometrías moleculares y momentos

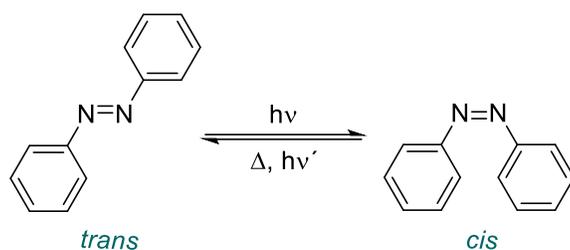
[1] a) P. F. Gordon; P. Gregory, *Organic Chemistry in Colour*, Springer: NY, **1983**, p. 95.; b) H. Zollinger, *Color Chemistry: Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*, VCH:Weinheim, **1987**, p. 85.

[2] a) H. Zollinger, *Azo and Diazo Chemistry*, Interscience, New York, **1961**.; b) K. Hunger, *Industrial Dyes: Chemistry, Properties and Applications*, Wiley-VCH, **2003**, 14.

[3] G. S. Hartley, *Nature* **1937**, 140, 281.

[4] E. V. Brown, G. R. Gruneman, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 621.

dipolares.^[5,6] El isómero *trans* es ~ 14 Kcal mol⁻¹ (0.6 eV) más estable que el isómero *cis* (*Z*) (Esquema 1. 1. 1).



Esquema 1. 1. 1

Asimismo, ambos isómeros presentan diferencias en sus espectros de absorción de UV. De forma general los azobencenos presentan dos bandas de absorción características, correspondientes a las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$,^[7,8] siendo esta última la que los diferencia de sistemas carbonados de tipo estireno y es la responsable del proceso dinámico de fotoisomerización.

Los isómeros *E/Z* de un mismo azocompuesto presentan dos principales diferencias en sus espectros de absorción:^[9] 1) la banda de absorción $\pi \rightarrow \pi^*$ en el isómero *trans* es muy intensa, con un coeficiente de extinción molar^[10] (ϵ) en torno a $2-3 \times 10^4$ M⁻¹ cm⁻¹, mientras que en el isómero *cis* la banda $\pi \rightarrow \pi^*$ se desplaza a longitudes de onda más cortas (efecto hipsocrómico), disminuyendo notablemente en intensidad ($\epsilon \sim 7-10 \times 10^3$ M⁻¹ cm⁻¹) (ver ejemplo representativo [Figura 1. 1. 2](#), línea azul); 2) en el isómero *trans* la banda ($n \rightarrow \pi^*$) aparece mucho más débil ($\epsilon \sim 400$ M⁻¹ cm⁻¹), debido a que esta transición en el isómero *trans* no está permitida por las reglas de simetría, mientras que la transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$ (380-520 nm) en el isómero *cis* está permitida, lo que se traduce en un aumento de su intensidad ($\epsilon \sim 1500$ M⁻¹ cm⁻¹) con respecto al isómero *trans* ([Figura 1. 1. 2](#), línea rosa).

^[5] a) H. Rau, en *Photocromism, Molecules and Systems*, Vol. 1, Cap. 4, pp 165-192. (Eds.: H. Dürr, H. Bounas-Laurent), Elsevier, Amsterdam, 1990; b) H. Sugimoto, *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, (Eds.: W. M. Horspool, P. S. Song), CRC Press: Boca Raton, FL, USA, **1995**, 824.

^[6] Imágenes de microscopía de efecto túnel (STM): a) K. Morgenstern, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *4*, 213.; b) J. Henzl, M. Mehlhorn, H. Gawronski, K.-H. Rieder, K. Morgenstern, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *45*, 603.; c) B.-Y. Choi, S.-J. Kahng, S. Kim, H. Kim, H. W. Kim, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 156106.

^[7] R. J. Sension, S. T. Repinec, A. Z. Szarka, R. M. Hochstrasser, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 6291.

^[8] T. Nägele, R. Hoche, W. Zinth, J. Wachtveitl, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *272*, 489.

^[9] N. Tamai, H. Miyasaka, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1875.

^[10] Capacidad que tiene una sustancia de absorber la radiación electromagnética a cada longitud de onda, $\epsilon = A/c \cdot l$ donde A = Absorbancia, c = concentración molar del soluto y l = longitud de la cubeta (habitualmente 1 cm)

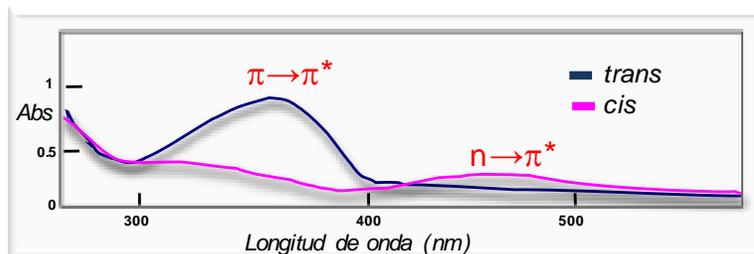


Figura 1. 1. 2

En función del orden energético de sus estados electrónicos $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$, los azocromóforos aromáticos se pueden clasificar en tres tipos:^[5]

I) Tipo azobenceno: aquellos que presentan una banda $\pi \rightarrow \pi^*$ muy intensa en la región del UV, y una $n \rightarrow \pi^*$ más débil en el visible. Suelen ser de color amarillo y la naturaleza electrónica de los anillos aromáticos es muy parecida al azobenceno más sencillo (Ph-N=N-Ph).

II) Tipo aminoazobenceno (*para*- o *ortho*-(X)- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-N=N-Ar}$): las bandas $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ aparecen muy juntas o incluso colapsan en la región del UV-visible cercano. Son azocompuestos con sustituyentes dadores de electrones (X) en las posiciones *ortho* o *para* y suelen tener color naranja.

III) Tipo *pseudo*-estilbeno [(X)- $\text{C}_6\text{H}_4\text{-N=N-C}_6\text{H}_4\text{(Y)}$]: la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ se desplaza al rojo, pudiendo incluso cambiar el orden de aparición con la banda $n \rightarrow \pi^*$. Presentan sustituyentes dadores (X) y aceptores de electrones (Y) en las posiciones 4- y 4'-respectivamente, que permiten una transferencia electrónica y hacen de ellos sistemas push/pull. Generalmente poseen un color rojo.

La longitud de onda (nm) a la que aparece la transición $n \rightarrow \pi^*$ es también muy sensible al impedimento estérico en torno a la agrupación azo -N=N- . Por ejemplo, en los azobencenos que presentan sustituyentes en posiciones *orto* muy voluminosos, se produce una distorsión del ángulo entre -N=N-C- , que genera una distorsión de la planaridad y provoca que la transición $n \rightarrow \pi^*$ aparezca a menores energías, es decir sufre un desplazamiento batocrómico (hacia el rojo). El descenso energético observado con el aumento del ángulo -N=N-C se debe fundamentalmente a la variación de la estabilidad del orbital "n" involucrado en esta excitación, más que a variaciones del orbital π^* . El aumento del ángulo -N=N-C , lleva implícita una aproximación de los pares de electrones sin compartir de cada uno de los nitrógenos del doble

enlace N=N. Esta interacción desfavorable entre ambos pares sin compartir hace que aumente el contenido energético del orbital molecular (OM) “n”. Como consecuencia, la energía necesaria para excitar un electrón del OM “n” al OM antienlazante π^* disminuye, apareciendo esta transición a longitudes de onda (nm) más altas (Figura 1. 1. 3).

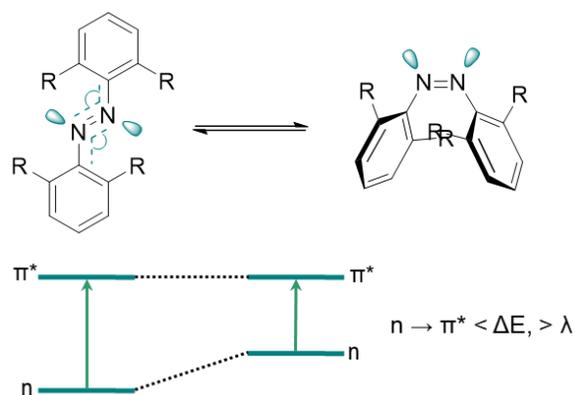


Figura 1. 1. 3

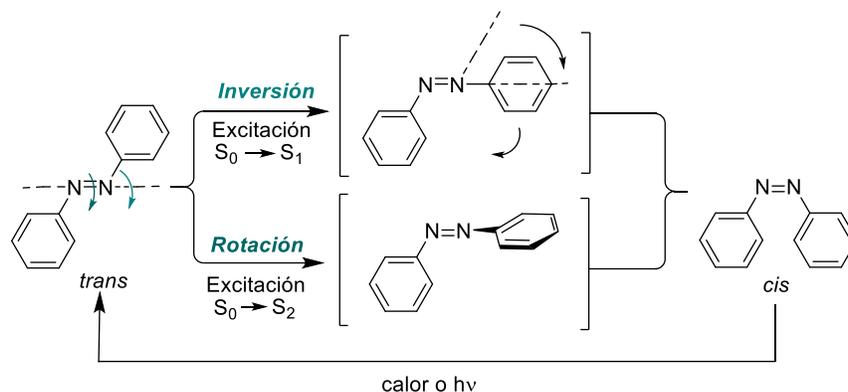
El proceso de fotoisomerización $E \rightarrow Z$ se realiza irradiando con una luz de la longitud de onda (λ), coincidente con el máximo de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ (generalmente $\lambda \sim 320-380$ nm), obteniéndose el denominado estado fotoestacionario (PSS) cis. Por otro lado, la reversión $Z \rightarrow E$ puede ser fotoquímica o térmica. En el caso de la fotoreversión $Z \rightarrow E$, ésta se realiza generalmente irradiando con λ coincidentes con la transición $n \rightarrow \pi^*$ ($\lambda \sim 400-450$ nm), obteniéndose en este caso el PSS trans. Las dos conversiones fotoquímicas suelen darse en una escala de picosegundos, mientras que la relajación térmica del isómero Z al isómero E es mucho más lenta (del orden de segundos u horas).

En lo relativo al mecanismo de fotoisomerización E/Z de los azobencenos,^[11] los datos disponibles hasta ahora sugieren que la isomerización de los azocompuestos puede transcurrir mediante dos tipos de mecanismos que involucran dos estados excitados diferentes del azobenceno:

^[11] a) I. Conti, M. Garavelli, G. Orlandi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5216.; b) T. Schultz, J. Quenneville, B. Levine, A. Toniolo, T. J. Martínez, S. Lochbrunner, M. Schmitt, J. P. Shaffer, M. Z. Zgierski, A. Stolow, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8098.; c) A. Cembran, F. Bernardi, M. Garavelli, L. Gagliardi, G. Orlandi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3234.

I) Mecanismo de inversión En este mecanismo participa el par de electrones no enlazante de los átomos de nitrógeno, correspondiente a la transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$ ($S_0 \rightarrow S_1$), que conlleva la inversión del átomo de nitrógeno.

II) Mecanismo de rotación del doble enlace N=N: Este mecanismo es similar al que se produce en la isomerización del estilbena, en este caso se produce la rotación de uno de los anillos aprovechando la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ ($S_0 \rightarrow S_2$) (Esquema 1. 1. 2).



Esquema 1. 1. 2

En el azobenceno más sencillo el isómero *E* es plano con un momento dipolar prácticamente nulo ($\mu \sim 0$), mientras que el isómero *cis* adopta una geometría angular, en la que uno de los anillos gira para evitar repulsiones estéricas, enfrentando una de las nubes π de un anillo aromático al otro, dando como resultado una estructura con un momento dipolar distinto a cero ($\mu \sim 3.0$ D).^[12] La distancia entre las posiciones más distantes de los anillos aromáticos disminuye desde 9.0 Å (isómero *E*) hasta 5.5 Å (isómero *Z*) (Figura 2).^[13] Esta diferente disposición de los anillos aromáticos también se puede observar en los espectros de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$), de forma que generalmente el isómero *Z* presenta un grupo de señales aromáticas a campo más alto (más apantalladas) que las señales correspondientes del isómero *E*, debido al efecto anisotrópico de la nube π del anillo aromático vecino.

Estos efectos son especialmente notorios en azobencenos que presentan sustituyentes en las posiciones *orto* o *meta*. Un ejemplo se ilustra en la Figura 1. 1. 5 para un azobenceno *orto*-sustituido. En este caso, el isómero *E* puede adoptar una conformación en donde la

^[12] G. S. Kumar, D. C. Neckers, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 1915.

^[13] H. Koshima, N. Ojima, H. Uchimoto *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 6890.

agrupación N=N y el sustituyente R se orientan hacia el mismo lado (*trans*-A) o bien hacia lados opuestos (*trans*-B). Por otro lado, en el isómero Z la disposición de los anillos ortogonales puede dar lugar a varios confórmeros. Estos confórmeros a priori deberían de ser fáciles de detectar gracias al efecto anisotrópico del anillo aromático sobre los desplazamientos químicos de los sustituyentes del otro anillo.^[14] En el ejemplo representado en la Figura 1. 1. 4, que sitúa al anillo aromático I fuera del plano que contiene el grupo azo, el efecto anisotrópico del anillo-I debe notarse sobre el sustituyente R del anillo-II en el confórmero *cis*-I, mientras que en el confórmero *cis*-II son los hidrógenos del anillo-II los que deberían de sufrir este efecto apantallante, en estructuras que adoptan una geometría helicoidal cuya configuración puede ser (*P*) o (*M*).

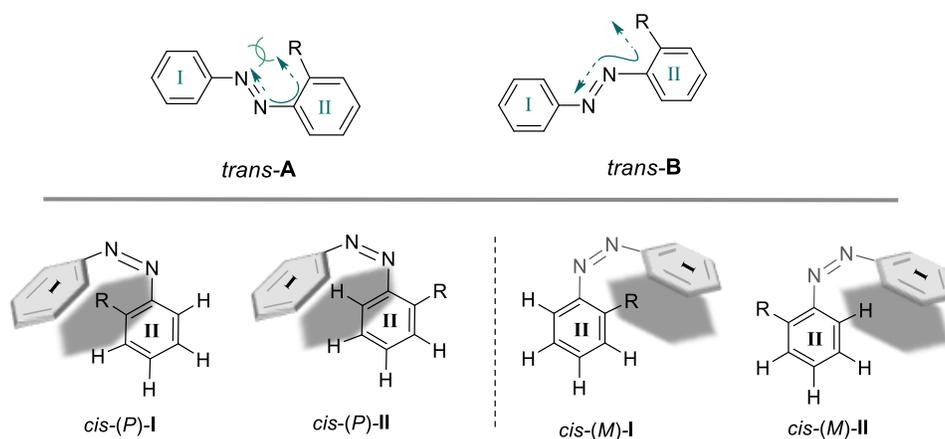


Figura 1. 1. 4

En los azobencenos que forman parte de moléculas quirales, el proceso de fotoisomerización también se puede evaluar y cuantificar a través de distintas técnicas quirópticas, tales como medidas de la rotación óptica $[\alpha]$, HPLC quiral o medidas de Dicroísmo Circular (CD). Por otro lado, es interesante destacar que el proceso de fotoisomerización del isómero *trans* al *cis* lleva implícita la generación de quiralidad helicoidal definida, pudiéndose formar dos enantiómeros *cis*-*P* o *cis*-*M*. (Figura 1. 1. 5).

^[14] S. M. Chambers, I. S. Hawthorn. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1631.

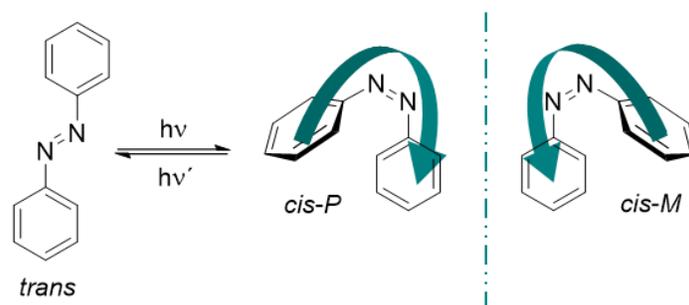


Figura 1. 1. 5

Sin embargo, aunque existe números ejemplos descritos sobre el desarrollo de nuevos azobencenos, son muy escasos los ejemplos donde se logra controlar la quiralidad inducida por este el movimiento molecular producido por la luz.^[15,16]

En el año 2010 Haberhauer ^[17] y col. diseñaron un azocompuesto que fotoisomeriza de forma unidireccional dando lugar exclusivamente al isómero *cis* con helicidad *P*. El azobenceno descrito se encuentra anclado a un ciclopéptido quiral enantiopuro que actúa a modo de abrazadera por ambos anillos aromáticos del azobenceno. El sistema es suficientemente flexible como para permitir la isomerización entre el isómero *trans* y el *cis* del azocompuesto, pero a su vez desestabiliza una de las hélices del isómero *cis*. En base a los cálculos de los espectros de Dicroísmo Circular DC teóricos los autores pudieron establecer una correlación entre el signo del efecto Cotton para la banda $n \rightarrow \pi^*$ del azocromóforo (*cis*) con la hélice de configuración *P* (efecto Cotton negativo) o para la hélice (*M*) (efecto Cotton positivo) del isómero *cis* (Figura 1. 1. 6)

^[15] G. Haberhauer, C. Kallweit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2418-2421.

^[16] K. Takaishi, M. Kawamoto, K. Tsubaki, T. Furuyama, A. Muranaka, M. Uchiyama, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 1778-1782.

^[17] G. Haberhauer, C. Kallweit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1.

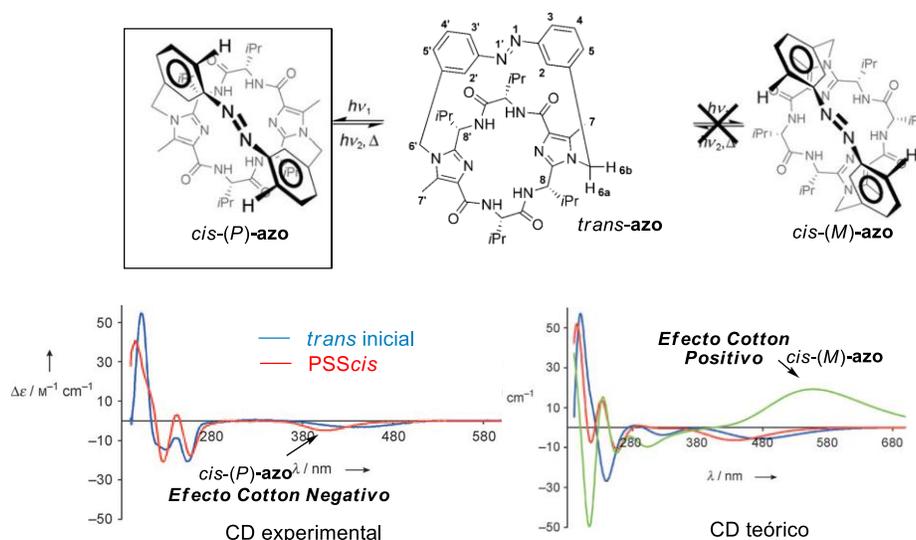


Figura 1. 1. 6

Posteriormente, Takaishi y col ^[18] describieron la fotoisomerización estereocontrolada de *cis*-azobencenos anclados a una unidad de (*R*)-binaftol. Este elemento de unión conecta intramolecularmente ambos anillos aromáticos del azobenceno a través de sus posiciones 2 y 2'. De forma análoga al caso anterior, los autores establecieron una correlación entre la helicidad del isómero *cis* y el signo del efecto Cotton observado en el DC experimental y teórico para la transición $n \rightarrow \pi^*$. De esta forma asignaron una helicidad (*M*)-*cis* para un efecto Cotton positivo y (*P*)-*cis* para el negativo. Cuando los azobencenos se encuentran anclados a la agrupación de (*R*)-binaftol a través de sus posiciones 2,2' se observó una quiralidad helicoidal de configuración (*P*)-, que se corresponde con un efecto Cotton negativo para la transición $n \rightarrow \pi^*$. Por otro lado, si el azobenceno se une a la unidad quiral por las posiciones 7 y 7' del binaftol, se observa un efecto Cotton positivo para el isómero *cis*, que se pudo correlacionar con una helicidad (*M*)- para el isómero *cis* (Figura 1. 1. 7).

^[18] a) K. Takaishi, M. Kawamoto, K. Tsubaki, T. Furuyama, A. Muranaka, M. Uchiyama, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1778.; b) K. Takaishi, A. Muranaka, M. Kawamoto, M. Uchiyama, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7623.

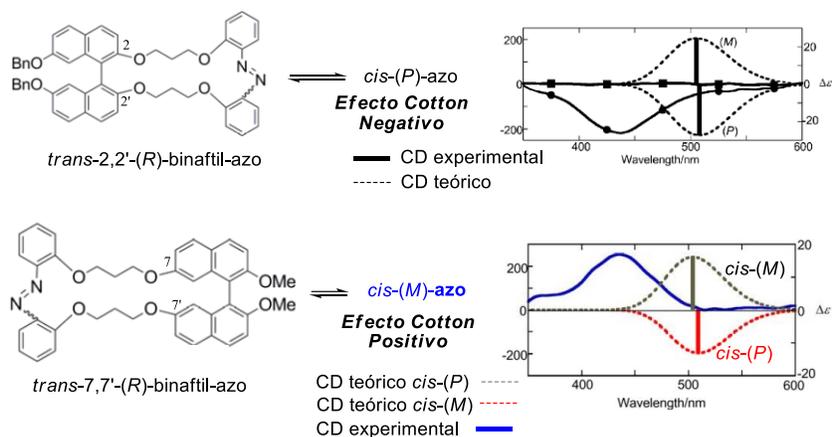
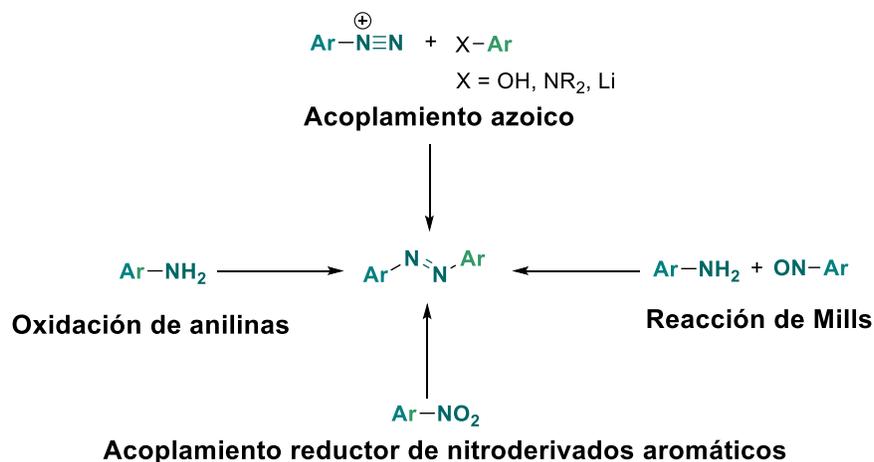


Figura 1. 1. 7

Como más adelante se indicará con todo detalle, en nuestro grupo de investigación se ha descrito una nueva familia de azobencenos enantiopuros que contienen un sulfóxido. Este grupo homoquiral es capaz de orientar y dirigir la helicidad del isómero *cis* en el proceso de fotoisomerización.

1. 1. 2 SINTESIS DE AZOBENCENOS

Los métodos comúnmente empleados para de obtención de azocompuestos aromáticos son el acoplamiento de sales de diazonio aromáticas, el acoplamiento reductor de nitro derivados aromáticos, la reacción de Mills o la oxidación de anilinas (Esquema 1. 1. 2. 1).^[19]

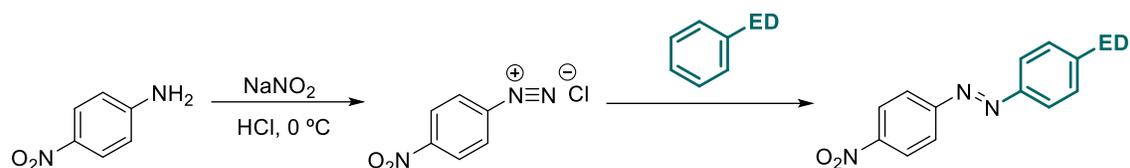


Esquema 1. 1. 2. 1

^[19] E. Merino, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 3835.

ACOPLAMIENTO AZOICO

La síntesis más general corresponde a la reacción de acoplamiento entre sales de diazonio aromáticas y compuestos aromáticos activados. Este proceso se basa en la diazotación inicial de una amina primaria aromática a baja temperatura, que posteriormente reacciona con un nucleófilo aromático rico en electrones (Esquema 1. 1. 2. 2).^[20] Los tiempos de reacción son cortos y se obtienen generalmente los azocompuestos con muy buenos rendimientos.



Esquema 1. 1. 2. 2

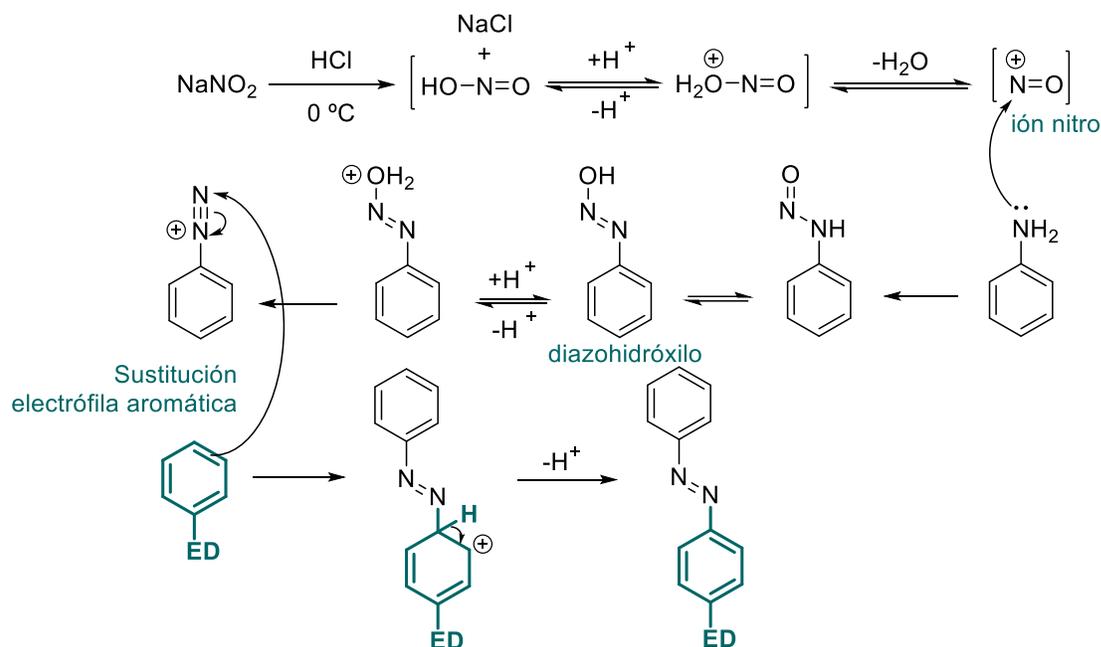
Las sales de diazonio son electrófilos débiles que sólo reaccionan con especies ricas en electrones, como arenos sustituidos con grupos dadores de electrones (ED), tales como fenoles o anilinas,^[21,22] para dar lugar a azobencenos hidroxilo o amino sustituidos. Esta reacción es bastante dependiente del pH, ya que, en disoluciones moderadamente alcalinas, la sal de diazonio se convierte en el diazohidróxido, inhibiéndose el acoplamiento. La reacción de diazotación se lleva a cabo por tratamiento de la amina primaria aromática con ácido nitroso, que ha de generarse *in situ* con nitrito sódico en presencia de ácido clorhídrico. El mecanismo de esta reacción se encuentra representado en el Esquema 1. 1. 2. 3. En estas condiciones, el ácido nitroso, se protona, originando el ión nitronio [$+N=O$] por pérdida de H_2O . Su reacción con el grupo amino, genera el *N*-nitroso derivado, el cual tautomeriza al diazohidróxido. La protonación del grupo hidroxilo, seguida por la eliminación de agua, genera la sal de diazonio estabilizada por resonancia.

^[20] I. Szelle, H. Zollinger, *Top. Curr. Chem.* **1983**, 112, 1.

^[21] a) K. Venkataraman en *The Chemistry of Synthetic Dyes*; Ed.: Academic Press: New York, **1970**, Vols. 1-7; b) A. F. Hegarty en *The Chemistry of Diazonium and Diazo Group*, S. Patai; Ed.: Wiley: New York, **1978**, Part 2, 545-551; c) I. Szele, H. Zollinger, *Top. Curr. Chem.* **1983**, 112, 1-66; d) H. Zollinger en *Diazo Chemistry I. Aromatic and Heteroaromatic Compounds*; Ed.: VCH: New York, **1994**.

^[22] a) K. Krohn, M. John, E. I. Demikhov, M. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.*, **2001**, 50, 1248-1254; b) S. Kubo, Z-Z Gu, K. Takahashi, Y. Ohko, O. Sato, A. Fujishima, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10950-10951; c) J. Merrington, M. James, M. Bradley, *Chem. Commun.* **2002**, 140-141; d) M. Wang, K. Funabiki, M. Matsui, *Dyes and Pigments*, **2003**, 57, 77-86; e) S. Pieraccini, G. Gottarelli, R. Labruto, S. Masiero, O. Pandoli, G. P. Spada, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 5632-5639; f) Y. He, J. Yin, P. Che, X. Wang, *Eur. Polym. J.* **2006**, 42, 292-301.

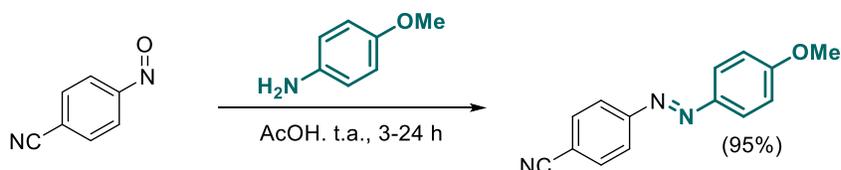
Una vez formada la sal de diazonio, existen varias propuestas mecanísticas para explicar la formación del azobenceno. La mejor contrastada supone una sustitución electrófila aromática del fenol o anilina que reacciona con el nitrógeno electrófilo de la sal de diazonio.



Esquema 1. 1. 2. 3

REACCIÓN DE MILLS

La reacción entre un nitroso derivado aromático y una anilina en ácido acético glacial, [23,24] da lugar a la formación de los azobencenos correspondientes con buenos rendimientos (Esquema 1. 1. 2. 4).

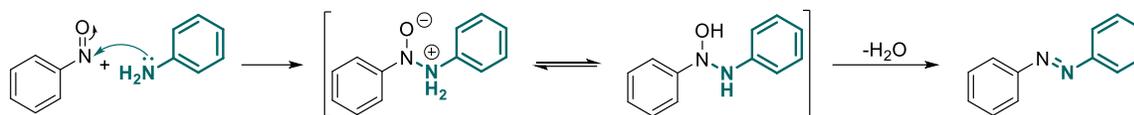


Esquema 1. 1. 2. 4

[23] J. H. Boyer en *The Chemistry of the Nitro and Nitroso Groups*, pt. 1; Ed.: Wiley Interscience: New York, **1969**, 278

[24] a) F. B. Mallory, K. E. Schueller, C. S. Wood, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 3312-3316; b) C. P. Joshua, V. N. Rajasekharan Pillai, *Tetrahedron*, **1974**, 30, 3333-3337; c) J. Rosevear, J. F. K. Wilshire, *Aust. J. Chem.* **1987**, 40, 1663-1673; d) B. Priesch, K. Rück-Braun, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2350-2352; e) M. Bose, D. Groff, J. Xie, E. Brustad, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 388-389; f) C. Tie, J. C. Gallucci, J. R. Parquette, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1162-1171

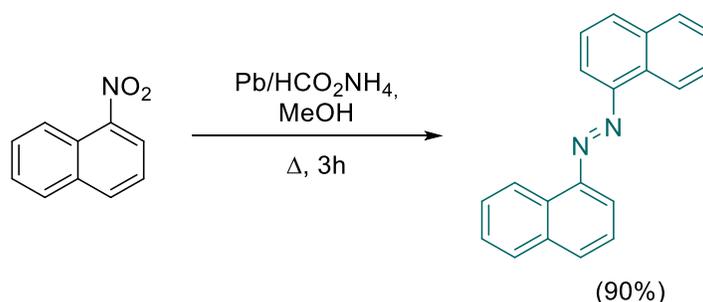
El mecanismo de esta reacción consiste en el ataque de la anilina sobre el nitroso derivado en medio ácido dando lugar a un intermedio que mediante la pérdida de una molécula de agua, evoluciona al azobenceno correspondiente (Esquema 1. 1. 2. 5).



Esquema 1. 1. 2. 5

ACOPLAMIENTO REDUCTOR DE NITRODERIVADOS AROMÁTICOS.

A partir de nitrocompuestos aromáticos sustituidos se pueden obtener azobencenos simétricos, mediante reacciones de acoplamiento reductor. Los agentes reductores más utilizados son LiAlH_4 , NaBH_4 , Zn/NaOH , Bi , Bi/KOH , o $\text{Pb}/\text{HCO}_2\text{NH}_4$ ^[25] (Esquema 1. 1. 2. 6).



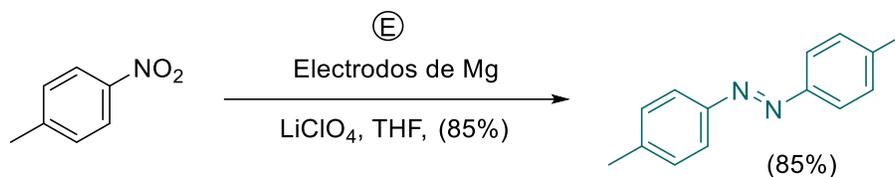
Esquema 1. 1. 2. 6

También se han usado el diisopropilamiduro de magnesio, FeO , pentacarbonil hierro/ CO , el sistema $\text{MCl}_n\text{-Mg}/\text{THF}$ (donde $\text{MCl}_n = \text{TiCl}_4, \text{VCl}_3, \text{CrCl}_3, \text{MoOCl}_3, \text{WCl}_6$ o FeCl_3)^[26] o la reducción electroquímica con electrodos de Mg (Esquema 1. 1. 2. 7).^[27]

^[25] a) G. M. Badger, J. H. Seidler, B. Thomson, *J. Chem. Soc.* **1951**, 3207-3211; b) Y. Norikane, K. Kitamoto, N. Tamaoki, *Org. Lett.*, **2002**, *4*, 3907-3910.; c) R. O. Hutchins, D. W. Lamson, L. Rufa, C. Milewski, B. J. Maryanoff, *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 803-806.; d) A. Khan, S. Hecht, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4764-4774.; e) S. Wada, M. Urano, H. Suzuki, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8254-8257.; f) D. Dey Laskar, D. Projapati, J. S. Sandhu, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 67-69.; g) S. Gowda, D. C. Gowda, *Synthesis*, **2002**, 460-462.

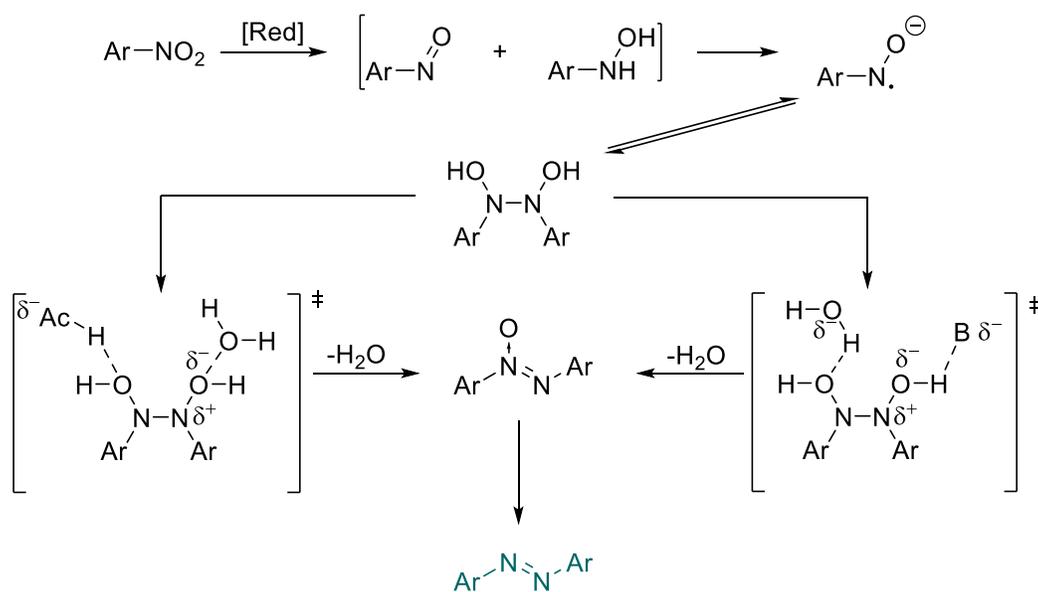
^[26] a) R. Sanchez, G. Vest, W. Scott, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4026-4027.; b) D. L. Vivian, H. C. Waterman, *J. Org. Chem.* **1956**, *21*, 914-915.; c) J. E. Kmieciak, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2014-2020.; d) P. Sobota, T. Pluzinski, S. Rummel, *Tetrahedron*, **1981**, *37*, 939-942.

^[27] S. Won, W. Kim, H. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2006**, *27*, 195-196.



Esquema 1. 1. 2. 7

La propuesta mecanística mejor contrastada para esta reacción corresponde a la reducción de los nitrocompuestos en presencia de base (Esquema 1. 1. 2. 8). El compuesto nitro aromático reacciona con el reductor para dar lugar a una mezcla del nitroso derivado y de la hidroxilamina correspondiente. En las condiciones básicas de reacción, ambos reactivos se convierten en dos aniones radicales que se acoplan, formando un enlace N-N y generando el intermedio N,N'-dihidroxisustituido. Esta especie evoluciona al azoxicompuesto tanto en medio ácido como básico acuoso, por pérdida de agua. Finalmente, el azoxicompuesto se reduce en el medio de reacción para dar lugar al azocompuesto.^[28]

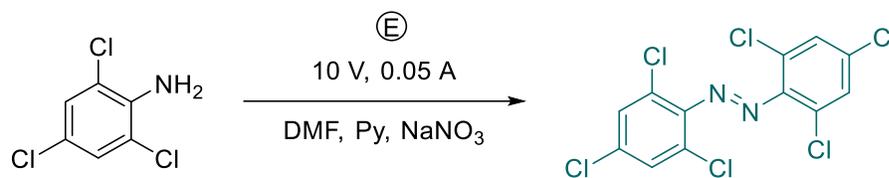


Esquema 1. 1. 2. 8

OXIDACIÓN DE ANILINAS.

^[28] a) A. R. Becker, L. A. Sternson, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1708-1710; b) M. G. Pizzolatti, R. A. Yunes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1990**, 759-764.

En 1972, se describió la oxidación electroquímica de aminas aromáticas como un nuevo método para acceder a azocompuestos aromáticos (Esquema 1. 1. 2. 9), aunque el procedimiento daba lugar a los azobencenos con bajos rendimientos (4-48%). [29]



Esquema 1. 1. 2. 9

La oxidación de aminas aromáticas para dar azobencenos se ha llevado a cabo con una amplia variedad de oxidantes como perborato sódico(NaBO_3)/AcOH, KMnO_4 soportado sobre sulfato de cobre (II) pentahidratado, $[\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3]_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y NaOCl, Ag_2CO_3 , Ag_2O , AgO , AgMnO_4 , peróxido de níquel, MnO_2 , NaBO_3 , $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, BaMnO_4 , $\text{Ce}(\text{OH})_3\text{O}_2\text{H}$, permanganato de bis(2,2'-bipiridil)cobre (II) (BBCP), $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, KO_2 , reactivos de yodo hipervalente $\text{PhI}(\text{OAc})_2$.^[30,31] También se han descrito oxidaciones aeróbicas en distintas condiciones $\text{O}_2/\text{KO}t\text{-Bu}$, $\text{O}_2/\text{Cu}_2\text{Cl}_2\text{-Piridina}$, $\text{O}_2/\text{Co}_3\text{O}_4$, peroxidasa/ H_2O_2 , O_2/CuCl y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.^[32]

[29] S. Wawzonek, T. W. McIntyre, *J. Electrochem. Soc.* **1972**, *119*, 1350-1352.

[30] a) S. Wawzonek, T. W. McIntyre, *J. Electrochem. Soc.* **1972**, *119*, 1350-1352.; b) S. M. Mehta, M. V. Vakilwala, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 563-564.; c) N. A. Noureldin, J. W. Bellegarde, *Synthesis*, **1999**, 939-942.; d) S. Patel, B. K. Mishra, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1371-1372.; e) E. T. McBee, G. W. Calundann, C. J. Morton, T. Hodgins, E. P. Wesseler, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3140-3143.; f) J. C. Stowell, C. M. Lau, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1614-1615.; g) H. Olsen, J. P. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1524-1536.; h) S. Wada, M. Urano, H. Suzuki, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8254.; i) E. Leyva, M. S. Plats, G. Persy, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 3783.

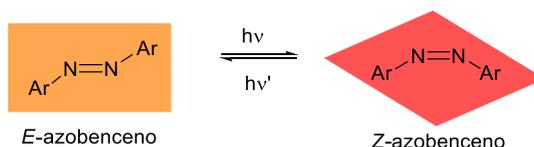
[31] a) M. Hedayatullah, J. P. Dechatre, L. Denivelle, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 2039-2042.; b) B. Ortiz, P. Villaneuva, F. Walls, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 2748-2750.; c) H. Firouzabadi, B. Vessal, M. Naderi, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 1847-1850.; d) K. Nakagawa, T. Tsuji, *Chem. Pharm. Bull.*, **1963**, *11*, 296-301.; e) A. M. Caamaño, M. E. Vazquez, J. Martínez Costas, L. Castedo, J. L. Mascareñas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3104-3107.; f) Y. Norikane, N. Tamaoki, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2595-2598.; g) S. M. Mehta, M. V. Vakilwala, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 563-564.; h) P. Santurri, F. Robbins, R. Stubbings, *Org. Synth. Coll. Vol. 5*, 1973, 341-343.; b) Y. Ogata, H. Shimizu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1979**, *52*, 635-636.; i) E. Baer, A. L. Tosoni, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2857-2858.; j) H. Firouzabadi, Z. Mostafavipoor, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 914-917.; k) H. Firouzabadi, N. Iranpoor, *Synth. Commun.* **1984**, *14*, 875-882.; l) H. Firouzabadi, A. R. Sardarian, M. Naderi, B. Vessal, *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 5001-5004.; m) J. Knabe, H. Roloff, *Chem. Ber.* **1964**, *97*, 3452-3455.; n) G. Crack, M. I. H. Makin, *Aust. J. Chem.* **1984**, *37*, 845-855.; o) K. H. Pausacker, *J. Chem. Soc.* **1953**, 1989-1990.

[32] a) L. Horner, J. Dehnert, *Chem. Ber.* **1963**, *96*, 786-797.; b) K. Kinoshita, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1959**, *32*, 777-780.; c) M. Ghedini, D. Pucci, F. Neve, *Chem. Commun.* **1996**, 137-138.; d) J. S. Belew, C. Garza, J. W. Mathieson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1970**, 634-635.; e) G. M. K. Hughes, B. C. Saunders, *J. Chem. Soc.* **1954**, 4630-4634.; f) T. Muraoka, K. Kinbara, Y. Kobayashi, T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5612-5613.; g) J. C. Stowell, C. M. Lau, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1614-1615.; h) J. L. Pinkus, L. S. Goldman, *J. Chem. Educ.* **1977**, *54*, 380-381.

1. 1. 3. APLICACIONES DE LOS AZOBENCENOS

1. 1. 3. 1. INTERRUPTORES MOLECULARES

Además de su uso como colorantes orgánicos, los azocompuestos son unos de los mejores candidatos para el diseño de interruptores moleculares (Esquema 1. 1. 3. 1). El movimiento molecular que se produce en la fotoisomerización de los azobencenos (la isomerización del grupo azo desde el isómero *trans* más estable, hasta el *cis* por efecto de la luz) se ha aprovechado para el desarrollo de fotointerruptores moleculares que han ido creciendo a lo largo de los años en complejidad, originalidad, y utilidad.^[33,34] Por ejemplo en síntesis orgánica se han desarrollado reactivos orgánicos fotointeligentes.^[35] En biología se han preparado biomoléculas fotomodulables,^[36] y en el campo de los materiales orgánicos se han incorporado azobencenos para la preparación de polímeros fotoactivos^[37] o agentes dopantes de fases cristalolíquidas.^[38,39,40]



Esquema 1. 1. 3. 1

Entre los reactivos fotointeligentes cabe señalar los descritos por los grupos de Hecht y Pericás. En ambos trabajos, la irradiación con luz de una longitud de onda determinada es

^[33] a) C. Dugave, L. Demange, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2475-2532; b) R. H. El Halabieh, O. Mermut, C. J. Barrett, *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1445-1465.

^[34] a) A. Natansohn, P. Rochon, L. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4139; b) S. Yitzchaik, T. Marks, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 197; c) I. Willner, S. Rubin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 367-385.

^[35] L. Osorio-Planes, C. Rodríguez-Esrich, M. A. Pericás, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1704.

^[36] T. Shimoboji, E. Larenas, T. Fowler, S. Kulkarni, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 16592-16596.

^[37] Y. Yu, M. Nakano, T. Ikeda, *Nature* **2003**, *425*, 145.

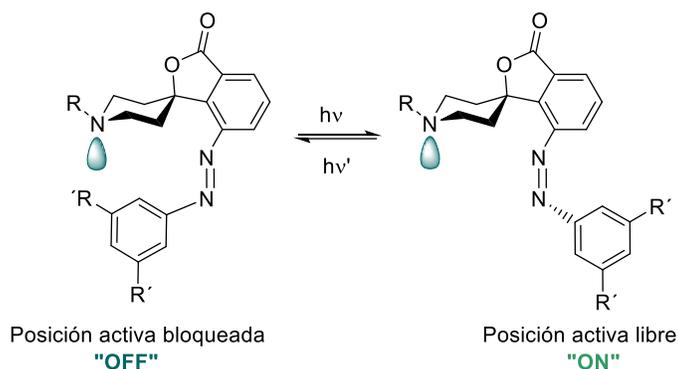
^[38] a) G. W. Gray, *Molecular and Properties of Liquid Crystals*, Academic Press, London, **1962**; b) G. Vertogen, W. H. De Jeu, *Thermotropic Liquid Crystals: Fundamentals*, Springer Heidelberg, **1987**; c) D. Pauluth, A. E. F. Watchler, *Synthesis and Applications of Chiral Liquid Crystals, and Chirality in Industry II*, ed A. N. Callins, G. N. Shelldrake, J. Crosby, Wiley, Chichester, **1997**, Chap. 13, p. 263.

^[39] S. Pieraccini, G. Gottarelli, R. Labruto, S. Masiero, O. Pandoli, G. P. Spada, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5632.

^[40] Aplicaciones de azobencenos en cristales líquidos véase: a) T. Ikeda, O. Tsutsumi, *Science* **1995**, *268*, 1873-1875. b) T. Ikeda, *J. Mater. Chem.* **2003**, *13*, 2037-2057.

la responsable de controlar la reactividad, a modo de interruptor ON/OFF, de un compuesto orgánico determinado que lleva anclado un azocompuesto.

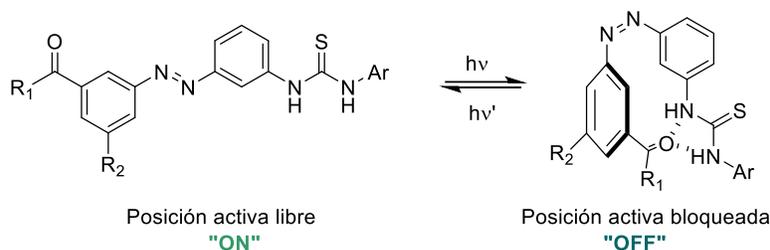
En el caso del grupo de Hecht y col.^[41] se trata de una base de Brønsted “fotointeligente” basada en una estructura de piperidina, conformacionalmente restringida, anclada a un azobenceno. En esta estructura, el par de electrones sin compartir del nitrógeno del isómero *E* se encuentra inaccesible debido al bloqueo que ejerce uno de los sustituyentes *tert*-butilo de uno de los anillos aromáticos del azobenceno. El proceso de fotoisomerización *E*→*Z* cambia la disposición de los anillos aromáticos, desbloqueando el acceso al centro básico de la piperidina. La actividad de este interruptor de tipo base de Brønsted se ha verificado en la reacción de Henry entre el *p*-nitrobenzaldehído y el nitroetano, comprobándose que tan sólo el isómero *cis* es capaz de catalizar la reacción (Esquema 1. 1. 3. 2).



Esquema 1. 1. 3. 2

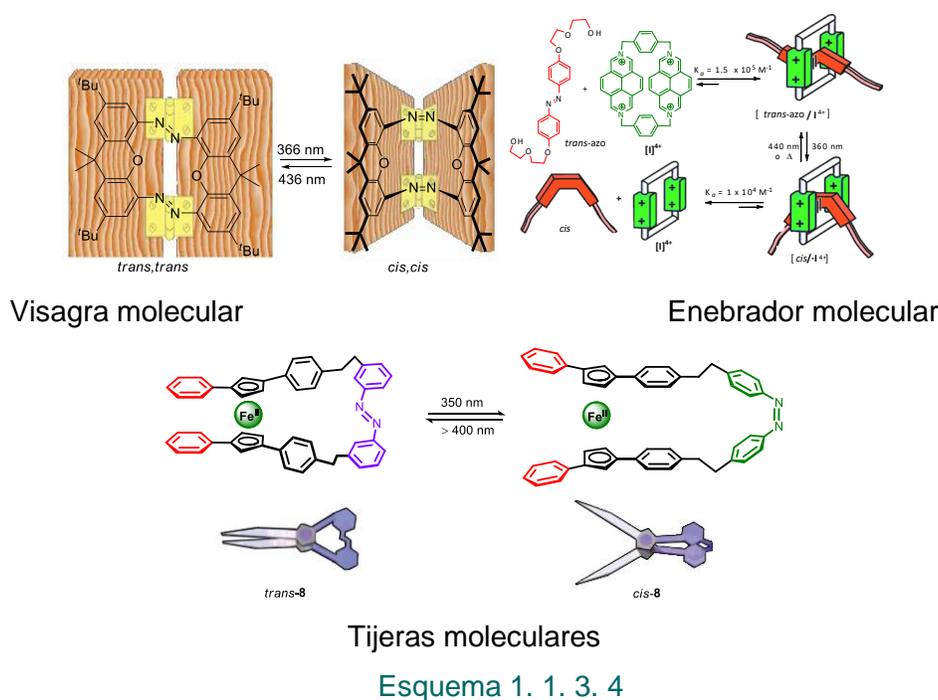
Pericás y col, publicaron la preparación de una tiourea csustituida con un azobenceno como modelo de catalizador fotointeligente ^[35]. En este caso, el isómero *cis* es el catalizador inactivo, ya que en esta configuración se establecen enlaces de hidrógeno intramoleculares que bloquean los puntos de coordinación de la tiourea como catalizador (Esquema 1. 1. 3. 3).

^[41] a) M. V. Peters, R. S. Stoll, A. Kühn, S. Hecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5968; b) R. S. Stoll, Maiké M. V. Peters, A. Kühn, S. Heiles, R. Goddard, M. Bühl, C. M. Thiele, S. Hecht *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 357.



Esquema 1. 1. 3. 3

En la bibliografía existe una multitud de ejemplos donde se aprovecha el movimiento molecular que se produce en la fotoisomerización de los azocompuestos, para la preparación de interruptores moleculares semejantes a dispositivos de la vida cotidiana, tales como la visagra molecular diseñada por Tamaoki y col.,^[42] el enhebrador molecular descrito por Stoddart, Balzani y col.^[43] o las tijeras moléculares descritas por el grupo de Aida.^[44] (Esquema 1. 1. 3. 4).

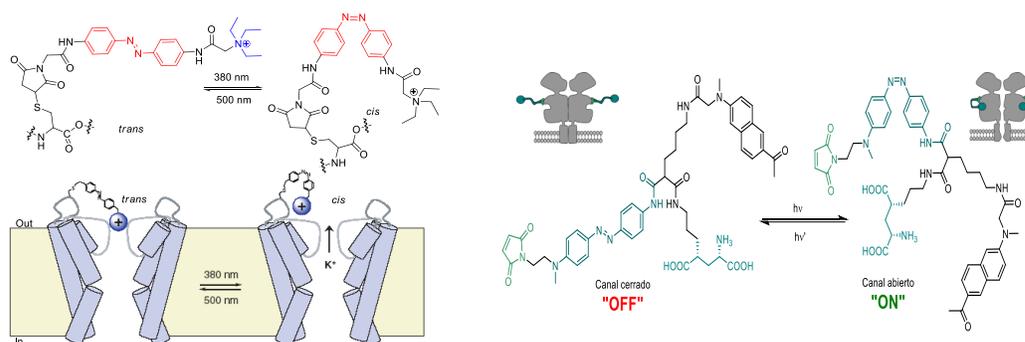


[42] Y. Norikane, N. Tamaoki, *Org. Lett.* **2004**, 6, 2595-2598.

[43] a) M. Asakawa, P. R. Ashton, V. Balzani, C. L. Brown, A. Credi, O. A. Matthews, S. P. Newton, F. M. Raymo, A. N. Shipway, N. Spencer, A. Quick, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Williams, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 860-875. b) R. Ballardini, V. Balzani, A. Credi, M. T. Gandolfi, M. Venturi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 445-455.

[44] a) T. Muraoka, K. Kinbara, Y. Kobayashi, T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5612-5613. b) T. Muraoka, K. Kinbara, T. Aida, *Chem. Commun.* **2007**, 1441-1443.

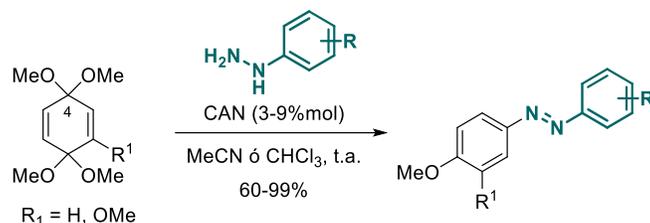
En el terreno biológico, [45] los azobenzenos se han anclado a biomoléculas, para controlar espacial y temporalmente una gran variedad de procesos biológicos por regulación directa de la actividad de enzimas, [46,47] péptidos y polipéptidos, [48] receptores [49] o canales de iones. [50] Se han empleado también como herramienta para controlar la apertura y el cierre de poros en membranas celulares, esencial para el transporte de iones. [51] Unos ejemplos muy ilustrativos son los descritos por Trauner, Kramer y col. para controlar el canal de iones K⁺ en células neuronales o el descrito por Gorostiza y col. [52,53] para fotocontrolar la actividad de receptores de kainato que desempeñan un papel muy importante en la señal sináptica (Esquema 1. 1. 3. 5).



Esquema 1. 1. 3. 5

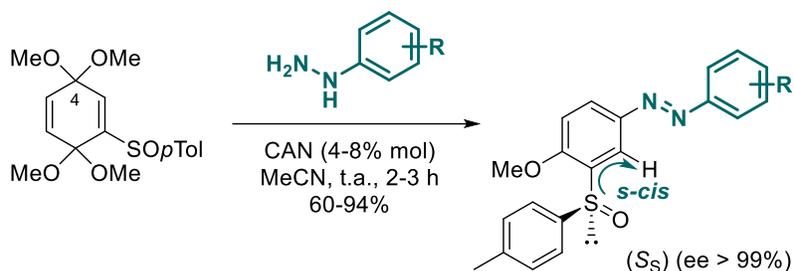
- [45] a) T. E. Schrader, W. J. Schreier, T. Cordes, F. O. Koller, G. Babitzki, R. Denschlag, C. Renner, M. Löweneck, S.-L. Dong, L. Moroder, P. Tavan, W. Zinth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2007**, *104*, 15729-15734; b) H. Asanuma, X. Liang, H. Nishioka, D. O Matsunaga, M. Liu, M. Komiyama, *Nature Prot.* **2007**, *2*, 203-212; c) O. Srinivas, A. Surolia, N. Jayaraman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2124-2125; d) L. Guerrero, O. S. Smart, C. J. Weston, D. C. Burns, G. A. Woolley, R. K. Allemann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7778-7782; e) A. M. Caamaño, M. E. Vázquez, J. Martínez-Costas, L. Castedo, J. L. Mascareñas, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3104-3107.
- [46] T. Shimoboji, E. Larenas, T. Fowler, S. Kulkarni, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 16592-16596.
- [47] a) P. R. Westmark, J. P. Kelly, B. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3416-3419; b) T. Hoshaka, K. Kawashima, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 413-414; c) K. Nakayama, M. Endo, T. Majima, *Chem. Commun.* **2004**, *21*, 2386-2387; d) I. Willner, S. Rubin, A. Riklin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3321-3325.
- [48] a) S.-L. Dong, M. Loeweneck, T. E. Schrader, W. J. Schreier, W. Zinth, L. Moroder, C. Renner, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1114-1120; b) G. A. Woolley, A. S. I. Jaikaran, M. Berezovski, J. P. Calarco, S. N. Krylov, O. S. Smart, J. R. Kumita, *Biochem.* **2006**, *45*, 6075-6084; c) C. Renner, U. Kusebauch, M. Löweneck, A. G. Milbradt, L. Moroder, *J. Pep. Res.* **2005**, *65*, 4-14; d) O. Pieroni, A. Fissi, N. Angelini, F. Lenci, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 9-17; e) I. Willner, S. Rubin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1996**, *35*, 367-385; f) C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem*. **2006**, *7*, 868-878; g) A. Aemissegger, V. Kräutler, W. F. Van Gunsteren, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2929-2936.
- [49] F. G. Cruz, J. T. Koh, K. H. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8777-8778.
- [50] a) L. Lien, D. C. J. Jaikaran, Z. Zhang, G. A. Woolley, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12222-12223; b) M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 1381-1386.
- [51] T. Sata, Y. Shimokawa, K. Matsusaki, *J. Membr. Sci.* **2000**, *171*, 31-43.
- [52] M Gascón-Moya, J. J. Hirtz, S. Pittolo, K. E. Poskanzer, É. Ferrer, R. Alibés, F. Busqué, R. Yuste, J. Hernando, P. Gorostiza, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8693.
- [53] M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 1381.

En nuestro grupo de investigación se desarrolló un nuevo método de síntesis de azobencenos asimétricos a partir de bisacetales de *p*-benzoquinona y arilhidracinas en presencia de nitrato cérico amónico $[(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]]$ (CAN) como catalizador del proceso (Esquema 1. 1. 3. 6).



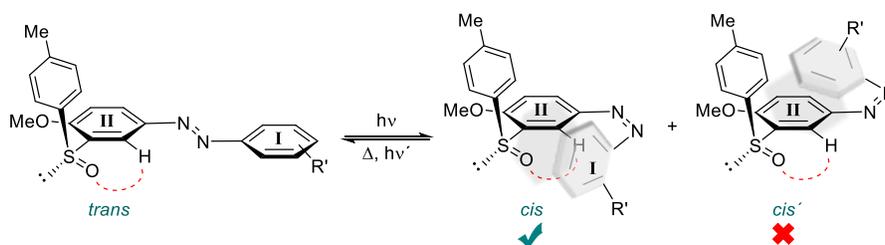
Esquema 1. 1. 3. 6

Esta nueva metodología permitió el acceso a una nueva familia de azobencenos enantioméricamente puros. Esta quiralidad se debía a la inclusión de un resto sulfóxido enantiopuro (Esquema 1. 1. 3. 7).



Esquema 1. 1. 3. 7

El estudio del proceso de fotoisomerización de estos nuevos sulfonil-azobencenos puso de manifiesto el papel del sulfóxido como un excelente director del movimiento molecular. Cuando estos nuevos azobencenos quirales pasaban del isómero *trans* al *cis* mediante la irradiación con luz UV, evolucionan a un único estereoisómero helicoidal de los dos posibles (Esquema 1. 1. 3. 8).

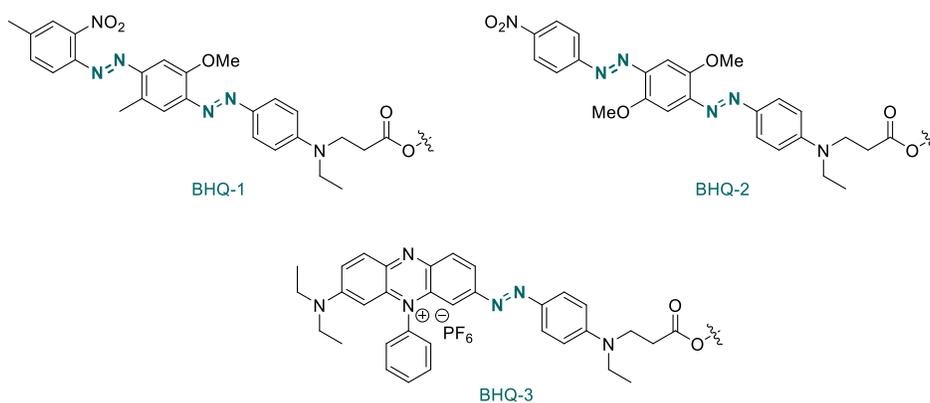


Esquema 1. 1. 3. 8

1. 1. 3. 2. AZOCOMPUESTOS COMO INHIBIDORES DE LA FLUORESCENCIA

Otra de las aplicaciones más destacadas de los azocompuestos se debe a su comportamiento como inhibidores de la fluorescencia. Cuando un azocompuesto se encuentran unido, bien directamente o a través de cadenas de diferente longitud, a determinados fluoróforos orgánicos, se produce la inhibición de su fluorescencia. Esta inhibición está asociada a procesos de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), procesos de transferencia electrónica fotoinducida (PeT), o bien a procesos de transferencia de carga intramolecular (ICT), desde el fluoróforo al grupo azo (**N=N**), que a su vez emplea en procesos no-radiativos de fotoisomerización [54].

Este tipo de azocompuestos son conocidos en inglés con el nombre de “azo-base non-fluorescent quenching dyes” (azo-NFQ). Los más conocidos son los denominados BHQ (de las siglas en inglés: **B**lack **H**ole **Q**uenchers) de los que existen varios tipos (BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3) (Esquema 1. 1. 3. 9).



Esquema 1. 1. 3. 9

Estos derivados se emplean como agentes de contraste en bioimagen [55]. Esta amplia gama de inhibidores, inhiben la fluorescencia en diferentes zonas del espectro electromagnético en función de su tipo y de su patrón de sustitución. Algunos de ellos son comerciales (Biosearch Technologies), con precios que fluctúan según su grado de sofisticación [56]

[54] *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 10994.

[55] *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1686.

[56] Los BHQ-3 más sencillos como el BHQ-3000-5 o el BHQ-3000S-5 cuestan entre 114-140\$ los 5 mg (Biosearch technologies).

(Figura 1. 1. 3. 1: Rango de longitudes de onda de los dark quenchers comercialmente disponibles más empleados.

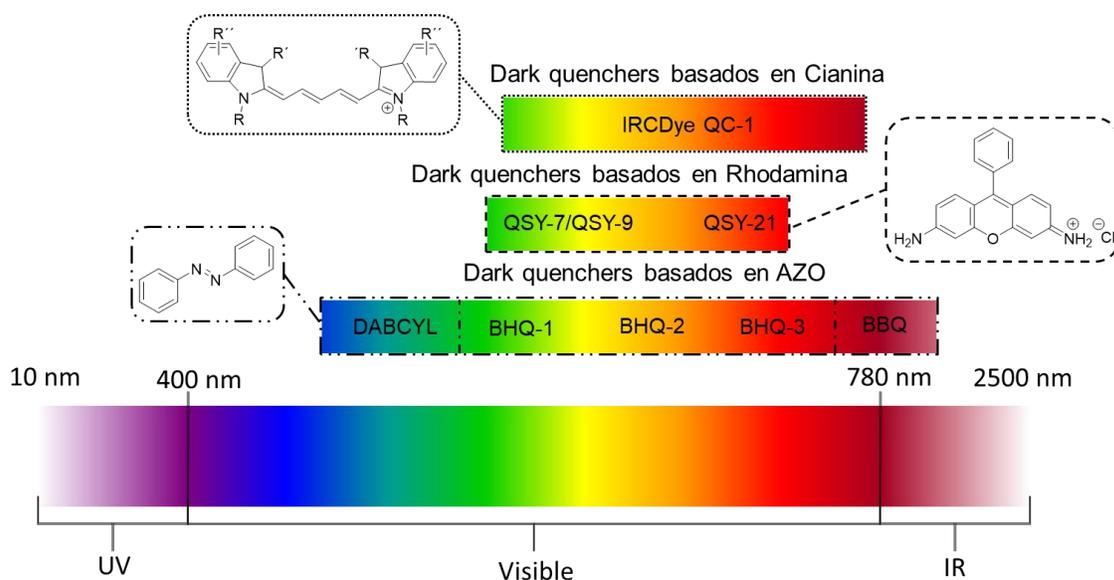


Figura 1. 1. 3. 1: Rango de longitudes de onda de los dark quenchers comercialmente disponibles más empleados.

Recientemente, este tipo de azos-conjugados con fluoróforos se han utilizado como sensores para la detección de hipoxia empleando técnicas de bioimagen. La hipoxia es una condición de un tejido o un conjunto de células asociado a niveles bajos de oxígeno, que lleva implícita la sobreexpresión de enzimas reductoras, entre ellas las azoreductasas. La hipoxia es un síntoma presente en lesiones asociadas a procesos inflamatorios ^[57], a tejidos isquémicos o a células cancerígenas de tumores sólidos ^[58].

En el año 2010, Nagano *et al.* describió un derivado de azobenceno de tipo BHQ-3 unido a un fluoróforo de tipo cianina, para la detección *in vivo* de hipoxia en tejidos con isquemia aguda (Figura 1. 1. 3. 2: A) Células MCF-7 tratadas con 1 μ M n. B) Variación de la fluorescencia en función de la cantidad de oxígeno. barra de escala: 50 μ m. ^[59]

^[57] H. K. Eltzschig, P. Carmeliet, *N. Engl. J. Med.* **2011**, 364, 656.

^[58] W. R. Wilson, M. P. Hay, *Nat. Rev. Cancer*, **2011**, 11, 393.

^[59] K. Kiyose, K. Hanaoka, D. Oushiki, T. Nakamura, M. Kajimura, M. Suematsu, H. Nishimatsu, T. Yamane, T. Terai, Y. Hirata, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 15846.

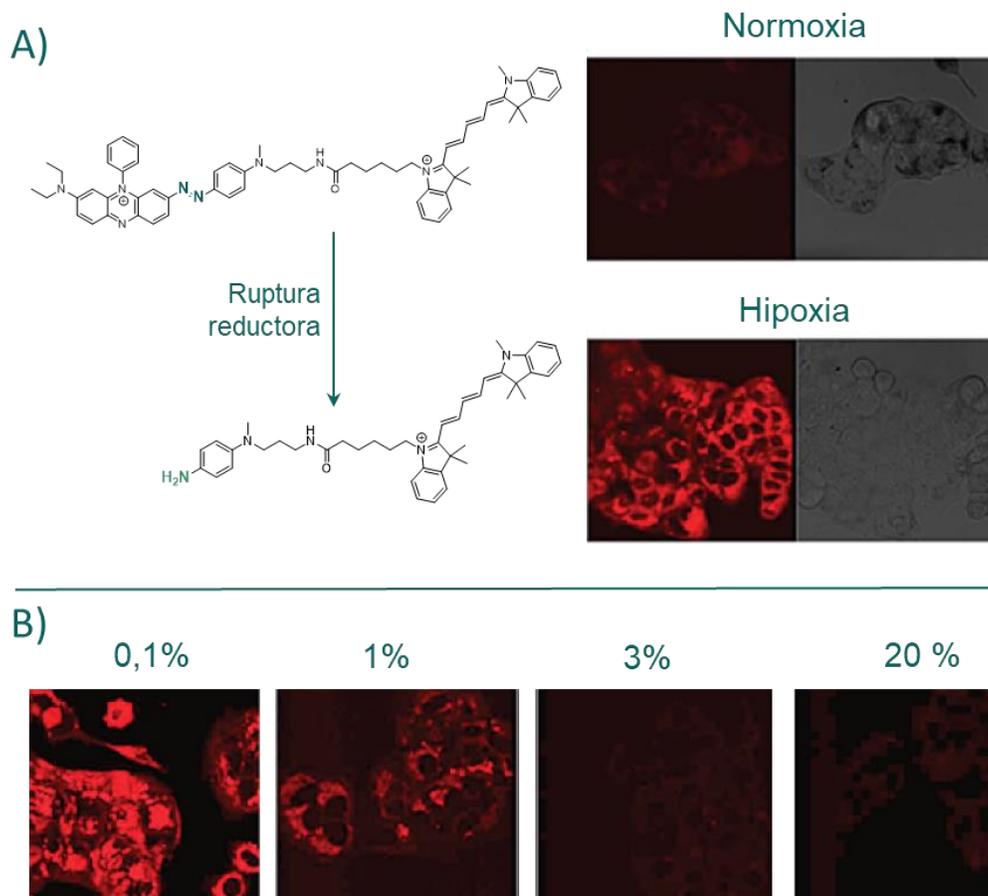
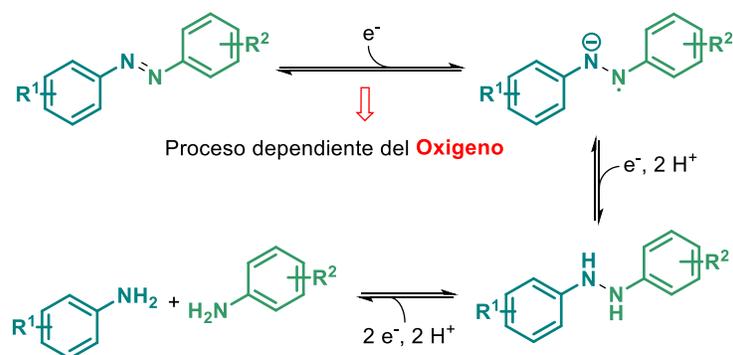


Figura 1. 1. 3. 2: A) Células MCF-7 tratadas con $1 \mu\text{M}$ n. B) Variación de la fluorescencia en función de la cantidad de oxígeno. barra de escala: $50 \mu\text{m}$.

Esta estrategia aprovecha dos características de los azocompuestos, primero su capacidad para inhibir la fluorescencia de un fluoróforo, y segundo la posibilidad de reducir el doble enlace $\text{N}=\text{N}$. El doble enlace $\text{N}=\text{N}$ puede reducirse a la correspondiente diarilhidracina en un proceso reversible de 2 electrones y dos protones, que a su vez pueden reducirse para formar las correspondientes aminas, en un proceso global de 4 electrones y cuatro protones. La primera semirreducción de los azocompuestos, para formar el correspondiente anión radical, es muy dependiente del oxígeno del medio, de forma que en medios reductores y en ausencia de oxígeno evoluciona hasta la hidracina y esta a su vez a las correspondientes anilinas (Esquema 1. 1. 3. 10).



Esquema 1. 1. 3. 10

La falta de oxígeno que hay en los medios con hipoxia y la sobreexpresión de reductasas, hace que estos azoderivados puedan ser empleados como sensores de hipoxia empleando técnicas de bioimagen, ya que tras la ruptura reductora del grupo N=N, el fluoróforo recupera su fluorescencia.^[60]

A raíz del trabajo de Nagano y col. se han publicado diferentes ejemplos de azobencenos unidos a fluoróforos de tipo rodamina B, fluoresceína, porfirinas, perilenos, pirenos 1,8-naftalimidias, BODIPys y se ha probado su utilidad en la detección de diferentes niveles de hipoxia.^[61]

Todos estos trabajos reflejan el gran potencial de estos azo-NFQ (“azo-base non-fluorescent quenching dyes”), para la detección de hipoxia generalmente en experimentos *in vitro*, empleando la espectroscopia de fluorescencia para visualizar el evento con unos rangos de intensidad de luminiscencia alta.

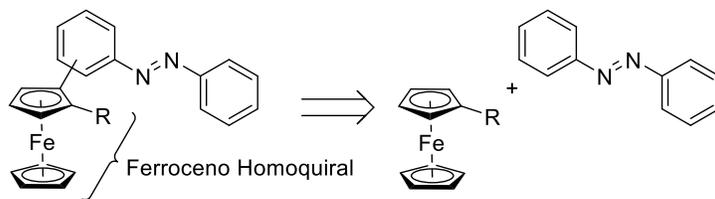
^[60] *Curr. Org. Synth.* **2011**, 8, 498, *Chem. Commun.* **2005**, 5487; The Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th ed., Invitrogen, Oregon, **2006**.

^[61] A. Chevalier, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Chem. Asian J.* **2017**, 12, 2008.

Continuando los estudios de nuestro grupo de investigación centrados en la preparación y estudio de azobencenos con un patrón nuevo de sustitución, se plantearon dos objetivos generales en esta tesis doctoral que se indican a continuación:

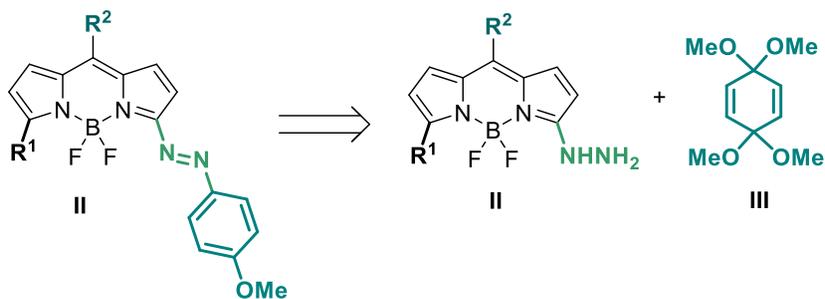
1. SÍNTESIS Y PROPIEDADES DE FERROCENILSULFINIL AZOBENCENOS ENANTIOPUROS.

En este capítulo se recoge la preparación de una nueva familia de fotointerruptores quirales de tipo azobenceno anclados a sulfonilferrocenos homocirales, y el estudio detallado de sus propiedades fotofísicas, incluyendo el proceso de fotoisomerización, con el fin de establecer la influencia de la quiralidad planar y central en la conformación y configuración de los azobencenos E y Z.



2. PREPARACIÓN DE AZOCOMPUESTOS COMO INHIBIDORES DE LA FLUORESCENCIA DE BODIPYS.

En este capítulo de la presente se ha aplicado la metodología de síntesis de azobencenos desarrollada en el grupo de investigación, basada en la reacción entre bisacetales de quinona y arilhidracinas, para la preparación de BODIPYs azo sustituidos, mediante la reacción de hidracinas-BODIPY sustituidas y bisacetales de quinona.



Asimismo, se recoge el estudio de sus propiedades fotofísicas, incluyendo espectros de UV, fluorescencia y propiedades electroquímicas. Se ha evaluado la reducción de los azocompuestos tanto con reductores químicos como enzimáticos. El estudio de la reducción enzimática se realizó en colaboración con el grupo de Ingeniería Enzimática del Instituto de

Catálisis del CSIC (Prof. Jose Manuel Guisán Seijas, Dpto de Biocatálisis, CSIC-UAM), estudiándose, a continuación, las propiedades fotofísicas de los BODIPYs resultantes de la ruptura reductora del azobenceno. Finalmente se han evaluado sus propiedades biológicas relativas a la toxicidad y su localización en condiciones de normoxia e hipoxia. Esta última parte del trabajo se ha realizado en colaboración con el profesor Francisco Sanz de la Facultad de Biología de la UAM.

Capítulo 2

Síntesis de nuevos Ferrocenilazobencenos quirales y estudio de sus propiedades

2. 1. INTRODUCCIÓN.

2. 1. 1. INTERRUPTORES MOLECULARES

Como se ha indicado anteriormente, los interruptores moleculares son moléculas que pueden interconvertirse mediante un estímulo externo entre dos formas diferentes **A** y **B**, cambiando sus propiedades físicas o químicas [Figura 2. 1. 1. 1](#).

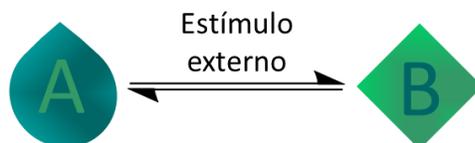


Figura 2. 1. 1. 1

En general, es esencial que los cambios en las propiedades físicas y químicas sean observables y/o medibles en un interruptor molecular. Estos cambios en las propiedades requieren algunos cambios en la estructura molecular, los cuales están relacionados normalmente con la conformación, la configuración y/o el estado de oxidación.

Un parámetro clave para conseguir la transición entre las formas interconvertibles **A** y **B** es el estímulo externo. De su naturaleza dependerá en gran medida el campo de aplicación deseado para el interruptor molecular además de definir la naturaleza de este último. El estímulo puede ser de origen físico, tal como una variación de la temperatura o la presión, una radiación electromagnética, campos eléctricos o irradiaciones con luz de una determinada longitud de onda. El estímulo también puede ser químico como, por ejemplo, procesos donde haya una variación del pH, empleo de reactivos redox o procesos de coordinación.

Dentro de campo de los interruptores moleculares, los denominados fotointerruptores moleculares son sistemas que por efecto de una irradiación con luz de una determinada longitud de onda sufren un cambio reversible entre dos estados [Figura 2. 1. 1. 2](#).

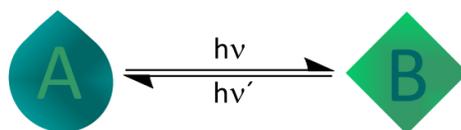


Figura 2. 1. 1. 2

Algunos ejemplos de fotointerruptores moleculares son los derivados de estilbeno, diariletilenos, o espiropiranos, recogidos en el [Figura 2. 1. 1. 3](#) ^[62] que corresponden a los sistemas más habituales.

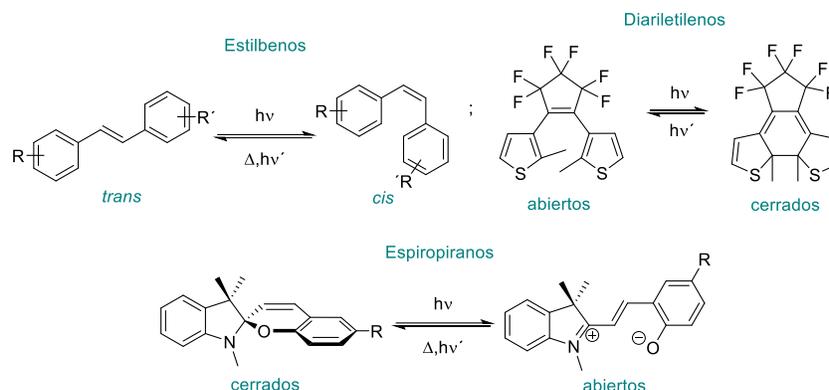


Figura 2. 1. 1. 3

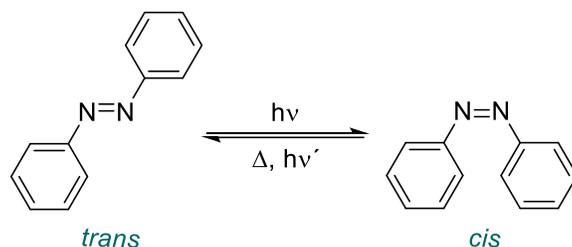
Los requisitos más importantes para que una molécula pueda comportarse como un *foto*-interruptor molecular son:

- I) La existencia de dos especies que puedan convertirse de forma reversible entre sí selectivamente por irradiación con luz de una determinada longitud de onda.
- II) La interconversión térmica entre las dos especies no debe ocurrir en un rango amplio de temperatura para permitir así el almacenaje de información de forma casi infinita.
- III) Las dos especies deben tener una resistencia apreciable a la fatiga (número de ciclos que soportan sin descomponerse), con la posibilidad de llevar a cabo varias veces el ciclo de escritura/borrado y no debe producirse degradación térmica y/o fotoquímica a productos colaterales.
- IV) Las dos formas estructurales deben ser fácilmente detectables y diferenciables.
- V) Para que el proceso sea eficiente deben alcanzarse altos rendimientos cuánticos utilizando periodos de irradiación cortos.
- VI) Es necesario que todas las propiedades permanezcan inalteradas cuando el compuesto utilizado como *foto*-interruptor forma parte de una estructura macromolecular.

^[62] B. L. Feringa, R. A. van Delden, N. Koumura, E. M. Geertsema, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1789.

2. 1. 2. AZOBENCENOS COMO FOTOINTERRUPTORES MOLECULARES

El movimiento molecular que se produce en la fotoisomerización de los azobencenos representado en el Esquema 2. 1. 2. 1 (la isomerización del grupo azo desde el isómero *trans* más estable, hasta el *cis* por efecto de la luz) se ha aprovechado para el desarrollo de azoestructuras que han ido creciendo a lo largo de los años en complejidad, originalidad utilidad y aplicaciones [63]. Hoy día ya se han descrito azocompuestos que se comportan como polímeros [64] o enzimas inteligentes,[65, 66] así como una amplia variedad de sustratos con gran diversidad estructural que se comportan como imaquinas moleculares [67].



Esquema 2. 1. 2. 1

Entre los reactivos fotointeligentes cabe señalar los descritos por los grupos de Hench y Pericas. En ambos grupos, la irradiación con luz de una longitud de onda determinada es la responsable de controlar la reactividad, a modo de interruptor “ON”/“OFF”, de un compuesto orgánico determinado que lleva anclado un azocompuesto.

[63] a) C. Dugave, L. Demange, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2475; b) A. Natansohn, P. Rochon, L. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4139; c) R. H. El Halabieh, O. Mermut, C. J. Barrett, *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1445; d) S. Yitzchaik, T. Marks, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 197; e) I. Willner, S. Rubin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 367.

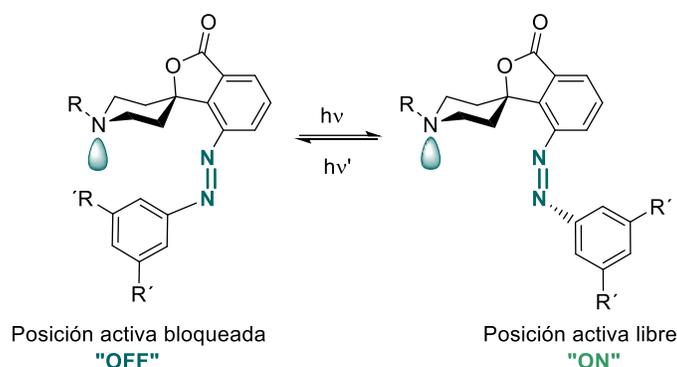
[64] Y. Yu, M. Nakano, T. Ikeda, *Nature*, **2003**, *425*, 145

[65] T. Shimoboji, E. Larenas, T. Fowler, S. Kulkarni, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 16592.

[66] A. Bautista-Barrufet, F. López-Gallego, V. Rojas-Cervellera, C. Rovira, M. A. Pericàs, J. M. Guisán, P. Gorostiza, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 1004.

[67] a) *Molecular Switches*; (Ed.: B. L. Feringa), Wiley-VCH GmbH: Weinheim, Germany, **2001**; b) *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1685. (volumen monográfico); c) T. Hugel, N. B. Holland, A. Cattani, L. Moroder, M. seitz, H. E. Gaub, *Science* **2002**, *296*, 1103; d) V. Balzani, A. Credi, B. Ferrer, S. S. M. Venturi, *Top. Curr. Chem.* **2005**, *262*, 1.; e) K. Kinbara, T. Aida, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1377-1400.; f) M. Yamada, M. Kondo, J. Mamiya, Y. Yu, M. Kinoshita, C. J. Barret, T. Ikeda, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 4986.; g) C.J. Barrett, J.-I. Mamiya, K G. Yager, T. Ikeda, *Soft Matter*, **2007**, *3*, 1249.; h) K. Ichimura, S.-K. Oh, M. Nakagawa *Science* **2000**, *288*, 1624-1626.

En el caso del grupo de Hecht y col. ^[68] se trata de una base de Brønsted “fotointeligente” **1** basada en una estructura de piperidina, conformacionalmente restringida, anclada a un azobenceno **Esquema 2. 1. 2. 2**. En esta estructura, el par de electrones sin compartir del nitrógeno del isómero *E* se encuentra inaccesible debido al bloqueo que ejerce uno de los sustituyentes *tert*-butilo de uno de los anillos aromáticos del azobenceno. El proceso de fotoisomerización *E*→*Z* cambia la disposición de los anillos aromáticos, desbloqueando el acceso al centro básico de la piperidina. La actividad de este interruptor de tipo base de Brønsted se ha verificado en la reacción de Henry entre el *p*-nitrobenzaldehído y el nitroetano, comprobándose que tan sólo el isómero *cis* es capaz de catalizar la reacción.

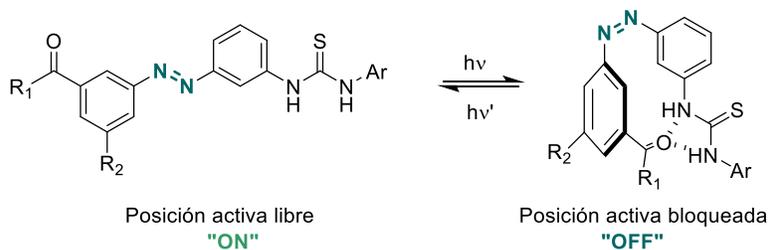


Esquema 2. 1. 2. 2

Pericas y col, publicaron la preparación de una tiourea sustituida con un azobenceno como modelo de catalizador fotointeligente **2** ^[69]. En este caso, el isómero *cis* es el catalizador inactivo, ya que en esta configuración se establecen enlaces de hidrógeno intramoleculares que bloquean los puntos de coordinación de la tiourea como catalizador **Esquema 2. 1. 2. 3**.

^[68] a) M. V. Peters, R. S. Stoll, A. Kühn, S. Hecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5968; b) R. S. Stoll, Maïke M. V. Peters, A. Kühn, S. Heiles, R. Goddard, M. Bühl, C. M. Thiele, S. Hecht *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 357.

^[69] L. Osorio-Planes, C. Rodríguez-Esrich, M. A. Pericàs, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1704.



Esquema 2. 1. 2. 3

En la bibliografía existen una multitud de ejemplos donde aprovechan el movimiento molecular que se produce en la fotoisomerización del azocompuesto, para la preparación de interruptores moleculares semejantes a dispositivos de la vida cotidiana, tales como la bisagra molecular **3** diseñada por Tamaoki y col [70], el enebrador molecular **4** descrito por Stoddart, Balzani y col. [71] o las tijeras moléculas **5** descritas por el grupo de Aida [72] (Figura 2. 1. 2. 1).

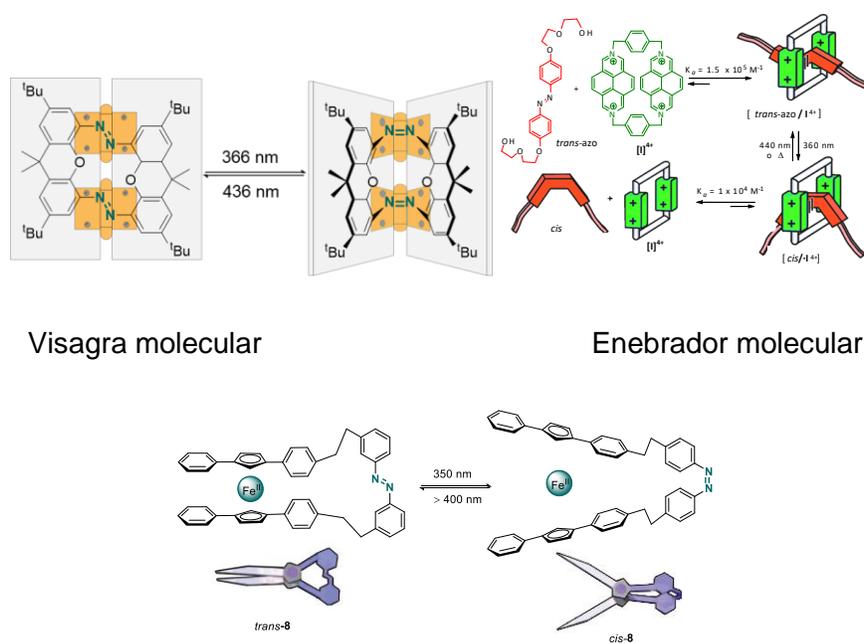


Figura 2. 1. 2. 1

[70] Y. Norikane, N. Tamaoki, *Org. Lett.* **2004**, 6, 2595.

[71] a) M. Asakawa, P. R. Ashton, V. Balzani, C. L. Brown, A. Credi, O. A. Matthews, S. P. Newton, F. M. Raymo, A. N. Shipway, N. Spencer, A. Quick, J. F. Stoddart, A. J. P. White, D. J. Williams, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 860. b) R. Ballardini, V. Balzani, A. Credi, M. T. Gandolfi, M. Venturi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 445.

[72] a) T. Muraoka, K. Kinbara, Y. Kobayashi, T. Aida, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5612. b) T. Muraoka, K. Kinbara, T. Aida, *Chem. Commun.* **2007**, 1441.

En el terreo biológico ^[73], los azobenzenos se han anclando a biomoléculas, para controlar espacial y temporalmente una gran variedad de procesos biológicos por regulación directa de la actividad de enzimas ^[74,75], péptidos y polipéptidos ^[76], receptores ^[77] o canales de iones ^[78], se ha empleado también como herramienta para controlar la apertura y el cierre de poros en membranas celulares, esencial para el transporte de iones ^[79]. Unos ejemplos muy ilustrativos son los descritos por Trauner, Kramer y col. para controlar el canal de iones K⁺ en células neuronales **6** o el descrito por Gorostiza y col. ^[80,81] Para fotocontrolar la actividad de receptores de kainato **7** que desempeñan un papel muy importante en la señal sináptica (Figura 2. 1. 2. 2)

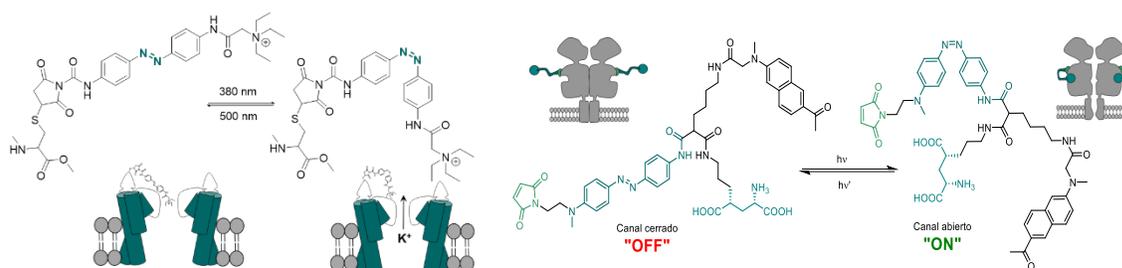


Figura 2. 1. 2. 2

2. 1. 3. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

^[73] a) T. E. Schrader, W. J. Schreier, T. Cordes, F. O. Koller, G. Babitzki, R. Denschlag, C. Renner, M. Löweneck, S.-L. Dong, L. Moroder, P. Tavan, W. Zinth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2007**, *104*, 15729-15734; b) H. Asanuma, X. Liang, H. Nishioka, D. O Matsunaga, M. Liu, M. Komiyama, *Nature Prot.* **2007**, *2*, 203-212; c) O. Srinivas, A. Surolia, N. Jayaraman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2124-2125; d) L. Guerrero, O. S. Smart, C. J. Weston, D. C. Burns, G. A. Woolley, R. K. Allemann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7778-7782; e) A. M. Caamaño, M. E. Vázquez, J. Martínez-Costas, L. Castedo, J. L. Mascareñas, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3104-3107.

^[74] T. Shimoboji, E. Larenas, T. Fowler, S. Kulkarni, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 16592-16596.

^[75] a) P. R. Westmark, J. P. Kelly, B. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3416-3419; b) T. Hohsaka, K. Kawashima, M. Sisido, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 413-414; c) K. Nakayama, M. Endo, T. Majima, *Chem. Commun.* **2004**, *21*, 2386-2387; d) I. Willner, S. Rubin, A. Riklin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3321-3325.

^[76] a) S.-L. Dong, M. Loeweneck, T. E. Schrader, W. J. Schreier, W. Zinth, L. Moroder, C. Renner, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1114-1120; b) G. A. Woolley, A. S. I. Jaikaran, M. Berezovski, J. P. Calarco, S. N. Krylov, O. S. Smart, J. R. Kumita, *Biochem.* **2006**, *45*, 6075-6084; c) C. Renner, U. Kusebauch, M. Löweneck, A. G. Milbradt, L. Moroder, *J. Pep. Res.* **2005**, *65*, 4-14; d) O. Pieroni, A. Fissi, N. Angelini, F. Lenci, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 9-17; e) I. Willner, S. Rubin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1996**, *35*, 367-385; f) C. Renner, L. Moroder, *ChemBioChem.* **2006**, *7*, 868-878; g) A. Aemissegger, V. Kräutler, W. F. Van Gunsteren, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2929-2936.

^[77] F. G. Cruz, J. T. Koh, K. H. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8777-8778.

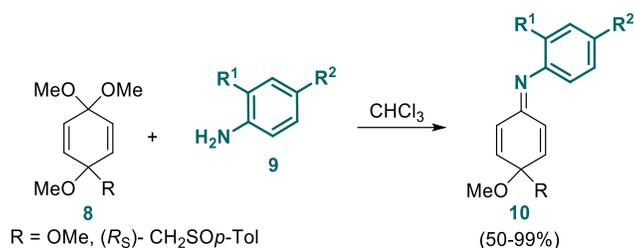
^[78] a) L. Lien, D. C. J. Jaikaran, Z. Zhang, G. A. Woolley, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12222.; b) M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 1381.

^[79] T. Sata, Y. Shimokawa, K. Matsusaki, *J. Membr. Sci.* **2000**, *171*, 31-43.

^[80] M. Gascón-Moya, J. J. Hirtz, S. Pittolo, K. E. Poskanzer, E. Ferrer, R. Alibés, F. Busqué, R. Yuste, J. Hernando, P. Gorostiza, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8693.

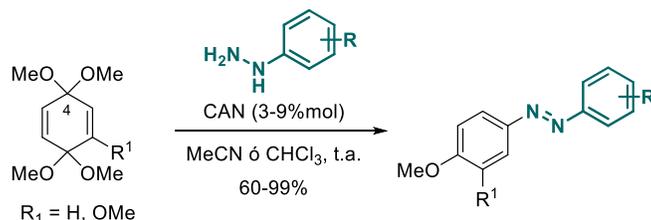
^[81] M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer, *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 1381- 1386.

Durante varios años, nuestro grupo de investigación ha centrado su atención en la síntesis y aplicaciones de los azocompuestos. Esta línea de trabajo surgió como consecuencia de un trabajo realizado previamente enfocado al estudio de las reacciones de los acetales de *p*-benzoquinona **8** con anilinas **9**.^[82] Estas reacciones habían conducido a la formación de derivados de *p*-benzoquinoniminas **10**, en un proceso que transcurre en condiciones muy suaves, en ausencia de catalizadores y con buenos rendimientos. El método mostró ser muy general para distintos acetales de cetona y aldehidos (Esquema 2. 1. 3. 1).



Esquema 2. 1. 3. 1

Con posterioridad se amplió este estudio a la reacción entre los bisacetales de quinona **8** y arilhidracinas **11** dando lugar a la formación exclusiva de azobencenos **12** (Esquema 2. 1. 3. 2).^[83] El proceso transcurría de forma muy limpia y eficaz en presencia de nitrato cérico amónico $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$ (CAN) como catalizador del proceso. Además, cuando el bisacetal de *p*-benzoquinona se encontraba 2-sustituido ($\text{R}^1 \neq \text{H}$) la reacción resultó altamente regioselectiva, dando lugar al producto de reacción sobre el acetal en el carbono C-4, menos congestionado.



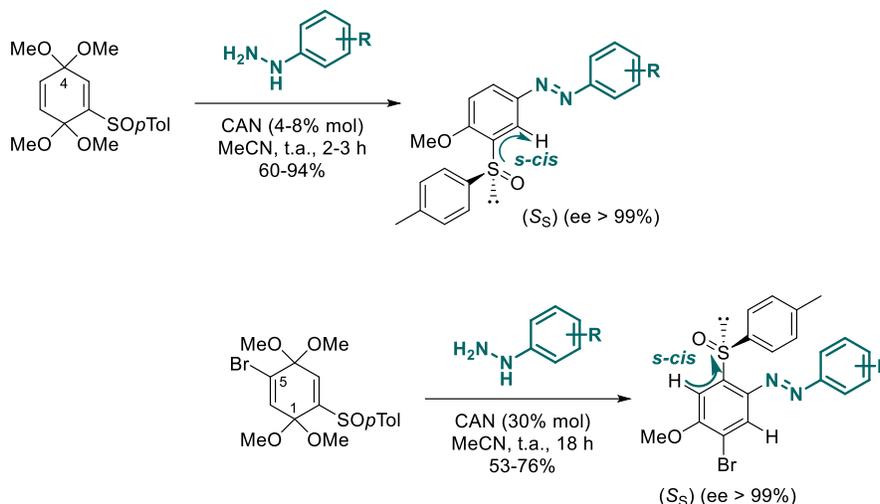
Esquema 2. 1. 3. 2

La experiencia adquirida en el grupo relativa al empleo de sulfóxidos en síntesis asimétrica, permitió desarrollar un método eficaz para la síntesis de azobencenos 2- y 3-*p*-

^[82] M. C. Carreño, J. M. Cuerva, M. Ribagorda, A. M. Echevarren, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1449.

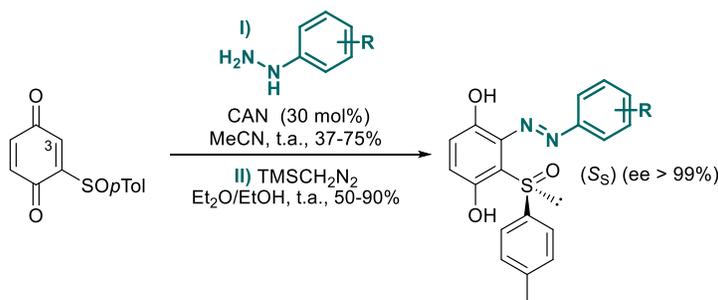
^[83] G. F. Mudarra, E. Merino, M. Ribagorda, M. C. Carreño, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3413-3416.

tolilsulfinil sustituidos (**13** y **14**) ^[84] de forma completamente regioselectiva a partir de arilhidracinas comerciales y bisacetales de *p*-benzoquinona (*S*)-*p*-tolilsulfinil sustituidos (Esquema 2. 1. 3. 3).



Esquema 2. 1. 3. 3

También, se sintetizó una serie de azobencenos *orto,orto*-disustituídos (**15**) a partir de (*S*)-2-(*p*-tolilsulfinil)benzoquinona (**16**) y las arilhidracinas comerciales (**11**) ^[85] (Esquema 2. 1. 3. 4).



Esquema 2. 1. 3. 4

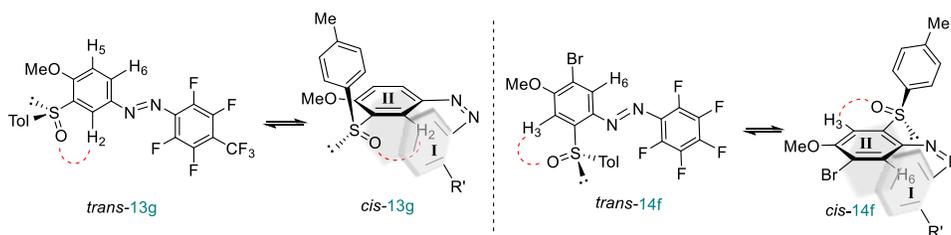
En todos los casos, las reacciones se llevan a cabo en condiciones de reacción muy suaves proporcionando los correspondientes sulfinil azobencenos enantioméricamente puros.

^[84] A) I. García, E. Merino, S. Pieraccini, M. Ribagorda, G. P. Spada, M. C. Carreño, *Org. Lett.* **2005**, 7, 2869. B) I. García, E. Merino, S. Pieraccini, M. Ribagorda, G. P. Spada, M. C. Carreño, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 7089

^[85] I. Nuñez, E. Merino, M. Lecea, S. Pieraccini, Gian Piero Spada, C. Rosini, G. Mazzeo, M. Ribagorda, M. C. Carreño. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 3397.

Como se ha indicado con anterioridad, el estudio de las propiedades fotofísicas de estos compuestos permitió establecer por primera vez la influencia que el grupo sulfínico enantiopuro ejercía sobre el proceso de fotoisomerización E/Z en los azobencenos, poniendo de manifiesto que el sulfóxido es capaz de transferir su quiralidad central al grupo azo e induciendo en los isómeros *cis* una quiralidad helicoidal controlada [6].

Mediante un detallado estudio de los parámetros de RMN de los derivados 2- y 3-*p*-tolilsulfínico sustituidos **13g** y **14f**, se pudo establecer que el grupo *p*-tolilsulfínico adopta una disposición preferente 1,3-paralela del oxígeno sulfínico con respecto al H-2 o H-3 vecinal (compuestos **13g** y **14f** respectivamente), que juega un papel dominante en la estabilidad final de las geometrías observadas para los isómeros *trans* y *cis*. La fotoisomerización *trans* → *cis* de estos derivados se produce irradiando a 365 nm.



Esquema 2. 1. 3. 5

En la familia de azocompuestos 3,6-dimetoxi-2-*p*-tolilsulfínico sustituidos **15**, a diferencia de las anteriores, la fotoisomerización hacia el isómero *cis* tenía lugar por irradiación con luz verde ($\lambda = 546$ nm), lo que representaba una ventaja para futuras aplicaciones en el terreno biológico. En el proceso de fotoisomerización de estos compuestos, se identificaron tres especies, dos atropoconformeros *trans* y un isómero (*M*)-*cis*. La composición relativa de estos tres isómeros pudo modularse con la temperatura o con la luz, por lo que se trataba de un nuevo interruptor molecular enantiopuro constituido por tres estados, en lugar de dos (Figura 2. 1. 3. 1).

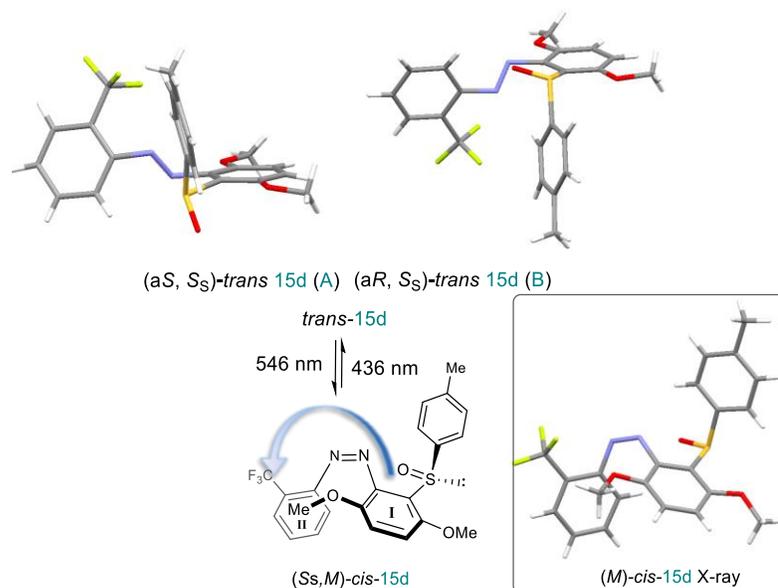


Figura 2. 1. 3. 1

En todos los casos se pudo comprobar la reversibilidad de los procesos de fotoisomerización, y la integridad configuracional del sulfóxido en todas las series de azocompuestos, demostrando que los sulfinil azobencenos sintetizados se pueden comportar como interruptores moleculares enantiopuros. En todas las series estudiadas, el grupo *p*-tolilsulfinilo parece ser determinante a la hora de definir una configuración helicoidal del isómero *cis*. Así, los espectros de dicroísmo circular (DC) indican que en todas las familias de sulfinil azobencenos el movimiento molecular se produce de forma estereocontrolada hacia una de las hélices *cis*. Estos sulfinil azobencenos constituyen el primer ejemplo de inducción helicoidal a partir de azobencenos con quiralidad central en sistemas acíclicos (Figura 2. 1. 3. 2).

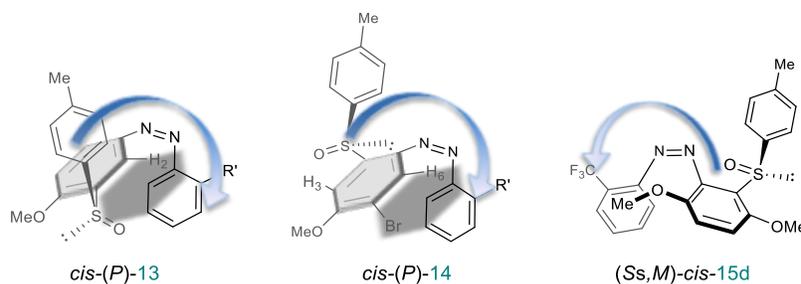
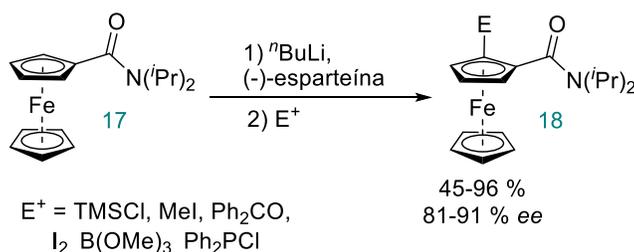


Figura 2. 1. 3. 2

2. 1. 4. FERROCENOS HOMOQUIRALES.

Los ferrocenos quirales enantiopuros son estructuras de gran importancia en la química orgánica actual debido a su amplio uso como ligandos o catalizadores en síntesis asimétrica.^[86] La gran mayoría de estrategias que permiten el acceso a ferrocenos quirales enantiopuros están basadas en *orto*-metalaciones diastereoselectivas dirigidas por grupos quirales, resoluciones cinéticas o desimetrizaciones.^[87]

La metalación, en particular la litiación, es indudablemente una de las metodologías más aplicadas para funcionalizar ferrocenos. Uno de los métodos utilizados para obtener ferrocenos homoquirales corresponde a la metalación enantioselectiva, en presencia de bases enantioméricamente puras. Aunque se había estudiado con anterioridad, no fue hasta el año 1996 cuando Snieckus y col.^[88] lograron una *orto*-litiación enantioselectiva con excelentes excesos enantioméricos. Para ello se llevó a cabo la desprotonación de la ferrocenilcarboxiamida **17** con una combinación de *n*-BuLi y (-)-esparteína, tras la cual, se adicionó un electrófilo, dando lugar a ferrocenos disustituídos **18** portadores de quiralidad planar, con buenos excesos enantioméricos (Esquema 2. 1. 4. 1).



Esquema 2. 1. 4. 1

Entre los métodos de litiación, las metalaciones diastereoselectivas promovidas por un grupo *orto*-director quiral son las más usadas para generar ferrocenos quirales. Asimismo, si el grupo *orto*-director tiene una configuración absoluta determinada se obtiene un ferroceno enantiopuro. Grupos directores muy empleados en la química del ferroceno han

^[86] a) A. Togni, en: *Metallocenes-Synthesis, Applications, Vol. 2*; (Eds.: A. Togni, R. L. Halterman), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, 685.; b) C.J. Richardas, A. J. Locke, *Tetrahedron. Asymmetry* **1998**, *9*, 2377.; c) O. B. Sutcliffe, M. R. Bryce, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2297.; d) R. Gómez Arrayás, J. Adrio, J. C. Carretero, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7674.; e) J. C. Hierso, R. Smailly, R. Amardeil, P. Meunier, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1754.; f) Y. Miyake, Y. Nishibayashi, S. Uemura, *Synlett* **2008**, 1747.

^[87] D. Schaarschmidt, H. Lang, *Organometallics* **2013**, *32*, 5668.

^[88] M. Tsukazaki, M. Tinkl, A. Roglans, B. J. Chapell, N. J. Taylor, V. J. Snieckus, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 685.

sido la amina de Ugi,^[89] los acetales^[90] y los amínales quirales derivados de aldehídos,^[91] oxazolinás,^[92] hidrazonas^[93] y óxidos de fosfina quirales (Figura 2. 1. 4. 1).^[94]

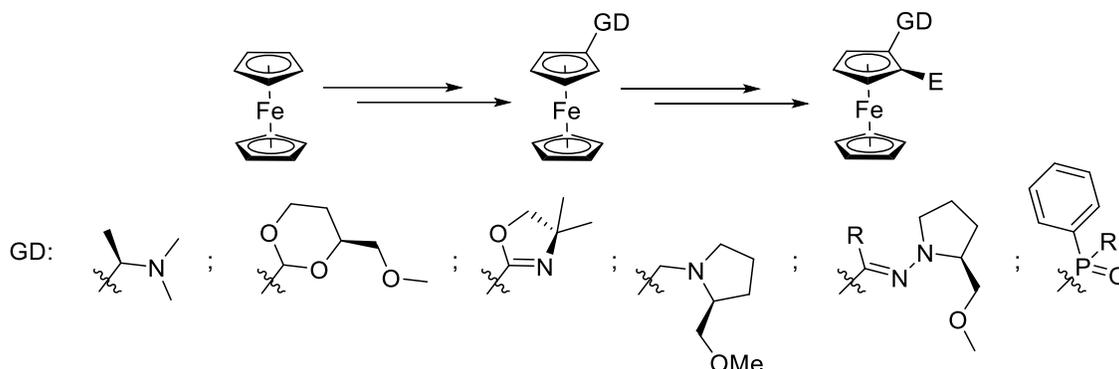


Figura 2. 1. 4. 1

Dentro de los grupos *orto*-directores quirales, los suflóxidos fueron los primeros grupos no carbonados empleados en la química del ferroceno. Estos suflóxidos han sido ampliamente utilizados con el objetivo de generar ferrocenos con quiralidad planar, obteniéndose excelentes diastereoselectividades (superiores al 96 %).

El grupo de Carretero y col. describió en 2003^[95] un ligando derivado de ferroceno con quiralidad planar que contenía un grupo sulfenilo y ha sido utilizado con éxito en catálisis asimétrica. Su síntesis de forma enantiopura se logró por *orto*-litiación dirigida del (*S_P*, *R_S*)-ferrocenil-*tert*-butilsulfóxido 19, gracias al efecto *orto*-director del grupo sulfenilo. Así, la desprotonación diastereoselectiva del (*R_S*)-ferrocenil-*tert*-butilsulfóxido empleando *t*-BuLi como base y subsiguiente tratamiento del intermedio organilítico generado con diferentes clorofosfinas condujo a la formación de ferrocenil sulfenil fosfinas 20, que fueron posteriormente reducidas a ferrocenil sulfenil fosfinas 21 por simple tratamiento con HSiCl₃.

[89] a) D. Marquarding, H. Klusacek, G. Gokel, P. Hoffmann, I. Ugi. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5389.; b) D. Marquarding, H. Klusacek, G. Gokel, P. Hoffmann, I. Ugi. *Angew. Chem.* **1970**, *82*, 360.

[90] a) O. Riant, O. Samuel, H.B. Kagan, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5385. b) F. M. Geisler, G. Helmchen, *Synlett* **2006**, 2201.

[91] a) G. Iftime, C. Moreau-Bossuet, E. Manoury, G. G. A. Balavoine, *Chem. Commun.* **1996**, 527.; b) G. Iftime, C. Moreau-Bossuet, E. Manoury, G. G. A. Balavoine *Organometallics* **1996**, *15*, 4808.; c) J. Chiffre, Y. Coppel, G. G. A. Balavoine, J. C. Daran, J. C. Daran, E. Manoury. *Organometallics* **2002**, *21*, 4552.

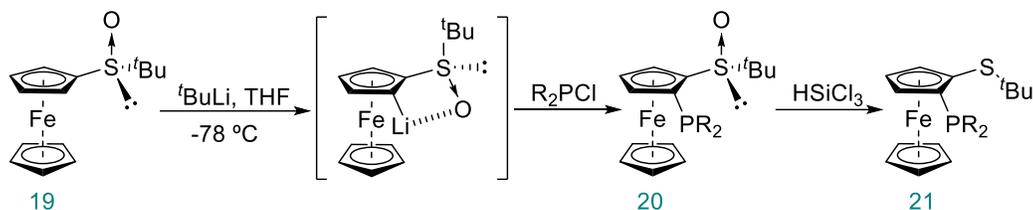
[92] G. Schmitt, P. Klein, W. Ebertz, *J. Organomet. Chem.* **1982**, *234*, 63.

[93] a) D. Enders, R. Peters, R. Lochtman, J. Runsink, *Synlett* **1997**, 1462.; b) D. Enders, R. Peters, R. Lochtman, J. Runsink, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2839.

[94] a) U. Nettekoven, M. Widhalm, P. C. J. Hamer, P. W. N. M. van Leeuwen, K. Mereiter, M. Lutz, A. L. Spek, *Organometallics* **2000**, *19*, 2299.; b) U. Nettekoven, M. Widhalm, P. C. J. Hamer, P. W. N. M. van Leeuwen, K. Mereiter, M. Lutz, A. L. Spek, *J. Org. Chem.* **2000**, *66*, 759.

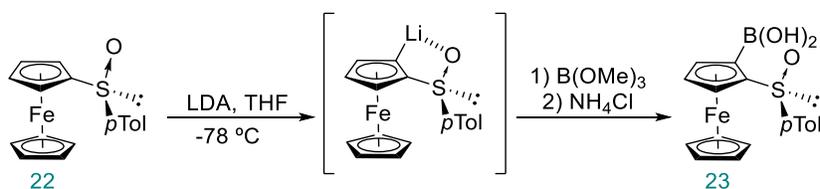
[95] a) O. García, J. Priego, S. Cabrera, R. Gómez Arrayás, T. Llamas, J. C. Carretero. *Chem. Commun.* **2002**, 2512.; b) O. García, J. Priego, S. Cabrera, R. Gómez Arrayás, T. Llamas, J. C. Carretero. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3679.; c) S. Cabrera.; R. Gómez Arrayás.; J. C. Carretero. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 3944.

Este tipo de derivados de ferroceno, que se denominaron Fesulphos, constituye una familia de ligandos bidentados con coordinación P-S, que ha sido empleada con éxito como ligandos quirales de catalizadores en varios tipos de reacciones ^[96] (Esquema 2. 1. 4. 2).



Esquema 2. 1. 4. 2

Poco después, el grupo de Johannsen llevó a cabo la formación del intermedio litiado representado en el siguiente esquema de manera totalmente diastereoselectiva, a partir de (*S_S*)-ferrocenil-*p*-tolilsulfóxido (*S_S*)-22 y LDA. El posterior tratamiento del intermedio organilítico generado con trimetilborato condujo al intercambio Li-B dando lugar al correspondiente ácido borónico (*S_P*, *S_S*)-23, que posteriormente se utilizó para la introducción de sustituyentes aromáticos mediante reacciones de acoplamiento cruzado de tipo Suzuki (Esquema 2. 1. 4. 3).^[97]



Esquema 2. 1. 4. 3

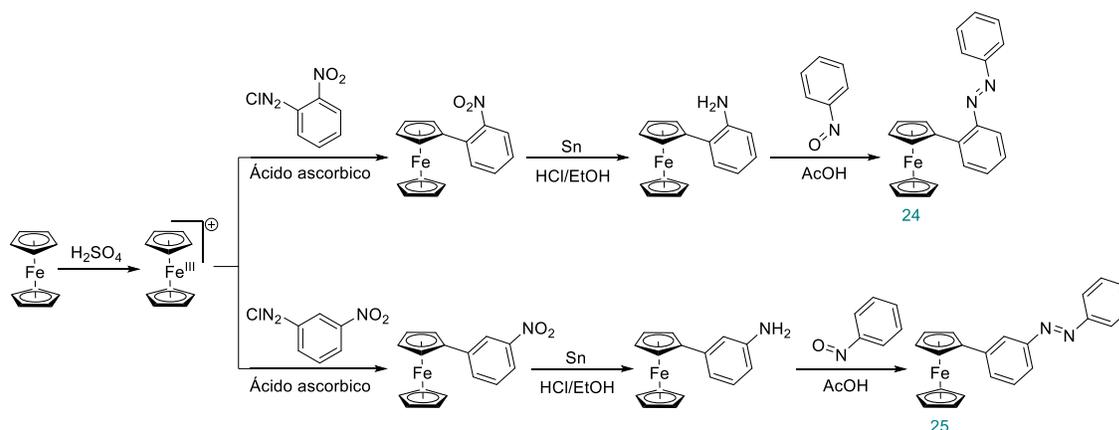
La principal diferencia entre ambos derivados son las bases que pueden ser empleadas para llevar a cabo la litiación *orto*-dirigida. Mientras que el ferroceno sustituido con el grupo *t*-butilsulfinilo puede ser desprotonado selectivamente con *n*-BuLi o *t*-BuLi, el compuesto con el resto *p*-tolilsulfinilo requiere del uso de LDA o una base estéricamente impedida y no nucleófila, ya que la utilización de *n*-BuLi da lugar a mezclas de productos y el empleo de *t*-BuLi produce el ataque nucleófilo sobre el átomo de azufre.

^[96] a) S. Cabrera, R. Gómez Arrayás, J. C. Carretero. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 16394.; b) O. García, J. Priego. S. Cabrera, R. Gómez Arrayás, I. Alonso, J. C. Carretero. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17938.; c) J. Hernández-Toribio, R. Gómez Arrayás, J. C. Carretero. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 16150.;

^[97] a) J. F. Jensen, I. Sætøfte, H. O. Sørensen, M. Johannsen, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 1258-1265 b) J. Gerner Seitzberg, C. Dissing, I. Sætøfte, P. Norrby, M. Johannsen. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 8332.

2. 1. 5. SÍNTESIS DE FERROCENILAZOBENCENOS: ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

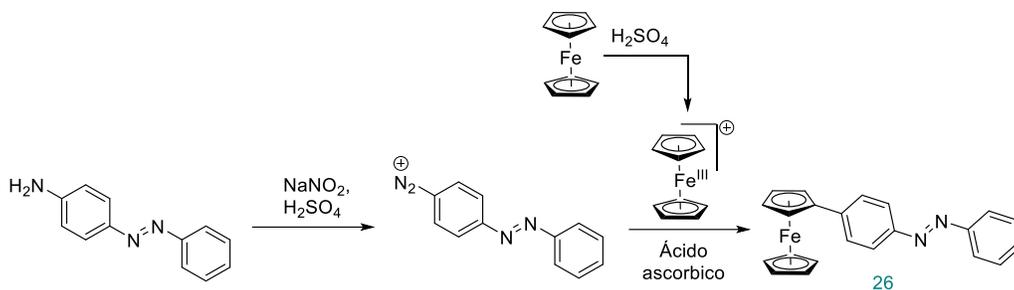
En la bibliografía se encuentra descrita la síntesis de ferrocenilazobencenos y el estudio de sus propiedades fotocromáticas ^[98]. Los 2- y 3-ferrocenilazobencenos (**24** y **25**), se preparan mediante una reacción de Mills entre los nitrosobenceno derivados y las correspondientes 3-ferrocenilanilinas, las cuales se obtienen mediante arilación radicalica del ion Ferrocinio con sales de diazonio, obteniéndose así, los correspondientes ferrocenilazobencenos con rendimientos moderados (21-19 %) (**Esquema 2. 1. 5. 1**).



Esquema 2. 1. 5. 1

Por otra parte, los 4-ferrocenilazobencenos (**26**) se han preparado mediante reacciones de arilación radicalica del ion Ferrocinio con sales de diazonio derivadas de 4-aminoazobencenos (**Esquema 2. 1. 5. 2**).

^[98] A. Sakamoto, A. Hirooka, K. Namiki, M. Kurihara, M. Murata, M. Sugimoto, H. Nishihara. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7547.



Esquema 2. 1. 5. 2

Todos estos derivados de ferrocenilazobencenos presentaban en sus espectros de absorbancia UV/Visible una banda en la región de $[\lambda = 400-600 \text{ nm}]$ correspondiente a una transferencia de carga desde el ferroceno al azobenceno (MCLT del inglés *Metal Ligand Charge Transfer*). En el caso de los 3-ferrocenilazobencenos esta banda era menos intensa debido a que, a diferencia de los 2- y 4-ferrocenilazobencenos, en los que el resto de ferroceno y azobenceno están totalmente conjugados, estos estaban menos conjugados (Figura 2. 1. 5. 1. Espectros de absorbancia UV/Visible del 2-Ferrocenilazobenceno ($3.6 \times 10^{-5} \text{ M}$, línea punteada), 3-Ferrocenilazobenceno ($7.8 \times 10^{-5} \text{ M}$, línea rayada-punteada) y 4-Ferrocenilazobenceno ($6.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, línea rayada) en acetonitrilo.).

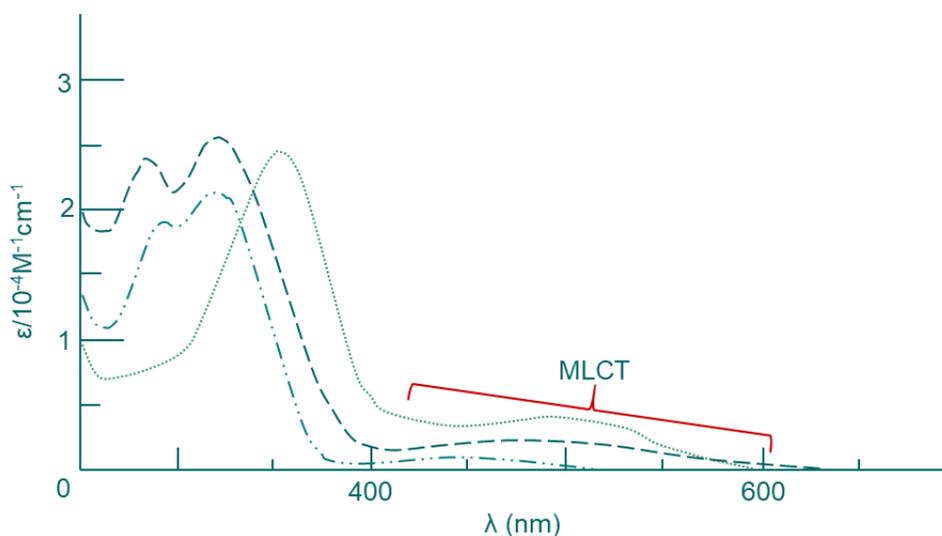
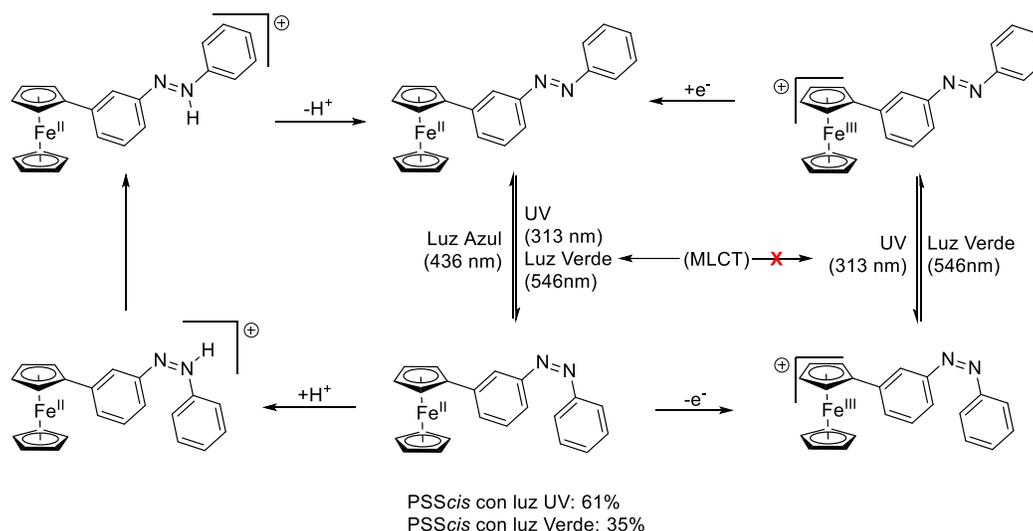


Figura 2. 1. 5. 1. Espectros de absorbancia UV/Visible del 2-Ferrocenilazobenceno ($3.6 \times 10^{-5} \text{ M}$, línea punteada), 3-Ferrocenilazobenceno ($7.8 \times 10^{-5} \text{ M}$, línea rayada-punteada) y 4-Ferrocenilazobenceno ($6.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, línea rayada) en acetonitrilo.

Los 3-ferrocenilazobencenos **25**, mostraban una fotoisomerización *trans* \rightarrow *cis* con luz UV (313 nm) y una fotoisomerización *cis* \rightarrow *trans* con luz azul (436 nm). La excitación en la banda de MLCT con luz verde (546 nm) también podía causar la fotoisomerización *trans* \rightarrow

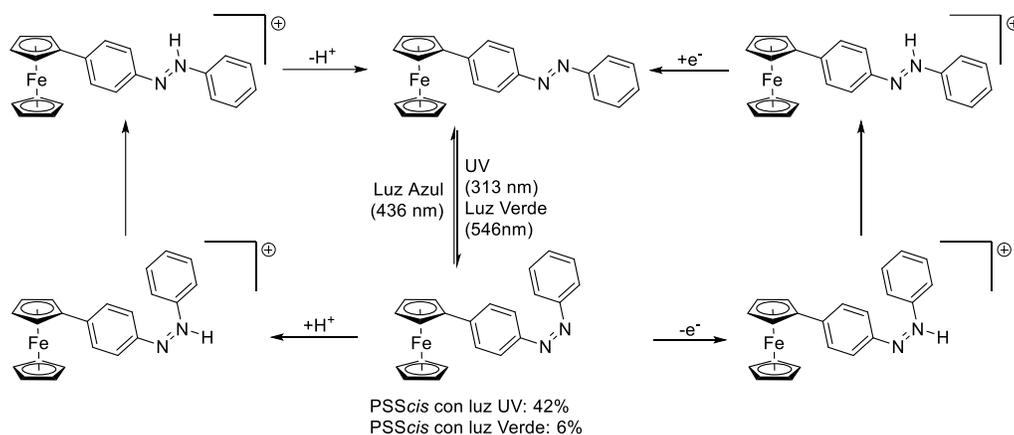
cis, la cual puede favorecerse mediante la introducción de grupos atractores de electrones en el resto de azobenceno. Esta respuesta a la luz verde puede ser alterada cambiando el estado de oxidación del ferroceno, lo que controla la existencia de la banda MLCT. La distinta respuesta a la luz verde del Fe(II) y el Fe(III) permitía realizar un ciclo de isomerización *trans* → *cis* con su correspondiente reisomerización *cis* → *trans* mediante la irradiación con luz de una única longitud de onda (Luz verde) combinada con un proceso redox. El compuesto **25** tiene una gran afinidad por los protones y la adición de pequeñas cantidades de TfOH aceleraba la isomerización *cis* → *trans*. La respuesta a una gran variedad de estímulos externos como los fotones, los protones y los procesos redox, producía una ruta de isomerización multimodal con una combinación de esas respuestas. La introducción de sustituyentes atractores de electrones en X mejoraba la eficiencia de la fotoisomerización con luz verde (Esquema 2. 1. 5. 3).



Esquema 2. 1. 5. 3

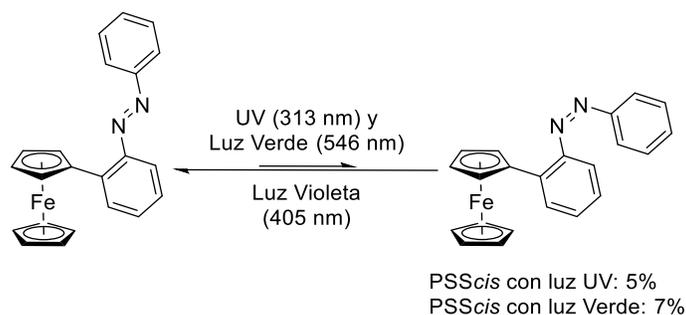
Por otra parte, los 4-ferrocenilazobencenos **26**, mostraban la fotoisomerización *trans* → *cis* al irradiar con luz UV (365 nm) y una fotoisomerización *cis* → *trans* al irradiar con luz azul (436 nm), sin embargo, la fotoisomerización *trans* → *cis* con luz verde (546 nm) se daba en un porcentaje bastante bajo (PSScis: 6%). La forma *cis* tenía una gran estabilidad térmica en el estado de oxidación de Fe(II) y esta estabilidad podía ser controlada mediante la oxidación del centro metálico, lo cual afectaba al estado electrónico del grupo azo a través de la conjugación. Con el Fe(III), la constante de velocidad de la isomerización térmica *cis* → *trans* era mucho mayor que en el caso del Fe(II). El resto azo de estos derivados también tenía una gran afinidad por los protones debido al gran carácter donador de electrones del grupo ferrocenilo por lo que, al igual que con los *meta*-ferrocenilazobencenos, se desarrolló

una ruta de isomerización multimodal *trans* → *cis* y *cis* → *trans* combinando las respuestas a la gran variedad de estímulos externos como los fotones, los protones y los procesos redox (Esquema 2. 1. 5. 4).



Esquema 2. 1. 5. 4

Por último, se había estudiado el proceso de isomerización de los 2-ferrocenilazobencenos **24**, que sufrían una fotoisomerización *trans* → *cis* mediante la irradiación con luz UV (313 nm) y luz verde (546 nm) pero el porcentaje de isómero *cis* obtenido era extremadamente bajo (PSScis_{LuzUV}: 5%; PSScis_{LuzVerde}: 7%) (Esquema 2. 1. 5. 5).



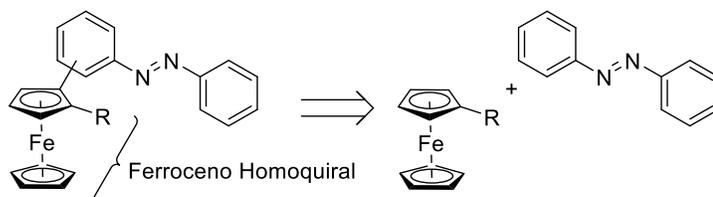
Esquema 2. 1. 5. 5

Una característica no investigada de los ferrocenilderivados, en el campo de los dispositivos moleculares basados en azobencenos, es el efecto de la quiralidad propia de los derivados de ferroceno 1,2- disustituidos, en las propiedades fotocromáticas. Una ventaja importante de esta quiralidad es su gran estabilidad configuracional, la cual, ha sido explotada en diferentes campos, principalmente, en la catálisis asimétrica.

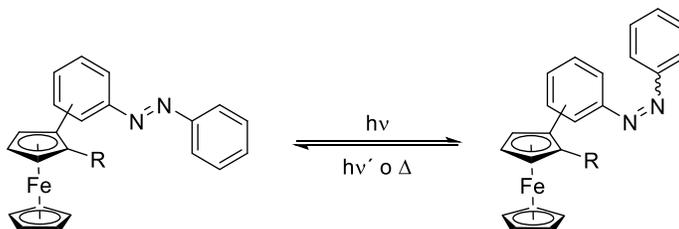
2. 2. OBJETIVOS.

Con todos estos antecedentes se propusimos como objetivos en este capítulo de la tesis doctoral:

1. El desarrollarlo de una nueva metodología de síntesis de fotointerruptores quirales de tipo azobenceno anclados a ferroceno homoquirales.



2. Estudio de sus propiedades fotocromáticas y su comportamiento como fotointerruptores moleculares.

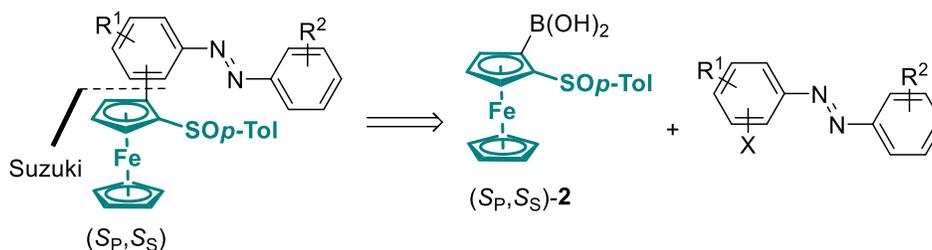


2.3. RESULTADOS.

2.3.1. RETROSÍNTESIS

Teniendo en cuenta la estructura de los ferrocenil azobencenos propuestos para esta tesis doctoral, que contienen el resto de ferroceno con quiralidad planar, la metodología de síntesis a aplicar ha de tener en cuenta los métodos de síntesis asimétrica que permiten la introducción de este fragmento homoquiral.

En este sentido el ácido *p*-tolilsulfinilferrocenil borónico **23**, accesible en las dos posibles configuraciones absolutas (R_P , R_S) y (S_P , S_S)^[97] resultaba el sustrato de partida ideal para lograr la introducción del ferroceno homoquiral en los azocompuestos. El acoplamiento de Suzuki del ácido ferrocenil borónico había sido utilizado con éxito para la síntesis de compuestos aromáticos que contienen fragmentos de ferroceno, con retención de la configuración del plano quiral.^[97] Se decidió usar este compuesto como sustrato de partida para introducir el resto homoquiral en diferentes azobencenos que contuvieran un halógeno en su estructura. Además, como ya se ha mencionado con anterioridad, el sulfóxido era un excelente inductor de quiralidad helicoidal en proceso de fotoisomerización de los azobencenos (Esquema 2.3.1.1).

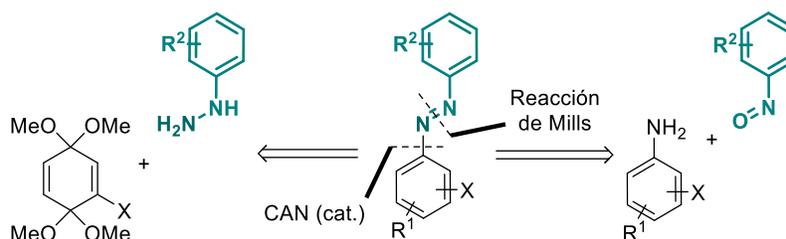


Esquema 2.3.1.1

En cuanto a la síntesis de los azobencenos con un sustituyente halogenado necesarios, el esquema retrosintético que se considere ha de tener en cuenta tanto la posición del halógeno respecto al grupo azo como la naturaleza de los sustituyentes del segundo resto aromático del azocompuesto. También resultaba fundamental, a la hora de planificar la síntesis, considerar la accesibilidad de obtención de los sustratos de partida necesarios en cada caso.

De acuerdo con los antecedentes bibliográficos anteriormente comentados, la síntesis de azobencenos con sustituyentes halogenados en las posiciones donde finalmente se situará

el sulfinilferroceno, constituía el primer objetivo. Las alternativas retrosintéticas más directas de los azocompuestos con sustituyentes halogenados se indican en el [Esquema 2. 3. 1. 2](#). Así los mencionados haloazobencenos serían sintetizados a través de la reacción de Mills, entre anilinas y nitrosoderivados aromáticos, y la reacción entre bisacetales de quinona y arilhidracinas. Estas dos metodologías habían demostrado ser procedimientos que permitían el acceso a una gran variedad de azobencenos asimétricos con muy buenos rendimientos y escala de gramos a partir de productos de partida, casi siempre, comercialmente disponibles o fácilmente accesibles, de manera rápida ([Esquema 2. 3. 1. 2](#)).

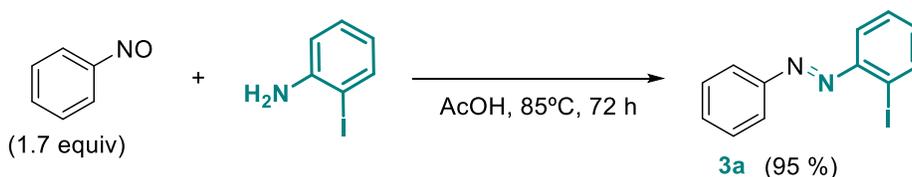


Esquema 2. 3. 1. 2

2. 3. 2. SÍNTESIS DE AZOBENCENOS HALOGENADOS

De acuerdo con la retrosíntesis planteada, se procedió en primer lugar a sintetizar los azocompuestos con un sustituyente halogenado. La reacción de Mills se aplicó, en primer lugar, para la obtención de [27a](#) y [27b](#).

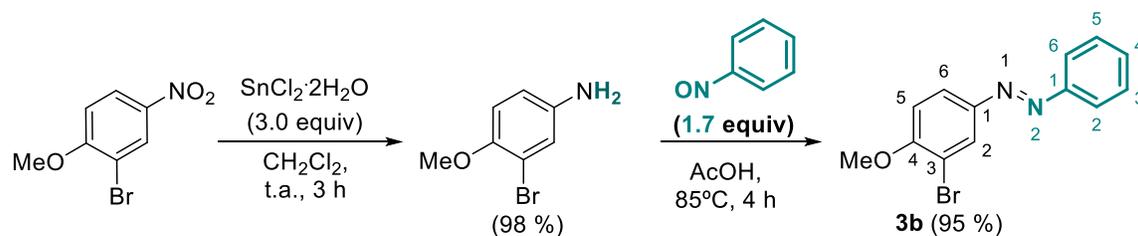
Así, la reacción ^[99] entre la *orto*-iodoanilina y [28](#) y el nitrosobenceno [29](#); ambos productos comerciales, se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito, disolviendo ambos compuestos en AcOH y posterior agitación bajo calefacción a 85 °C. Después de 24 h se pudo aislar el (*E*)-1-(2-yodofenil)-2-fenildiazeno [27a](#) con un rendimiento excelente (95 %) tras purificación en columna cromatográfica ([Esquema 2. 3. 2. 1](#); **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).



Esquema 2. 3. 2. 1

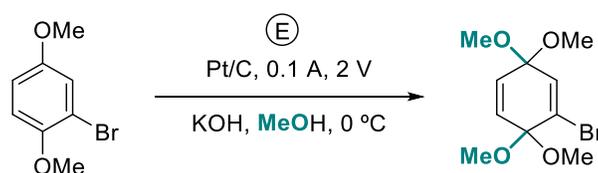
^[99] Mills reaction

La 3-bromo-4-metoxianilina **30**, necesaria para sintetizar el (*E*)-1-(3-bromo-4-metoxifenil)-2-fenildiazeno **31**, no era comercial. La síntesis de esta anilina se logró a partir del 2-bromo-1-metoxi-4-nitrobenzoceno comercialmente accesible, siguiendo la metodología descrita en la bibliografía ^[100]. Así, la reducción del nitrocompuesto **31** con dicloruro de estaño dihidratado, en CH₂Cl₂ permitió aislar, después de 3 h de agitación a temperatura ambiente, la anilina **30** con un 98 % de rendimiento. Posteriormente, se hizo reaccionar la anilina **30**, así obtenida, con el nitrosobenceno en disolución de ácido acético calentando a 85 °C, obteniéndose así el (*E*)-1-(3-bromo-4-metoxifenil)-2-fenildiazeno **27b** con un rendimiento del 95 % tras purificación por columna cromatográfica. (Esquema 2. 3. 2. 2).



Esquema 2. 3. 2. 2

De acuerdo con el análisis retrosintético de los azobencenos **27c-h**, se requería llevar a cabo previamente, la síntesis del bisacetal metílico de la 2-bromo-1,4-benzoquinona **8f**, siguiendo la metodología descrita.^[101] El derivado 1-bromo-3,3,6,6-tetrametoxiciclohexa-1,4-dieno **8f** se obtuvo con un 91 % de rendimiento, mediante una oxidación anódica del 1-bromo-2,5-dimetoxibenceno **32** en metanol, utilizando una única celda electroquímica, con un ánodo de Platino y un cátodo de grafito, haciendo pasar una corriente de 0.1 A, 2 V, a 0 °C, en presencia de KOH como electrolito (Esquema 2. 3. 2. 3).



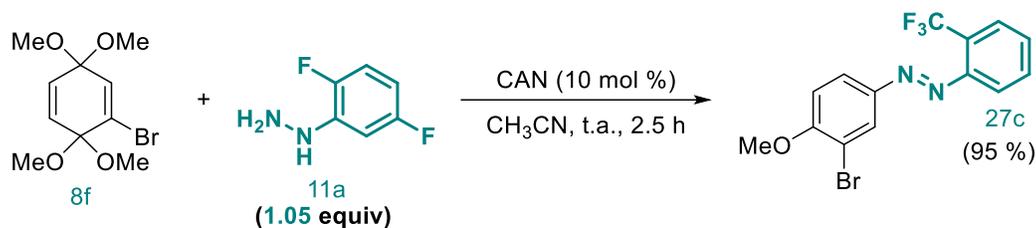
Esquema 2. 3. 2. 3

A continuación se hizo reaccionar el bisacetal **8f** con la *orto*-trifluorometilfenilhidracina **11a**, usando MeCN como disolvente y en presencia de 10 mol% de nitrato amónico cérico (CAN = [(NH₄)₂Ce(NO₃)₆]) a temperatura ambiente^[83,84]. Al cabo de 2,5 h de reacción, se

^[100] Hadida Ruah, Sara y col. PCT Int. Appl., 2009006315, 08 (2009).

^[101] D. R. Henton, R. L. McCreery, J. S. Swenton, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 371.

pudo aislar el (*E*)-1-(3-bromo-4-metoxifenil)-2-[(2-(trifluorometil)fenil)]-diazeno **27c**, tras purificación por columna cromatográfica, con un 95 % de rendimiento (Esquema 2. 3. 2. 4).



Esquema 2. 3. 2. 4

Como cabía esperar teniendo en cuenta a los antecedentes antes mencionados, la reacción se producía de manera altamente regioselectiva, dando lugar exclusivamente al regioisómero que sitúa el bromo en la posición meta del anillo aromático con respecto al grupo azo. El origen de esta regioselectividad se debe a la preferencia del ataque de la hidracina por el grupo acetal menos impedido del bisacetal de quinona, situado en el C-4, alejándose del sustituyente -Br (Figura 2. 3. 2. 1).

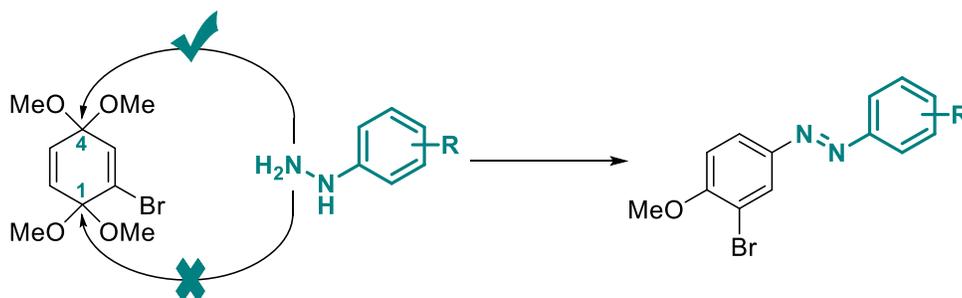
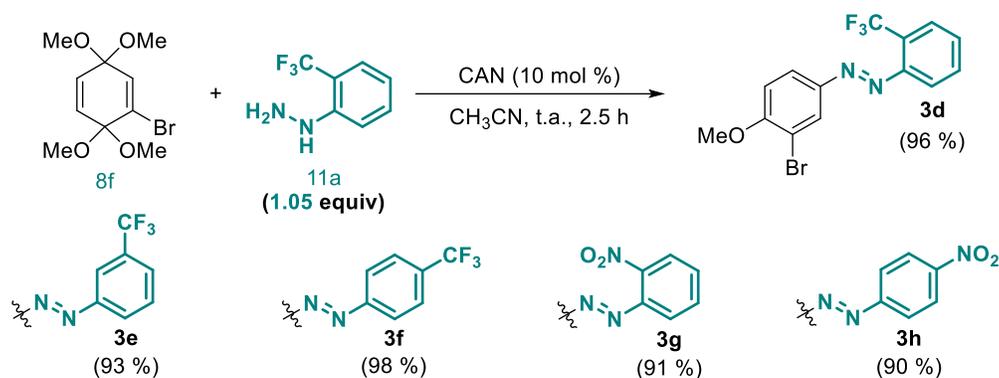


Figura 2. 3. 2. 1

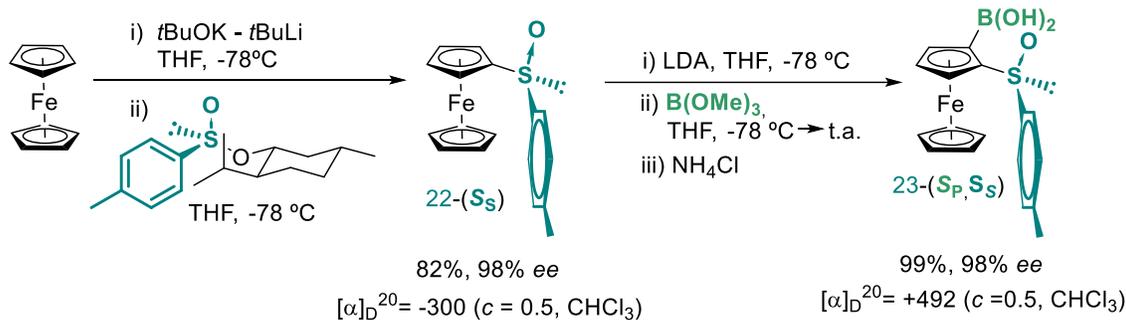
Al comprobar que esta metodología permitía obtener los 3-bromoazobencenos deseados con buenos rendimientos, se procedió a la obtención del resto de azoderivados. Así, la reacción entre el bisacetal **8f** y las *meta*- y *para*- trifluorometilfenilhidracinas (**11b** y **11c**), la 2,5-difluorefenilhidracina (**11d**) y la *orto*- y *para*-nitrofenilhidracinas (**11e** y **11f**) se llevó a cabo utilizando las mismas condiciones del caso anterior. De esta manera se obtuvieron los 3-bromoazobencenos con rendimientos buenos (Esquema 2. 3. 2. 5).



Esquema 2. 3. 2. 5

2. 3. 3. SÍNTESIS DE SULFINILFERROCENIL AZOBENCENOS.

Una vez sintetizados los azoderivados necesarios para el acoplamiento de Suzuki con el ácido (*S_s*, *S_p*)-2-*p*-tolilsulfinil ferrocenil borónico **23** enantiopuro, se procedió a llevar a cabo la síntesis de dicho ácido siguiendo la metodología ya descrita en la bibliografía ^[97] (Esquema 2. 3. 3. 1).



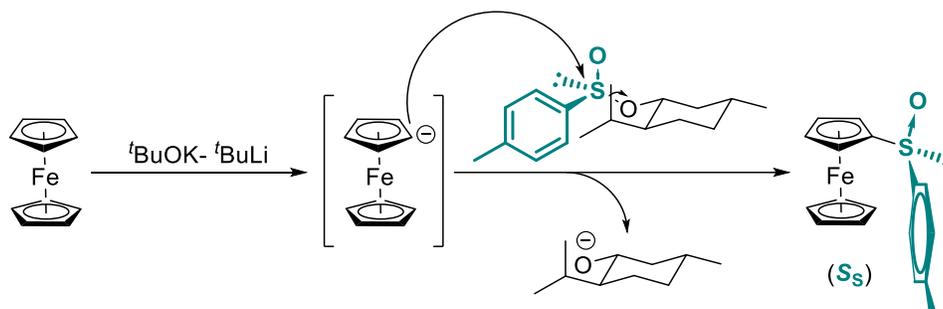
Esquema 2. 3. 3. 1

Así, la síntesis del compuesto **23** se pudo completar en dos etapas a partir del ferroceno. La primera de ellas suponía la introducción del grupo sulfinilo enantiopuro en el esqueleto de ferroceno. Para ello, se hizo reaccionar el ferroceno comercial con *t*BuLi y *t*BuOK en THF a -78 °C, para generar un anión ferrocenilo, que después de la adición del (*S_s*)-*p*-toluensulfinato de (-)-mentilo y tras una hora de reacción a -55 °C, dio lugar al *p*-tolilsulfinil ferroceno (*S_s*)-**22** con un rendimiento del 82%, tras purificación cromatográfica.^[102] Esta reacción está basada en la síntesis de Andersen,^[103] que permite acceder a sulfóxidos enantiopuros. El proceso supone la abstracción inicial de uno de los protones del ferroceno

^[102] O. Riant, G. Argouarch, D. Guillaneux, O. Samuel, H. B. Kagan, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3511

^[103] a) K. K. Andersen, *Tetrahedron Lett.* **1962**, 3, 93.; b) K.K. Andersen, W. Gaffield, N. E. Papanikolaou, J. W. Foley, R. I. Perkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 5637.

en el medio fuertemente básico originando el correspondiente anión de litio, que reacciona a través de una sustitución nucleófila bimolecular con inversión de la configuración sobre el átomo de azufre del (S_S)-*p*-toluensulfinato de (-)-mentilo, expulsando mentol como grupo saliente (Esquema 2. 3. 3. 2).



Esquema 2. 3. 3. 2

La segunda etapa en la síntesis del ácido 2-(*p*-tolilsulfinil)ferrocenil borónico supone el tratamiento del ferrocenil *p*-tolilsulfoxido con LDA a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas, seguido de la adición de un exceso de borato de metilo. Bajo estas condiciones y después de una hidrólisis ácida del éster borónico resultante, se obtuvo, con rendimiento cuantitativo, el ácido borónico sulfinil sustituido (S_P, S_S)-**23**, que ya presenta la quiralidad planar, además de la central impuesta por el sulfóxido. Esta reacción transcurre a través de una *orto*-litiación diastereoselectiva, por parte de la LDA, exclusivamente sobre una de las posiciones contiguas (α) al sulfóxido. En el ferroceno la diastereoselectividad de esta *orto*-litiación dirigida se debe a la estabilización del intermedio organolítico resultante por parte del oxígeno del grupo sulfinilo que dispone su grupo más voluminoso (*p*-tolilo) lo más alejado posible del resto de ferroceno (Figura 2. 3. 3. 1).

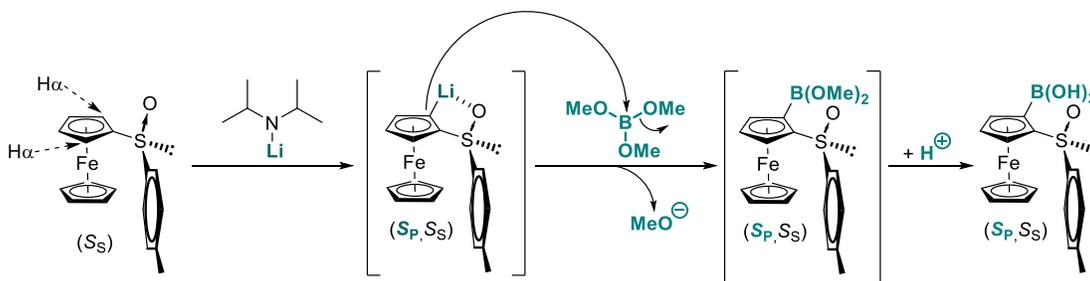
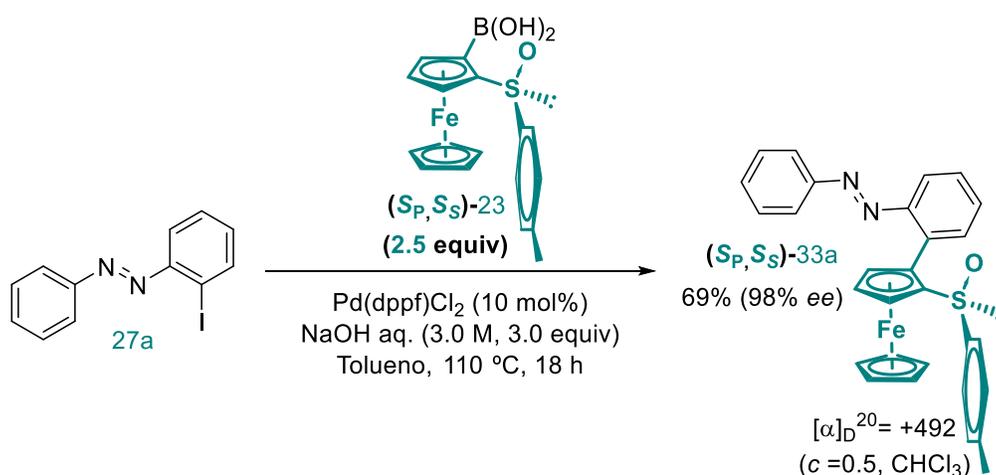


Figura 2. 3. 3. 1

La siguiente etapa de en la secuencia sintética era la reacción de acoplamiento de tipo Suzuki entre dicho ácido borónico **23** y los distintos haloazobencenos sintetizados previamente **27a-g**.

2. 3. 4. SÍNTESIS DE SULFINILFERROCENIL AZOBENCENOS.

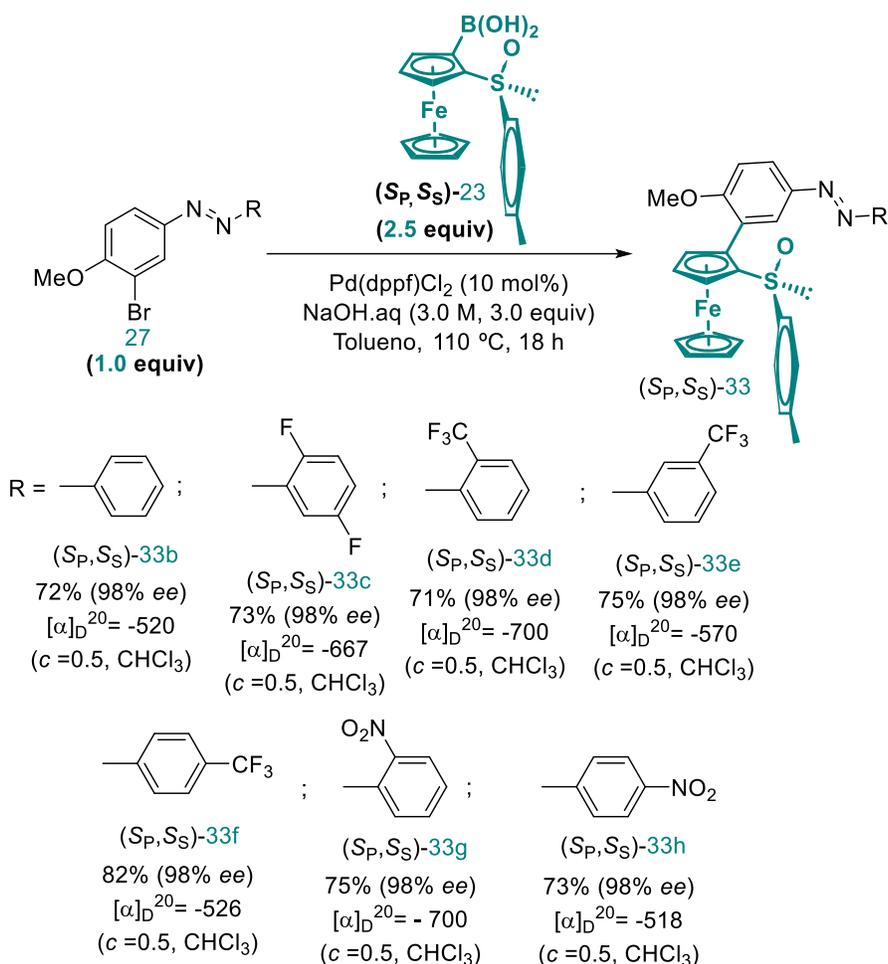
Así, el acoplamiento de tipo Suzuki entre el compuesto (*S_P*,*S_S*)-**23** y el *ortho*-yodoazobenceno **27a** se realizó usando condiciones ya descritas ^[97] para este tipo de ácido borónico: Pd(dppf)Cl₂ (10 mol%) como catalizador, NaOH aq 3.0 M (3 equiv) como base y tolueno (0.1 M) como disolvente. Tras 8 h a reflujo, el *p*-tolilsulfinil ferrocenil azobenceno **33a** fue aislado con un 69 % de rendimiento tras purificación por columna cromatográfica (Esquema 2. 3. 3. 3).



Esquema 2. 3. 3. 3

Estas mismas condiciones de reacción se aplicaron al acoplamiento de tipo Suzuki entre el ácido sulfinil ferricenil borónico **23** y el resto de bromoazobencenos previamente sintetizados empleando la misma metodología. En todos los casos la reacción de Suzuki entre el ácido borónico y los bromo derivados funcionó correctamente obteniéndose los ferrocenil azobencenos con buenos rendimientos (67-82%), los (*S_P*,*S_S*)-*p*-tolilsulfinil

ferrocenil azobencenos **33b-g** (Esquema 2. 3. 3. 4). Como en el caso anterior, todos los productos fueron purificados por cromatografía en columna y la pureza enantiomérica se determinó mediante HPLC, usando una columna Chiral Pack IB con un flujo de eluyente 0.7 usando una mezcla de Hexano/isopropanol 80/20.



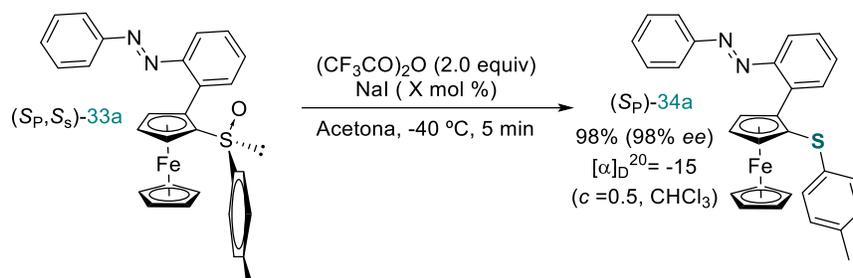
Esquema 2. 3. 3. 4

Sorprendentemente, se observó en todas las reacciones de acoplamiento cruzado entre el ácido ferrocenil borónico **23** y los haloazobencenos **27a-g**, la formación de un producto minoritario cuyo peso molecular era igual al del sulfenilferrocenil azobenceno correspondiente y su patrón de señales en RMN^{-1}H , también, era similar, pero con diferencias en los desplazamientos químicos.

2. 3. 4. SÍNTESIS DE SULFENILFERROCENIL AZOBENCENOS.

A continuación, se procedió a sintetizar los ferrocenil azocompuestos con un sustituyente de tipo tioéter en lugar de sulfóxido en su estructura. El acceso más rápido a los

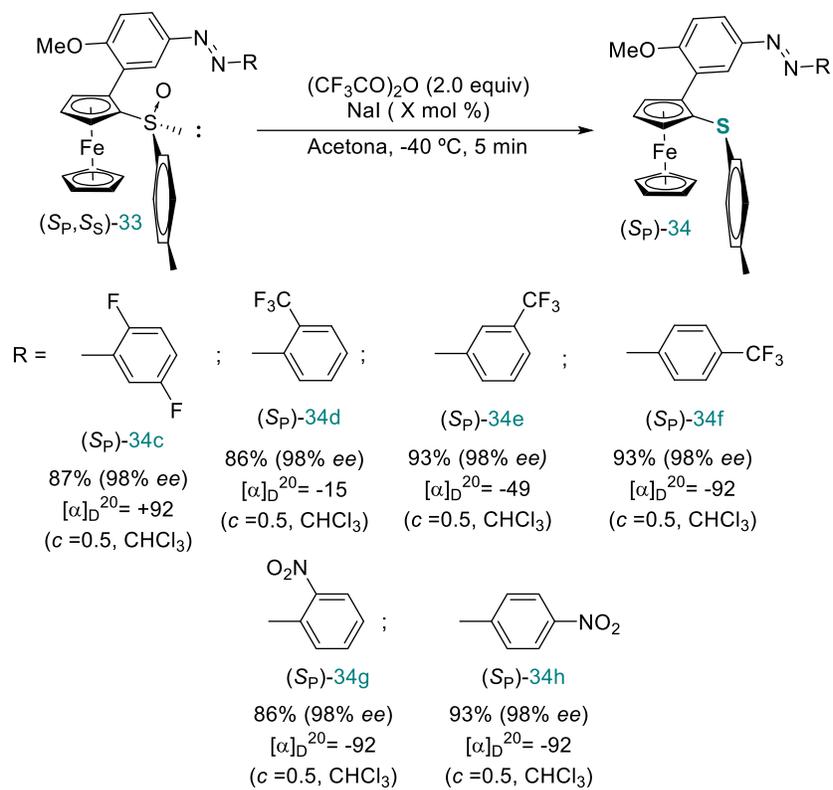
tioéteres enantiopuros se basaba en la reducción de los correspondientes sulfóxidos previamente obtenidos mediante un procedimiento descrito en la bibliografía.^[104] El tratamiento de los sulfóxidos con ioduro sódico y anhídrido trifluoroacético, utilizando acetona como disolvente y a una temperatura de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. condujo, en tan solo 5 minutos de reacción, a los tioéteres deseados. Así, el (*E*)-1-(2-(2-(*p*-tolilsulfenil)-ferrocenil)-fenil)-2-fenildiazeno **33a** pudo ser aislado y purificado mediante cromatografía en columna con un excelente rendimiento (98 %) (**Esquema 2. 3. 4. 1**).



Esquema 2. 3. 4. 1

Estas mismas condiciones de reacción se aplicaron a la reducción del resto de sulfinilferrocenilazobencenos. En todos los casos la reacción funcionó correctamente obteniéndose los (*S_p*)-*p*-tolilsulfenil ferrocenil azobencenos con buenos rendimientos (93-98%) **33b-f** (**Esquema 2. 3. 4. 2**). Como en el caso anterior, todos los productos fueron purificados por cromatografía en columna y su pureza enantiomérica determinada por HPLC.

^[104] J. Priego, O. García-Mancheño, S. Cabrera, J. C. Carretero., *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 1346.



Esquema 2. 3. 4. 2

2. 3. 5. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL.

Como se ha mencionado anteriormente, la reacción de acoplamiento cruzado de tipo Suzuki entre los bromoazobencenos **8b-g** y el ácido 2-(*p*-tolilsufinil)ferrocenil borónico **23** daba lugar a dos productos en todos los casos en proporciones $\approx 90/10$. El análisis de los espectros de resonancia magnética de los todos los crudos de las reacciones de acoplamiento de tipo Suzuki con el ácido ferrocenil borónico X y los azobencenos Xa-h, reveló la existencia de ambos productos. Como se puede ver en los espectros de los crudos de reacción representados en la (Figura 2. 3. 5. 1) las señales más características resaltadas en rojo aparecen en la región de $\delta = 8,6 - 8,4$ y $\delta = 7,1 - 6,7$.

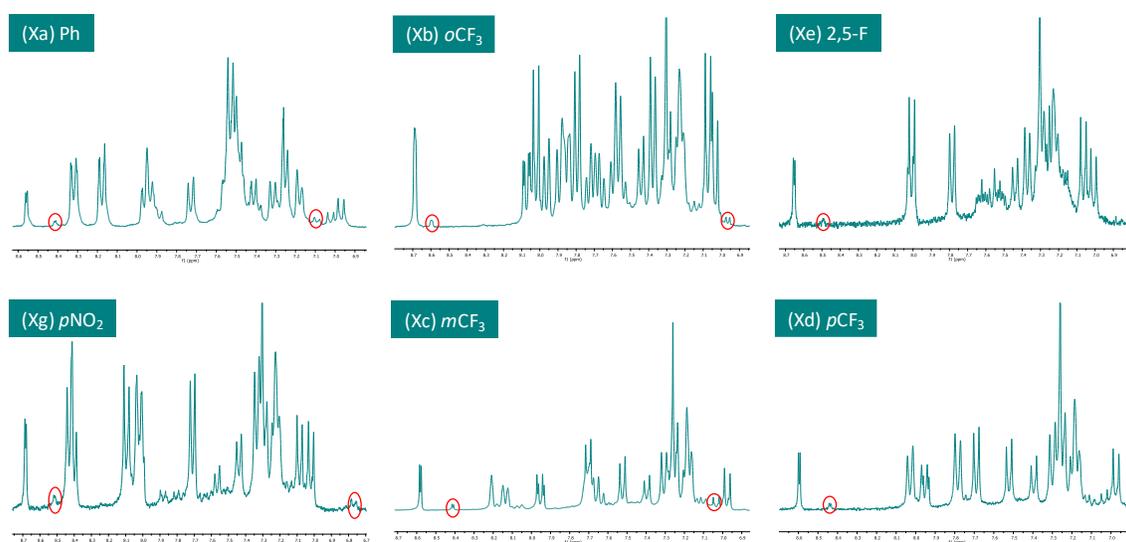


Figura 2. 3. 5. 1

-Isómero Mayoritario (May):

La estructura de los isómeros mayoritarios de estos nuevos azobencenos pudo ser determinada a partir de sus parámetros de RMN- ^1H , incluyendo experimentos de NOESY, que permitieron establecer la orientación relativa de los diferentes anillos aromáticos en el azobenceno y el ferroceno.

El espectro de RMN del compuesto **32b** puro revelaba un desapantallamiento muy elevado del protón H_C ($\delta = 8,60$ ppm). El experimento de NOESY evidenciaba un efecto NOE entre el H_C y los cinco hidrógenos del resto de ciclopentadienilo sin sustituir del ferroceno, que aparecen como un singlete ancho a 4,13 ppm (Figura 2. 3. 5. 2).

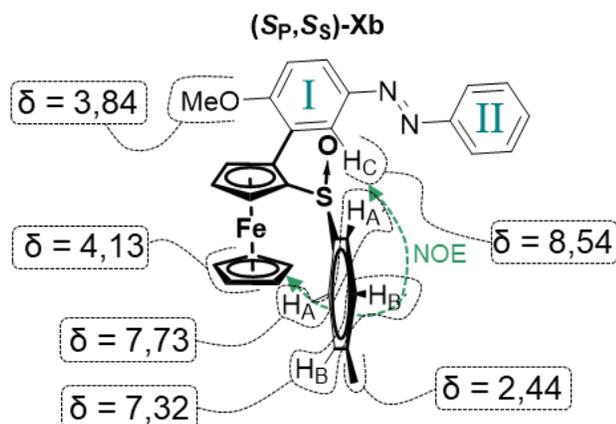
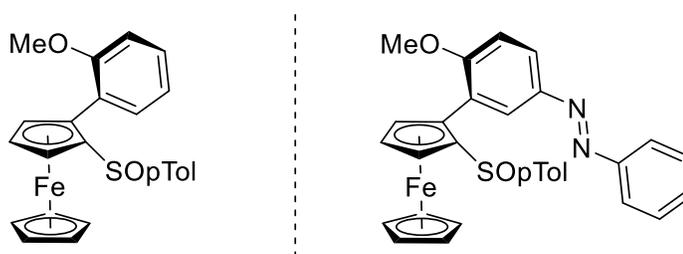


Figura 2. 3. 5. 2

Este efecto NOE sólo puede aparecer si el anillo I del azobenceno se orienta de tal manera que H_c se aproxime al anillo de ciclopentadienilo inferior del ferroceno. Esta orientación se encuentra representada en la Figura 2. 3. 5. 2 donde se puede ver que el anillo I se dispone en el plano del papel y el ferroceno en un plano casi perpendicular. Esta orientación viene forzada por la existencia del grupo *p*-tolilsulfinilo que se encuentra en el carbono contiguo del ferroceno y que obliga a situar el sustituyente *p*-tolilo, muy voluminoso, alejado del resto de los anillos aromáticos.

En la bibliografía se encontraban descritos otros derivados de 2-*p*-tolilsulfinil ferroceno con sustituyentes aromáticos monosustituídos en la posición contigua respecto al sulfóxido [97] en los cuales el resto del anillo aromático se encuentra situado por encima del plano del anillo de Cp superior, debido al impedimento estérico, causado por el sulfóxido. Estas estructuras habían sido confirmadas por difracción de rayos-X Cabe esperar que esta misma disposición fija se de en el compuesto 32b, sintetizado por nosotros, debido al grupo metoxilo del azobenceno (Esquema 2. 3. 5. 1), ya que ambos fragmentos estructurales son análogos en las dos moléculas.



Esquema 2. 3. 5. 1

Esta disposición es análoga a la observada en el azocompuesto **33b** sintetizado en este trabajo y justifica el NOE observado entre el Cp inferior y el H_c del anillo aromático **I**, representado en la **Figura 2. 3. 5. 2**.

Con todos estos datos se puede proponer que la estructura y disposición espacial del *p*-tolilsulfinil-ferrocenil azobenceno **32b** podría ser la representada en la **Figura 2. 3. 5. 3**.

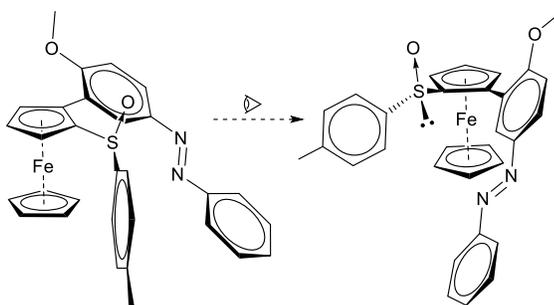


Figura 2. 3. 5. 3

Comparando los espectros de RMN-¹H de todos sulfinil ferrocenil azobencenos **33** sintetizados con el del derivado representado en la **Figura 2. 3. 5. 1**, se pudo observar que el patrón de señales se repetía constantemente con ligeras diferencias en los desplazamientos químicos, debido a la diferente sustitución en el anillo **II**. Un análisis comparativo de todos ellos permitió establecer una disposición similar del anillo **I** del azobenceno y del ferroceno en todos los casos, ya que, en todos los casos, se observaba un protón más desapantallado que aparecía a $\delta \approx 8,6$ ppm y mostraba un efecto NOE con los hidrógenos de ciclopentadienilo sin sustituir (Cp inferior), el cual aparece a $\delta \approx 4,10 - 4,26$ ppm. La orientación del grupo *p*-tolilo debía ser similar a la observada en el **33b**, ya que el desplazamiento químico de los hidrógenos del sistema AA'BB' ($\delta \approx 7,6 - 7,3$ ppm) era muy similar en todos los casos, lo que sugería la misma disposición de esta parte de la molécula, con el oxígeno del sulfóxido sobre el plano del ferroceno por tano se podía asumir que todos los compuestos **33** presentaban una orientación espacial muy similar.

Finalmente, la estructura del azoderivado *orto*-nitrofenil sustituido **33g** pudo ser inequívocamente asignada mediante el uso de técnicas de difracción de rayos-X (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). La estructura propuesta mediante a los análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear es idéntica a la obtenida a partir del monocristal.

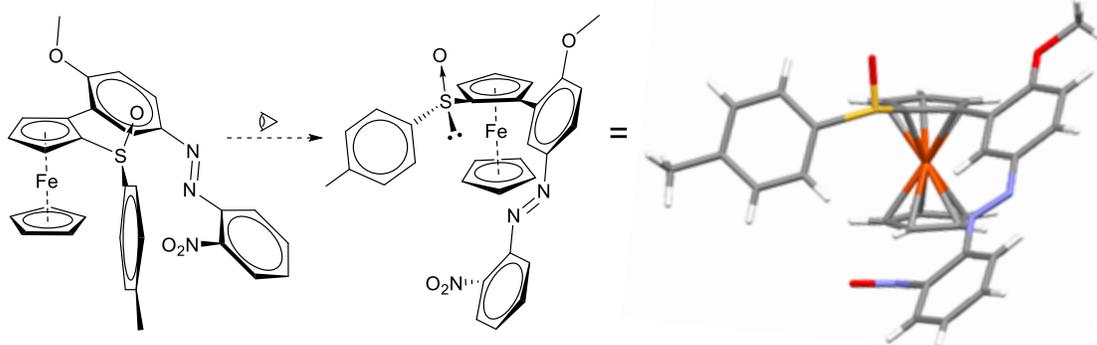
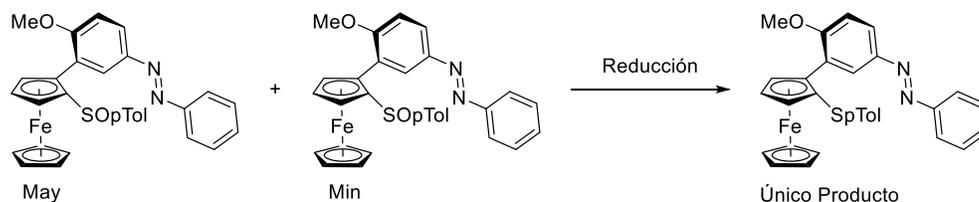


Figura 2. 3. 5. 4

Como se puede ver, la unidad de azobenceno adopta una disposición plana, lo que es general para los azobencenos de estereoquímica *E*. El sistema de ferroceno se dispone con un ángulo de torsión de $45,75^\circ$ respecto del anillo aromático **I**. A su vez el grupo *orto*-metoxilo se sitúa por encima del plano del anillo de ciclopentadienilo sustituido del ferroceno y fija una conformación en la que la rotación alrededor del enlace biarílico ferrocenilo-arilo está impedida. El conformero alrededor del enlace C-S del sulfóxido en el derivado **33g** es el que orienta el par de electrones no enlazante del azufre hacia el resto de azobenceno, minimizando así las interacciones estéricas. Por otra parte, el grupo *p*-tolilo del sulfóxido adopta una conformación *s-trans*, ligeramente alternada respecto al anillo de ciclopentadienilo del ferroceno. Además, el oxígeno del sulfóxido se dispone hacia arriba del plano del ferroceno, minimizando así todas las interacciones estéricas entre los restos aromáticos. En esta disposición, el hidrógeno H_C del anillo aromático **I** está orientado hacia el ciclopentadienilo no sustituido del ferroceno, lo que justifica la aparición del efecto NOE observado por ¹H-RMN.

Como se ha mencionado anteriormente, el análisis de los espectros de resonancia de los todos los crudos de las reacciones de acoplamiento tipo Suzuki con el ácido ferrocenil borónico **23** y los azobencenos **27a-h**, reveló que en todos los casos (**33b-h**), se producían dos productos. Desafortunadamente, pese a que la formación de este subproducto se observaba en todos los casos (la proporción relativa que nunca superaba el 15%) solo pudieron ser aislados suficientemente puros para llevar a cabo un análisis estructural, los subproductos minoritarios derivados de los compuestos **33b** (con un sustituyente fenilo) y **33c** (con un sustituyente 2,5-difluorofenilo).

El estudio estructural del producto minoritario derivado del compuesto **33b** permitió observar que presentaba el mismo patrón de señales en ^1H -RMN que el mayoritario. Este compuesto minoritario tenía la misma masa que el producto mayoritario y presentaba un espectro de UV/Vis que se correspondía con un azobenceno *trans*. Por otra parte, al someter una mezcla de ambos productos a las condiciones de reducción usadas para la formación de los tioéteres, se obtenía un único producto.



Por todo ello se puede suponer que el producto minoritario era un diastereoisómero del producto mayoritario.

-Isómero minoritario (min):

El estudio comparativo de los espectros de resonancia de los dos diastereoisómeros **33b_A** y **33b_B**, permitió asignar la estructura de este último, minoritario. Las señales más significativas para la elucidación estructural observadas en los espectros de RMN de protón para la elucidación estructural se muestran en la siguiente figura (Figura 2. 3. 5. 5).

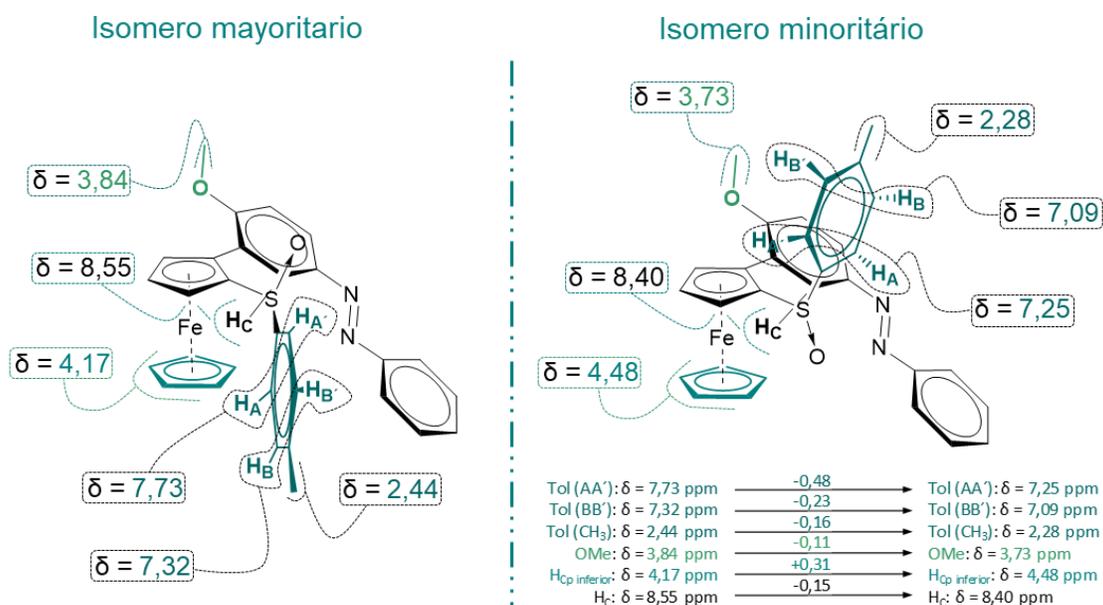


Figura 2. 3. 5. 5

Los experimentos de NOESY evidenciaban un efecto NOE entre el H_c y el ciclopentadienilo sin sustituir del ferroceno en ambos isómeros, indicando una conformación similar de la parte azobencénica de la molécula con respecto al ferroceno.

Como se puede ver, las señales correspondientes al grupo *p*-tolilo (el sistema AA'BB' y el CH₃) se ven apantalladas en el isómero minoritario **33b_B**. Los hidrógenos del sistema AA' muestran el mayor apantallamiento, siendo desplazada su señal de 7,73 ppm (en el isómero A) a 7,25 ppm (en el isómero **33b_B**). También se apantalla la parte BB' de sistema desde 7,32 a 7,09 ppm. Este dato sugería una conformación preferente para el isómero minoritario, en la cual el grupo tolilo se sitúa bajo el efecto anisotrópico del anillo aromático **I** del azobenceno. En concordancia con la disposición relativa diferente del *p*-tolilo en ambos isómeros, se observó que los cinco hidrógenos del ciclopentadienilo sin sustituir del ferroceno estaban más apantallados en el isómero **33b_A** (4,13 ppm) que el minoritario **33b_B** (4,48 ppm). Otra diferencia significativa que se pudo observar fue el apantallamiento del grupo metoxilo en el isómero **33b_B** ($\delta = 3,71$ ppm vs $\delta = 3,82$ ppm del isómero **33b_A**), lo que de nuevo corroboraba la mutua influencia anisotrópica entre el *p*-tolilo y anillo **I** del isómero minoritario.

Otro caso en el que se consiguió obtener el producto minoritario con la masa y pureza suficiente como para llevar a cabo un análisis comparativo con en el producto mayoritario, es el del compuesto 2,5-difluorofenil sustituido **33c**, cuyas diferencias más significativas se encuentran recogidas en la siguiente figura (Figura 2. 3. 5. 6).

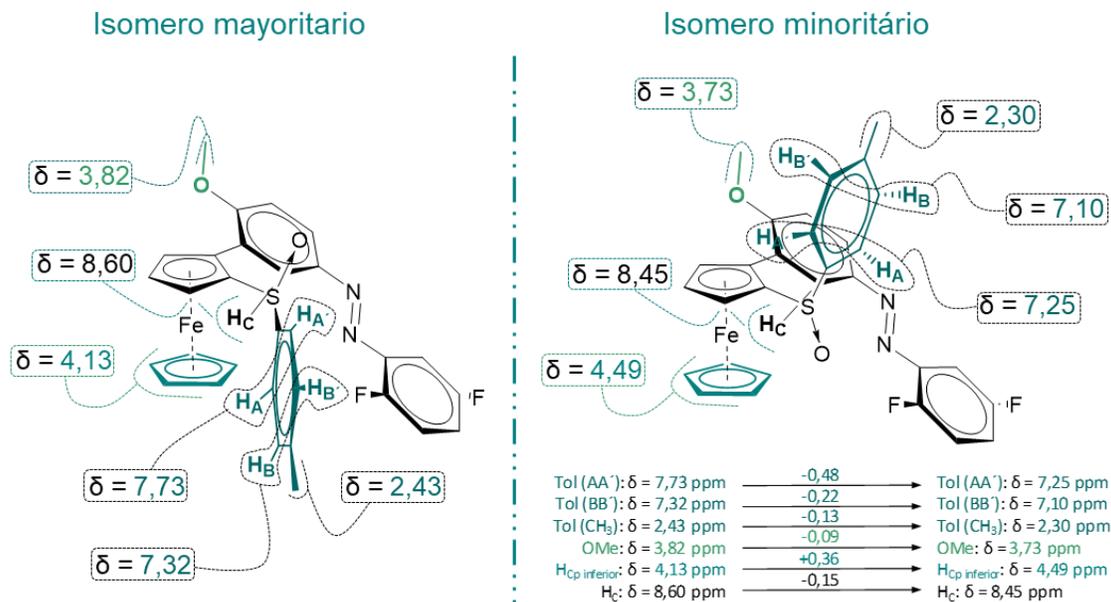


Figura 2. 3. 5. 6

Al igual que en el caso anterior de la pareja $33C_A$ y $33C_B$, las señales correspondientes al grupo *p*-tolilo (el sistema AA'BB' y el CH₃) y el grupo metoxilo se apantallan en el isómero $33C_B$ mientras que el ciclopentadienilo sin sustituir se encontraba estaba más desapantallado ($\delta = 4,49$ ppm vs $\delta = 4,13$ ppm en el isómero mayoritario).

Esta asignación estructural confirma la existencia de dos isómeros como consecuencia de la existencia de una conformación fija del sulfóxido alrededor del enlace azufre-ferroceno con el giro impedido (Figura 2. 3. 5. 7). Puesto que ambos compuestos se han podido aislar se puede afirmar que ambas estructuras presentan tres tipos de quiralidad: quiralidad central, debida al sulfóxido, quiralidad planar, debida al fragmento de ferroceno 1,2-disustituido y quiralidad axial debida a la rotación impedida entorno al enlace C-S.

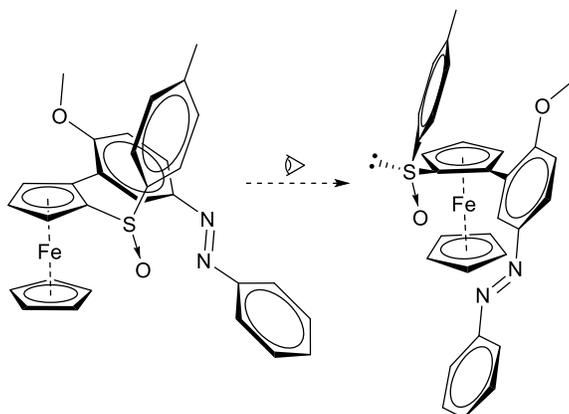


Figura 2. 3. 5. 7

Esta diferente disposición del sulfóxido en un sistema sulfinilferroceno no carecía de antecedentes. En la bibliografía se encuentra descrita la estructura de dos compuestos aril-2-*p*-tolilsulfinil ferrocenos en forma de rayos-X. [97] En el artículo anteriormente mencionado, se justificaba la rotación impedida del enlace arilo-ferroceno, pero en el artículo no se menciona ni se justificaba nada de las dos posibles conformaciones del sulfóxido pese a aparecer reflejada en la estructura obtenida por difracción de rayos-X de dos compuestos distintos (Figura 2. 3. 5. 8).

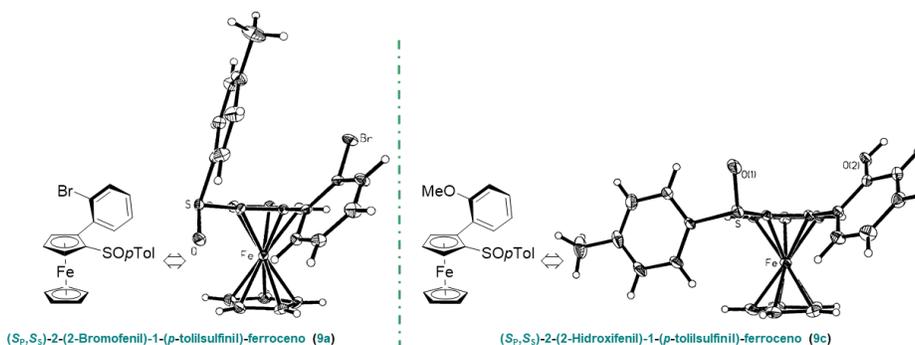


Figura 2. 3. 5. 8

2. 3. 6. PROPIEDADES FOTOCRÓMICAS:

2. 3. 6. 1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN UV/VISIBLE Y DICROISMOCIRCULAR EN AZOBENCENOS.

UV: Los espectros de absorción de UV de un azobenceno presenta dos bandas de absorción características, correspondientes a las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$. La transición $\pi \rightarrow \pi^*$ se encuentra generalmente en la región UV-cercano y es también común

a sistemas carbonados referibles como el estilbena (Figura 2. 3. 6. 1) ^[105]. La transición electrónica denominada $n \rightarrow \pi^*$ se suele situar en la región del visible, y se debe a la presencia del par de electrones sin compartir de los átomos de nitrógeno ^[106]. Esta segunda transición electrónica es también la responsable de que los azobencenos tengan un proceso dinámico de fotoisomerización diferente a los sistemas carbonados.

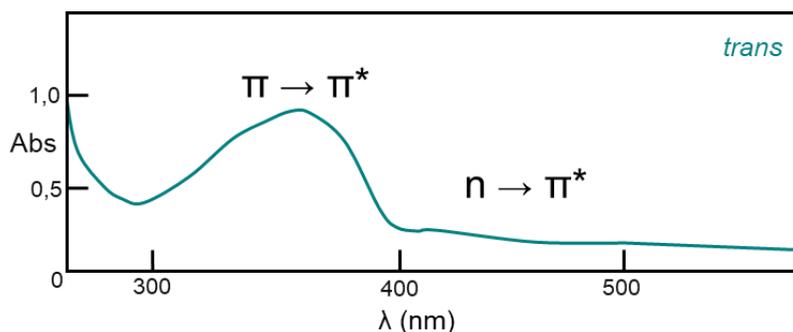


Figura 2. 3. 6. 1

Los azocromóforos aromáticos se pueden clasificar en tres tipos en función del orden energético de sus estados electrónicos $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$. Este orden depende en gran medida de la naturaleza electrónica y el grado de impedimento estérico de los sustituyentes de los anillos aromáticos del azobenceno. Cada tipo de azocromóforo además tiene un color predominante definido por la longitud de onda de la banda de absorción máxima (λ_{\max}).

- i) Tipo azobenceno Ar-N=N-Ar: Derivados en los que la naturaleza electrónica de los anillos aromáticos es muy parecida al azobenceno más sencillo (Ph-N=N-Ph). Son aquellos que presentan una banda $\pi \rightarrow \pi^*$ muy intensa en la región UV y una $n \rightarrow \pi^*$ más débil en el visible (color amarillo).
- ii) Tipo aminobenceno (*para*- u *orto*- (X)-C₆H₄-N=N-Ar: Son azocompuestos que presentan sustituyentes dadores de electrones (X) en las posiciones *orto*- y *para*- (color naranja). Las bandas $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ aparecen muy juntas o incluso colapsan en la región UV-visible cercano.
- iii) Tipo *pseudo*-estilbena [(X)-C₆H₄-N=N- C₆H₄-(Y)]: Presentan sustituyentes dadores (X) y aceptores de electrones (Y) en las posiciones 4- y 4'- respectivamente (sistema push/pull)

^[105] R. J. sension, S. T. Repinec, A. Z. Szarka, R. M. Hochstrasser, *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 6291.

^[106] T. Nägele, R. Houche, W. Zinth, J. Wachtveitl, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 272, 489.

(color rojo). La banda de absorción correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ se desplaza hacia el rojo, cambiando incluso el orden de aparición con la banda $n \rightarrow \pi^*$.

La longitud de onda (nm) a la que aparece la transición $n \rightarrow \pi^*$ es también muy sensible al impedimento estérico en torno a la agrupación azo $-N=N-$. Por ejemplo, en los azobencenos que presentan sustituyentes en posición *orto* muy voluminosos, se produce una distorsión del ángulo entre $-N=N-C-$, y la transición $n \rightarrow \pi^*$ aparece a menores energías, es decir sufre un desplazamiento batocrómico (hacia el rojo). El descenso energético observado con el aumento del ángulo $-N=N-C-$ se debe fundamentalmente a la variación de la estabilidad del orbital “n” involucrado en esta excitación, más que a variaciones del orbital π^* . El aumento del ángulo $-N=N-C-$, lleva implícita una aproximación de los pares de electrones sin compartir de cada uno de los nitrógenos del doble enlace $-N=N-$. Esta interacción desfavorable entre ambos pares sin compartir hace que aumente el contenido energético del orbital molecular (OM) “n”. Como consecuencia, la energía necesaria para excitar un electrón del OM “n” al OM antienlazante π^* disminuye, apareciendo esta transición a longitudes de onda (nm) más altas (Figura 2. 3. 6. 2).

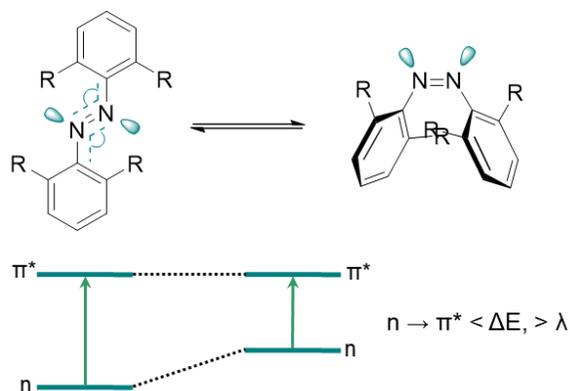


Figura 2. 3. 6. 2

El proceso de isomerización $E \rightarrow Z$ suele ir también acompañado de un cambio de color a tonalidades más intensas. Los espectros de absorción de ambos isómeros se diferencian fundamentalmente en los siguientes aspectos:^[107]

Isómero *trans*: La banda de absorción $\pi \rightarrow \pi^*$ es muy intensa, con un coeficiente de extinción molar ^[108] en torno a $2-3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, mientras que la segunda banda ($n \rightarrow \pi^*$) aparece mucho

^[107] N. Tamai, H. Miyasaka, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1875.

^[108] Capacidad que tiene una sustancia de absorber la radiación electromagnética a cada longitud de onda, $\epsilon = A / c \cdot l$ donde A es la Absorbancia, c es la concentración molar del soluto y l es la longitud de la cubeta (habitualmente un 1 cm).

más débil ($\epsilon \approx 400 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), debido a que esta transición en el isómero *trans* no está permitida por las reglas de simetría (Figura 2. 3. 6. 3: Línea sólida)

Isómero *cis*: La banda $\pi \rightarrow \pi^*$ se desplaza a longitudes de onda más cortas (efecto hipsocrómico), disminuyendo notablemente en intensidad ($\epsilon \approx 7\text{-}10 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Por otro lado, la transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$ (380-520 nm) en el isómero *cis* está permitida, lo que se traduce en un aumento de su intensidad ($\epsilon \approx 1500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) con respecto al isómero *trans* (Figura 2. 3. 6. 3: Línea punteada).

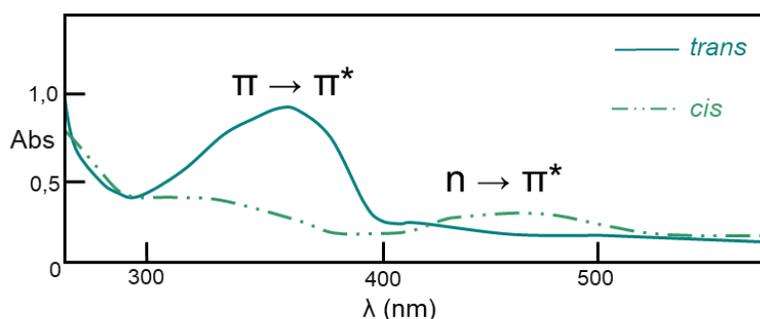


Figura 2. 3. 6. 3

Estas diferencias permiten observar la interconversión fotoquímica que se puede llevar a cabo, irradiando con una luz de una determinada longitud de onda (λ) obteniéndose diferentes proporciones de los estados fotoestacionarios (PSS) *cis* y *trans*. La longitud de onda que provoca la excitación depende de la naturaleza de los sustituyentes de los grupos arilo, aunque en la mayoría de los casos, la isomerozación *trans* \rightarrow *cis* se promueve irradiando con luz UV (generalmente entre 320 y 380 nm), mientras que la fotoreversión *cis* \rightarrow *trans* se favorece con luz azul, a longitudes de onda entre $\lambda \approx 400\text{-}450$ nm. Esta reversión también puede ser térmica. Generalmente las dos conversiones fotoquímicas se dan en una escala de tiempo de picosegundos, mientras que la relajación térmica del isómero *cis* al isómero *trans* es mucho más lenta (del orden de segundos u horas).

DC: Cuando los azobencenos forman parte de moléculas quirales el proceso de fotoisomerización puede ser también evaluado mediante técnicas quirópticas, tales como medidas de rotación específica, técnicas de HPLC quiral o medidas de dicroísmo circular (DC) que permiten evaluar y cuantificar el proceso de fotoisomerización de la estructura ópticamente activa.

La presencia de un pico en los espectros de dicroísmo circular puede ser consecuencia principal de dos situaciones:

-El cromóforo forma parte de un elemento quiral, como por ejemplo moléculas helicoidales, o cromóforos que sean parte de un eje quiral.

-La molécula posee un cromóforo cercano a un centro estereogénico, un eje o un plano quiral, con el que algún modo interacciona.

Cuando una molécula quiral presenta dos cromóforos cercanos tanto energética como espacialmente, los espectros de UV-vis y de dicroísmo circular pueden presentar lo que se denomina un acoplamiento excitónico (EC: excitonic coupled). El acoplamiento excitónico es consecuencia de la deslocalización de un estado excitado entre los dos cromóforos, este fenómeno da lugar a un desdoblamiento del estado excitado (Davydov splitting). En los espectros de UV-vis este desdoblamiento se puede reconocer como una banda de absorción más ancha centrada en la longitud de onda de la transición correspondiente (λ_0). En los espectros de DC de moléculas quirales con dos cromóforos no coplanares, el acoplamiento excitónico quiral se manifiesta como un efecto Cotton con dos signos opuestos, es decir, se observan dos picos consecutivos de signo opuesto. La diferencia de longitud de onda entre el máximo y el mínimo representa el desdoblamiento de Davydov. La amplitud y el signo del ECCD (excitonic coupling circular dichroisms) están estrechamente relacionados con la orientación de los cromóforos, así como con la configuración y conformación molecular del compuesto.

El signo del EC viene dado por el signo del pico que aparece a mayor longitud de onda (es decir positivo cuando el segundo pico es positivo y negativo cuando el segundo pico es negativo). El signo del efecto excitónico quiral puede calcularse teóricamente del siguiente modo: Mirando la conformación más estable a través de los dos cromóforos, un EC negativo se asocia a la dirección del giro que supone ir del primer cromóforo al segundo en sentido contrario a las agujas del reloj, y viceversa. Así se asocia una quiralidad positiva para un EC positivo y una quiralidad negativa para un EC negativo (Figura 2. 3. 6. 4).^[109]

^[109] A. Koslowski, N. Sreerama, R. W. Woody. En Circular Dichroism: Principle and Applications; K. NaKanishi, N. Berova, R. W. Woody, Eds: Wiley-VCH Publishers: New York, 2000, Chapt. 3. P. 55.

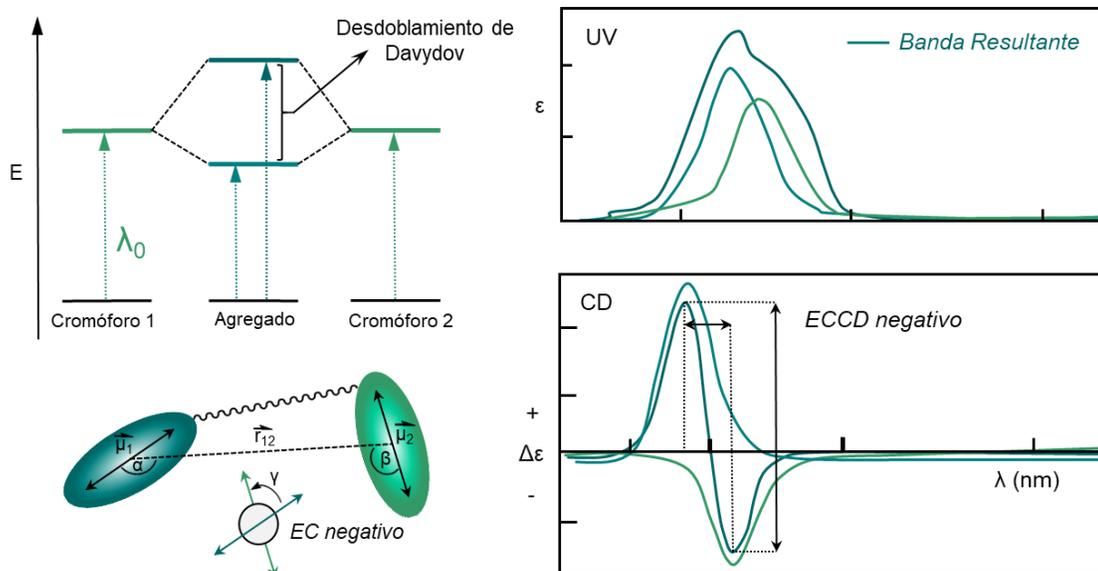


Figura 2. 3. 6. 4

En el ejemplo de la [Figura 2. 3. 6. 5](#) los grupos carbonilo y arilo de los ésteres benzoicos deben adoptar una conformación como la representada, para aliviar interacciones desestabilizantes (polares y estéricas). En esta disposición los acoplamientos excitónicos corresponden a los representados en la [Figura 2. 3. 6. 5](#). El enantiómero R, R presenta un EC negativo y el S, S positivo.

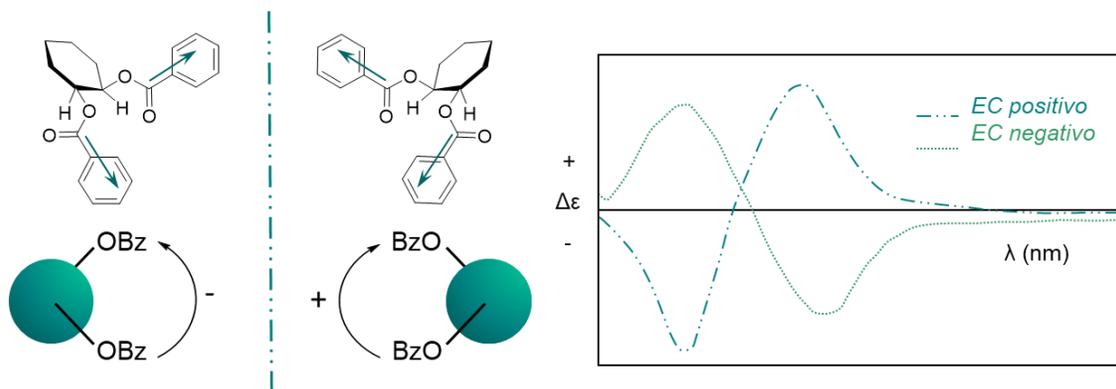


Figura 2. 3. 6. 5

Si se observa detalladamente el proceso de fotoisomerización de un azobenceno se puede apreciar como la distorsión estructural que se produce al pasar del isómero *trans* al *cis* lleva implícita la generación espontánea de una estructura que presenta quiralidad helicoidal, pudiéndose formar dos enantiómeros *cis-P* o *cis-M*. Gracias a las propiedades fotocromáticas

de los azobencenos esta quiralidad helicoidal foto-emergente puede detectarse empleando la técnica de DC.^[110]

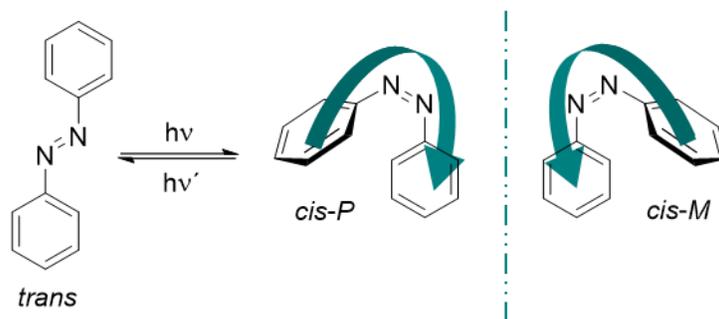


Figura 2. 3. 6. 6

2. 3. 6. 2. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FOTOCRÓMICAS DE LOS

Las técnicas usadas para el seguimiento y observación de los cambios asociados a la fotoisomerización de los ferrocenil azobencenos han sido la espectroscopia Uv-Vis, dicroísmo circular (DC), HPLC quiral y RMN de protón.

UV-Vis y DC:

El estudio de la fotoisomerización de los azobencenos **32a-g** utilizando el compuesto 1-{4-metoxi-3-[(2-*p*-tolilsulfinil)ferrocenil]fenil} azobenceno (*E*,*S_P*,*S_S*)-**32b** como modelo, con el fin de encontrar las mejores condiciones que permitieran observar los cambios asociados a los dos isómeros en el proceso. En primer lugar, se llevó a cabo su irradiación en distintos disolventes como THF, CH₃CN y CH₂Cl₂. El disolvente escogido para el estudio fue el CH₂Cl₂ debido a que los mayores cambios observados en los espectros de DC tras la irradiación se observaron usando dicho disolvente. La monitorización del proceso de fotoisomerización mediante DC y UV, se realizó en un espectrómetro tipo JACSO U-best 560 Hewlett Packard 8453, empleando para la irradiación, un fotoreactor equipado con leds de longitudes de onda de: 365 nm, 460nm y 530 nm, con una potencia de \times W, y una intensidad regulable de \times a \times A (Figura 2. 3. 6. 7).

[110] a) G. Haberhauer, C. Kallweit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2418-2421.; b) K. Takaishi, M. Kawamoto, K. Tsubaki, T. Furuyama, A. Muranaka, M. Uchiyama, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 1778-1782.

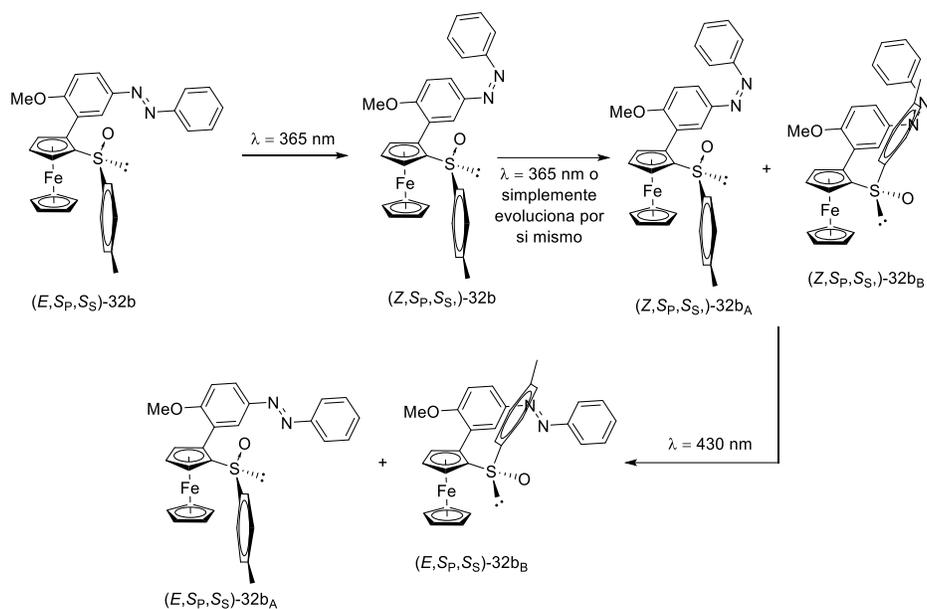


Figura 2. 3. 6. 7

En todos los casos se fueron irradiando las muestras y registrando espectros de UV/Vis y DC hasta que no se observaron alteraciones significativas, para asegurar que se habían alcanzado los estados fotoestacionarios (EFE). Las disoluciones de todos los compuestos sometidos a estudio se prepararon en la oscuridad para evitar procesos de isomerización *trans* → *cis* provocados por la radiación ambiental.

Como se ha indicado anteriormente, el 1-{4-metoxi-3-[(2-*p*-tolilsulfinil)ferrocenil]fenil} azobenceno (E, S_P, S_S)-**32b** como el resto de derivados 32 estaba formado por una mezcla 90:10 de dos diastereoisómeros (**32b_A** **32b_B**) que variaban en la disposición relativa del grupo sulfinilo respecto del resto de 2-metoxifenilo contiguo. La irradiación de una disolución de (E, S_P, S_S)-**32b_A** en diclorometano con una concentración de 10^{-5} M, con una luz de 365 nm de longitud de onda, provocó la fotoisomerización generando un único diastereoisómero de configuración *Z*. En caso de aumentar el tiempo de irradiación con luz de 365 nm, con el fin de aumentar el porcentaje de configuración *Z* en el estado foto-estacionario *cis*, se podía observar como surgía un nuevo producto con un espectro de absorción de azobencenos *cis*. Al llevar a cabo el proceso de reisomerización *cis-trans* de esta nueva mezcla de productos *cis*, se observó, que tras un breve periodo de irradiación con luz de 430 nm, el (Z, S_P, S_S)-**32b_A** evolucionaba al correspondiente (E, S_P, S_S)-**32b_A** inicial y el nuevo compuesto de espectro de absorción correspondiente a un azobenceno *cis* desaparecía y aparecía un nuevo producto con un espectro de absorción correspondiente a un azobenceno *trans*. Comparando los tiempos de retención en HPLC, así como los espectros de absorción de estos nuevos productos *cis* y *trans*, con los tiempos de retención y espectros de absorción del (E, S_P, S_S)-**32b_B** y (Z, S_P, S_S)-**32b_B** obtenidos en el HPLC, se podía deducir que eran los mismos compuesto. De este modo se pudo observar como el proceso de fotoisomerización *trans/cis-cis/trans* iba acompañado de la rotación del enlace Fc-S. **ESTO ES LO YO CREO**

QUE PASA ES VERDAD?? ¿Cómo lo sabemos? Hiciste RMN del producto después de la irradiación?. Decirlo si es así



2. 3. 6. 2. 1 *p*-Tolilsulfinilferrocenil azobencenos enantiopuros (SULFOXIDOS).

4-Metoxi-3-(*S_P,S_S*)-(p-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno (*S_P,S_S*)-33b:

Los espectros de absorción (arriba) y dicroísmo circular (abajo) del compuesto Xb, realizados en diclorometano con una concentración de $X \cdot 10^{-5} \text{ M}$, se encuentran recogidos en la siguiente [Figura 2. 3. 6. 2. 1. 2.](#)

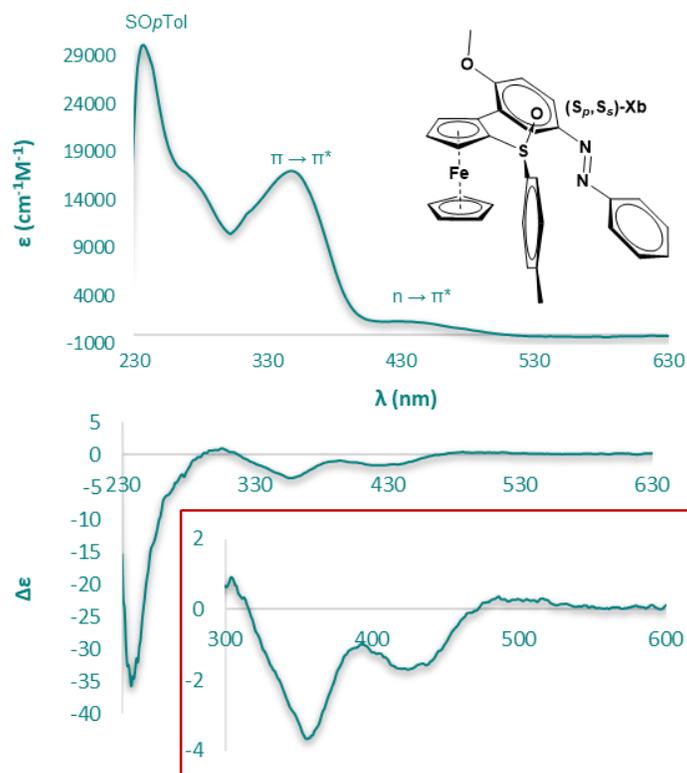


Figura 2. 3. 6. 2. 1. 1

El espectro de UV/Vis del azocompuesto inicial presentaba las bandas de absorción características de un azobenceno *trans* (*E*): una en la región de $\lambda < 250$ nm, correspondiente a la absorción del grupo sulfinilo, otra entre 350 y 400 nm correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de los anillos aromáticos del azocompuesto y del ferroceno y una tercera mucho más débil entorno a los 450 nm, debida a la transición $n \rightarrow \pi^*$ del grupo azo (Figura 2. 3. 6. 2. 1. 1).

A su vez, en el espectro de DC del azocompuesto inicial se pueden observar tres bandas de efecto Cotton negativo que se corresponden con las bandas presentes en el espectro de UV/Vis (Figura 2. 3. 6. 2. 1. 1).

Teniendo en cuenta que en este compuesto la parte estereogénica reside en el 2-(*p*-tolilsulfinil)-ferrocenilo, la aparición en dicroísmo circular de la segunda y última banda, solo podría deberse a una transferencia de quiralidad desde este último hasta el grupo azo del azobenceno ya que de por sí, los azobencenos, son planos y no deberían dar respuesta en esta técnica quiróptica.

-EFE_{cis}: Se llevó a cabo la fotoisomerización *trans* → *cis* irradiando las disoluciones con una longitud de onda de 365 nm (luz UV), en los pocillos equipados con led UV del fotoreactor con una intensidad de corriente de 0.26 A. Nuevamente, se registraron los espectros de UV/Vis y una vez que no se observaron cambios significativos, se concluyó que se había alcanzado el estado fotoestacionario *cis* (EFE_{cis}, línea verde punteada, Figura 2. 3. 6. 2. 1. 2). El azobenceno **33b** alcanzaba el estado fotoestacionario tras solo 30 segundos de irradiación. Los cambios que se observaban en sus espectros de absorción eran los que cabría esperar en este tipo de dispositivos.

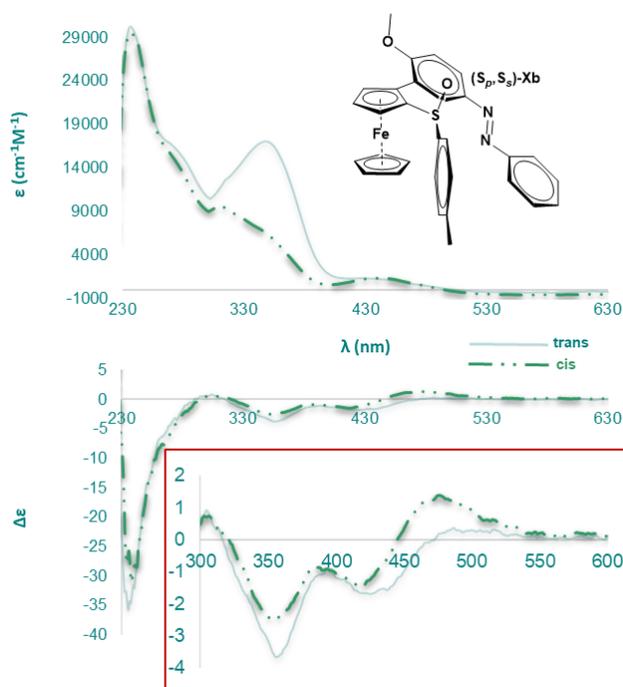


Figura 2. 3. 6. 2. 1. 2

UV/Vis: Los cambios que se observaban en su espectro de absorción después de la irradiación son los que cabría esperar en este tipo de procesos de fotoisomerización *trans* → *cis*. La banda de absorción a $\lambda \approx 230$ nm permanecía inalterada mientras que la banda de absorción en torno a $\lambda \approx 350$ nm (transición $\pi \rightarrow \pi^*$) del isómero *trans* sufría una drástica disminución en su intensidad. Por otro lado, se observó un ligero aumento en la intensidad la banda en torno a $\lambda \approx 450$ nm.

DC: La banda observada a $\lambda \approx 230$ nm correspondiente al sulfóxido homoquiral permanecía inalterada, mientras que se observaba una ligera disminución de la intensidad en la banda en torno a $\lambda \approx 350$ nm correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$. El cambio más

significativo correspondía a la banda de $\lambda \approx 450$ nm se desdoblaba en dos bandas consecutivas de signo opuesto negativo/positivo que se suele asociar a la presencia de un grupo cromóforo cerca de un eje quiral. Este tipo de comportamiento denominado acoplamiento excitónico se manifiesta en el espectro de dicroísmo circular con signos opuestos, es decir, se observan dos picos consecutivos de signo opuesto correspondientes a una sola banda de absorción del espectro de absorbancia. La helicidad del compuesto *cis* se manifiesta en el aumento de la intensidad de la banda de $\lambda \approx 450$ nm (hélice P)

-EFE *trans*: Tras haber alcanzado el estado fotoestacionario *cis* después de irradiar la disolución del compuesto **33b** en CH₂Cl₂ con luz de $\lambda = 365$ nm, una nueva irradiación de la disolución resultante con una longitud de onda de $\lambda = 430$ nm (luz azul), permitía revertir el proceso de foto-isomerización, ya que, después de tan solo 30 segundos de irradiación ($\lambda_{\text{max}} \approx 430$ nm) el espectro UV-Vis de la disolución final era prácticamente idéntico a la inicial (línea azul, Figura 2. 3. 6. 2. 1. 3).

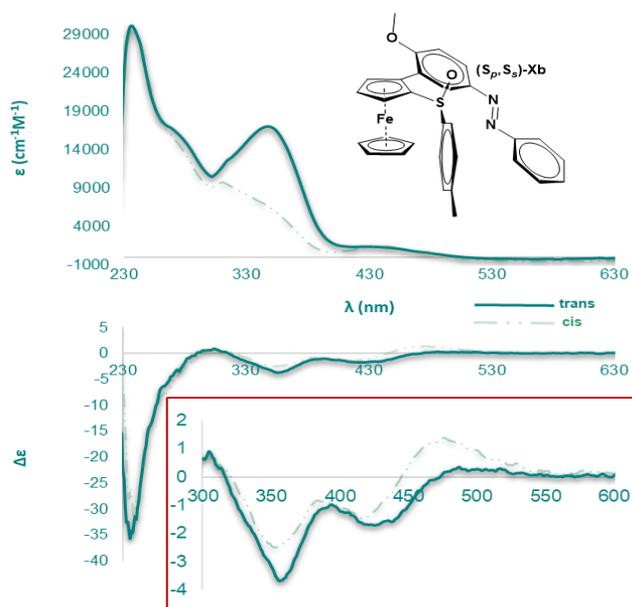


Figura 2. 3. 6. 2. 1. 3

UV/Vis: La banda de $\lambda \approx 350$ nm había recuperado toda su intensidad y la absorbancia a 450 nm había disminuido. Por otro lado, la reisolomerización *cis/trans* térmica se daba de una manera mucho más lenta que la inducida por la luz. Por ejemplo, el *cis*-**33b** tenía una vida media en la oscuridad de 36 horas a temperatura ambiente.

DC: De la misma manera que se había observado en los espectros de UV/Vis, los cambios producidos en los espectros de dicroísmo circular en el proceso de fotoisomerización *cis* → *trans*, eran reversibles. Así, cuando se irradiaron las disoluciones de CH₂Cl₂ del *cis*-azobencenos **33** con luz de longitud de onda de $\lambda = 430$ nm (azul) durante 30 segundos, se observó en los espectros de DC que la banda del sulfóxido ($\lambda = 250$ nm) continuaba inalterada, mientras que la banda de absorbancia observada a $\lambda \approx 350$ nm recuperaba su intensidad original y la banda de $\lambda \approx 450$ nm, también recuperaba su intensidad y el signo del efecto Cotton original (Figura 2. 3. 6. 2. 1. 3). Estos cambios demostraban que la fotoisomerización era reversible, se realizaron varios ciclos de irradiación, primero con luz de $\lambda = 365$ nm y posteriormente con luz de $\lambda = 430$ nm para comprobar la fatiga. Tras 5 ciclos, no se observaron alteraciones apreciables de los espectros de UV/Vis ni de DC, lo que avalaba la integridad configuracional de estos nuevos sistemas y su capacidad de comportarse como interruptores moleculares.

2',5'-Difluoro-4-metoxi-3-(*S_P,S_S*)-(p-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno [(*S_P,S_S*)-33c] y 2'-Trifluorometil-4-metoxi-3-(*S_P,S_S*)-(p-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno [(*S_P,S_S*)-33d].

Los espectros de absorción (arriba) y dicroísmo circular (abajo) de los compuesto **33c** y **33d**, realizados en diclorometano con una concentración de 10^{-5} M, se encuentran recogidos en la siguiente Figura 2. 3. 6. 2. 1. 4.

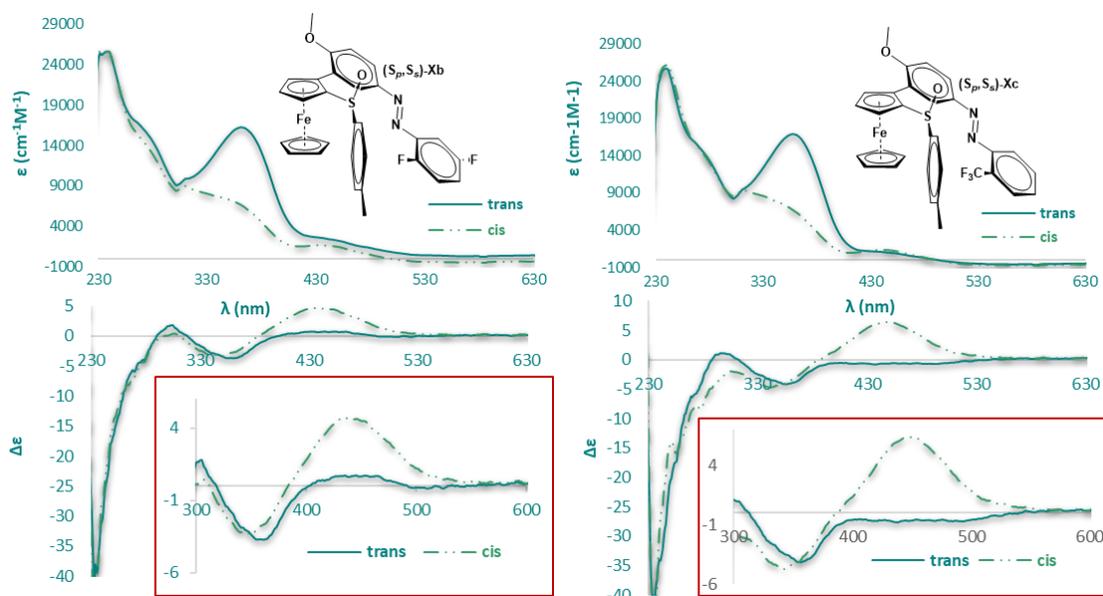


Figura 2. 3. 6. 2. 1. 4

Los espectros de UV/Vis iniciales presentaban las bandas de absorción características de un azobenceno *trans* (*E*) y en los espectros de DC se podían observar las tres bandas correspondientes con las bandas presentes en el espectro de UV/Vis. Sin embargo, en estos casos la intensidad de la banda de en torno a los $\lambda \approx 450$ nm correspondiente a la transición $n \rightarrow \pi^*$ es muy leve y en el caso del compuesto **33c** de efecto Cotton positivo.

-EFE_{cis}: Se llevó a cabo la fotoisomerización *trans* \rightarrow *cis* irradiando las disoluciones con una longitud de onda de $\lambda = 365$ nm (luz UV), en los pocillos equipados con led UV del fotoreactor con una intensidad de corriente de 0.26 A. Nuevamente, se registraron los espectros de UV/Vis y una vez que no se observaron cambios significativos, se concluyó que se había alcanzado el estado fotoestacionario *cis* (EFE_{cis}, línea verde punteada). Los azobencenos **33c** (izquierda de la Figura 2. 3. 6. 2. 1. 4) y **33d** (derecha de la Figura 2. 3. 6. 2. 1. 4) alcanzaban el estado fotoestacionario tras solo 30 segundos de irradiación.

UV/Vis: En ambos casos, la banda de $\lambda \approx 230$ nm permanecía inalterada, la banda de absorción en torno a $\lambda \approx 350$ nm (transición $\pi \rightarrow \pi^*$) del isómero *trans* sufría una drástica disminución en su intensidad y, por último, se observó un aumento muy suave de la banda en torno a $\lambda \approx 450$ nm.

DC: En ambos casos, las bandas de $\lambda \approx 230$ nm y $\lambda \approx 350$ nm permanecían inalteradas mientras que, por el contrario, la banda de $\lambda \approx 450$ nm sufría un gran aumento en su intensidad y en el caso del compuesto **33c**, este aumento de intensidad iba acompañado de un cambio de signo de negativo a positivo del efecto Cotton.

-EFE_{trans}: Tras haber alcanzado el estado fotoestacionario *cis*, una nueva irradiación de las disoluciones resultantes con una longitud de onda de $\lambda = 430$ nm (luz azul), permitía revertir el proceso de foto-isomerización, ya que, después de tan solo 30 segundos de irradiación, el espectro UV-Vis de la disolución final era prácticamente idéntico a la inicial (línea azul).

UV/Vis: La banda de $\lambda \approx 350$ nm recuperaba toda su intensidad y la banda de $\lambda \approx 450$ nm disminuía. Por otro lado, la re-isomerización *cis/trans* térmica se daba de una manera mucho más lenta que la inducida por la luz. Por ejemplo, el *cis*-**33** tenía una vida media en la oscuridad de 36 horas a temperatura ambiente.

DC: De la misma manera que se había observado en los espectros de UV/Vis, los cambios producidos en los espectros de dicroísmo circular en el proceso de

fotoisomerización *cis* → *trans*, eran reversibles. Así, cuando se irradiaron las disoluciones del *cis*-azobencenos **33c** y **33d** con luz de longitud de onda de $\lambda = 430$ nm (luz azul) durante 30 segundos, se observó como en los espectros de DC, la banda del sulfóxido continuaba inalterada, la banda de $\lambda \approx 350$ nm recuperaba su intensidad original y la banda de $\lambda \approx 450$ nm, también recuperaba su intensidad y el signo del efecto Cotton original. Estos cambios demostraban que la fotoisomerización era reversible, se realizaron varios ciclos de irradiación, primero con luz de $\lambda = 365$ nm y posteriormente con luz de $\lambda = 430$ nm para comprobar la fatiga. Tras 5 ciclos, no se observaron alteraciones apreciables de los espectros de UV/Vis ni de DC, lo que avalaba la integridad configuracional de estos nuevos sistemas.

3'-Trifluorometil-4-metoxi-3-(S_P, S_S)-(p-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno [(S_P, S_S)-**33e**] y 4'-Trifluorometil-4-metoxi-3-(S_P, S_S)-(p-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno [(S_P, S_S)-**33f**].

Los espectros de absorción (arriba) y dicroísmo circular (abajo) de los compuesto **33e** y **33f**, realizados en diclorometano con una concentración de 10^{-5} M, se encuentran recogidos en la siguiente imagen.

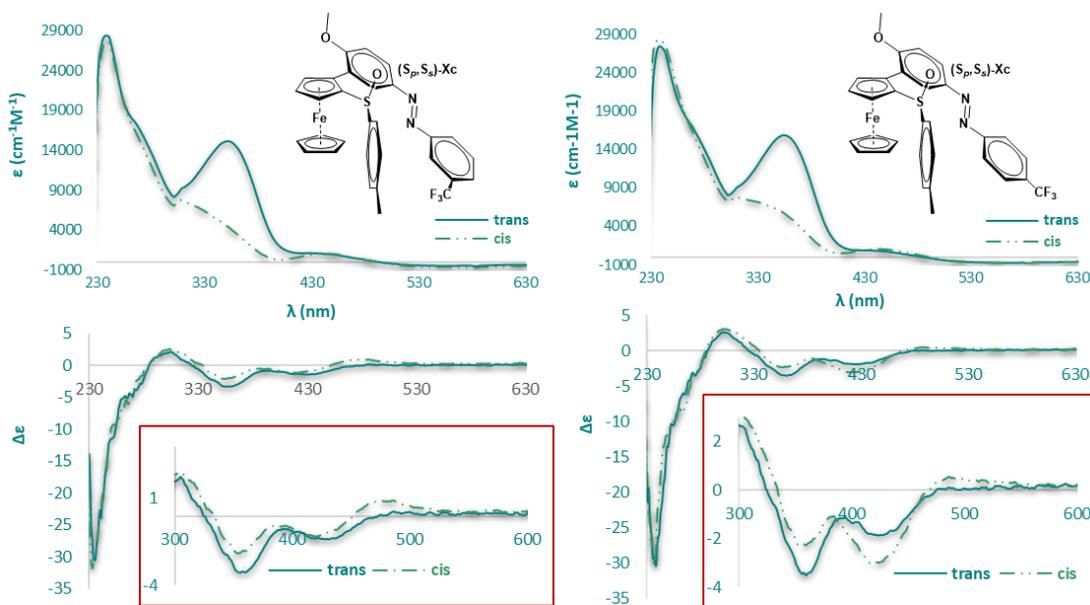


Figura 2. 3. 6. 2. 1. 5

Los espectros de UV/Vis iniciales presentaban las bandas de absorción características de un azobenceno *trans* (*E*) y en los espectros de DC se podían observar las tres bandas correspondientes con las bandas presentes en el espectro de UV/Vis (Figura 2. 3. 6. 2. 1. 5).

-EFE_{cis}: Se llevó a cabo la fotoisomerización *trans* → *cis* irradiando las disoluciones con una longitud de onda de $\lambda = 365$ nm (luz UV), en los pocillos equipados con led UV del fotoreactor con una intensidad de corriente de 0.26 A. Nuevamente, se registraron los espectros de UV/Vis y una vez que no se observaron cambios significativos, se concluyó que se había alcanzado el estado fotoestacionario *cis* (EFE_{cis}, línea verde punteada). Los azobencenos 33e (izquierda de la Figura 2. 3. 6. 2. 1. 5) y 33f (derecha de la Figura 2. 3. 6. 2. 1. 5) alcanzaban el estado fotoestacionario tras solo 30 segundos de irradiación.

UV/Vis: En ambos casos, la banda de $\lambda \approx 230$ nm permanecía inalterada, la banda de absorción en torno a $\lambda \approx 350$ nm (transición $\pi \rightarrow \pi^*$) del isómero *trans* sufría una drástica disminución en su intensidad y, por último, se observó un aumento muy suave de la banda en torno a $\lambda \approx 450$ nm.

DC: En los dos compuestos la banda de $\lambda \approx 230$ nm permanecía inalterada y se observaba una ligera disminución de la intensidad en la banda en torno a $\lambda \approx 350$ nm. La banda de $\lambda \approx 450$ nm se desdoblaba en dos bandas consecutivas de signo opuesto negativo/positivo (acoplamiento excitónico) en el caso del compuesto 33e mientras que, en el compuesto 32f aumentaba su intensidad.

-EFE_{trans}: Tras haber alcanzado el estado fotoestacionario *cis*, una nueva irradiación de las disoluciones resultantes con una longitud de onda de $\lambda = 430$ nm (luz azul), permitía revertir el proceso de foto-isomerización, ya que, después de tan solo 30 segundos de irradiación, el espectro UV-Vis de la disolución final era prácticamente idéntico a la inicial (línea azul).

UV/Vis: La banda de $\lambda \approx 350$ nm había recuperado toda su intensidad y la banda de $\lambda \approx 450$ nm había disminuido. Por otro lado, la reisomerización *cis/trans* térmica se daba de una manera mucho más lenta que la inducida por la luz. Por ejemplo, el *cis*-Xx tenía una vida media en la oscuridad de 36 horas a temperatura ambiente.

DC: De la misma manera que se había observado en los espectros de UV/Vis, los cambios producidos en los espectros de dicroísmo circular en el proceso de fotoisomerización *cis* → *trans*, eran reversibles. Así, cuando se irradiaron las disoluciones del *cis*-azobencenos 33e y 33f con luz de longitud de onda de $\lambda = 430$ nm (luz azul) durante 30 segundos, se observó como en los espectros de DC, como la banda del sulfoxido continuaba inalterada, la banda de 350 nm recuperaba su intensidad original y la banda de

$\lambda \approx 450$ nm, también recuperaba su intensidad y el signo del efecto Cotton original. Estos cambios demostraban que la fotoisomerización era reversible, se realizaron varios ciclos de irradiación, primero con luz de $\lambda = 365$ nm y posteriormente con luz de $\lambda = 430$ nm para comprobar la fatiga. Tras 5 ciclos, no se observaron alteraciones apreciables de los espectros de UV/Vis ni de DC, lo que avalaba la integridad configuracional de estos nuevos sistemas.

2'-Nitro-4-metoxi-3-(S_P, S_S)-(p-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno [(S_P, S_S)-33g], 4'-nitro-4-metoxi-3-(S_P, S_S)-(p-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno [(S_P, S_S)-33h] y 2-(S_P, S_S)-(p-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno [(S_P, S_S)-33a].

Los espectros de absorción (arriba) y dicroísmo circular (abajo) de los compuestos 33g, 33h y 33a, realizados en diclorometano con una concentración de 10^{-5} M, se encuentran recogidos en la siguiente imagen.

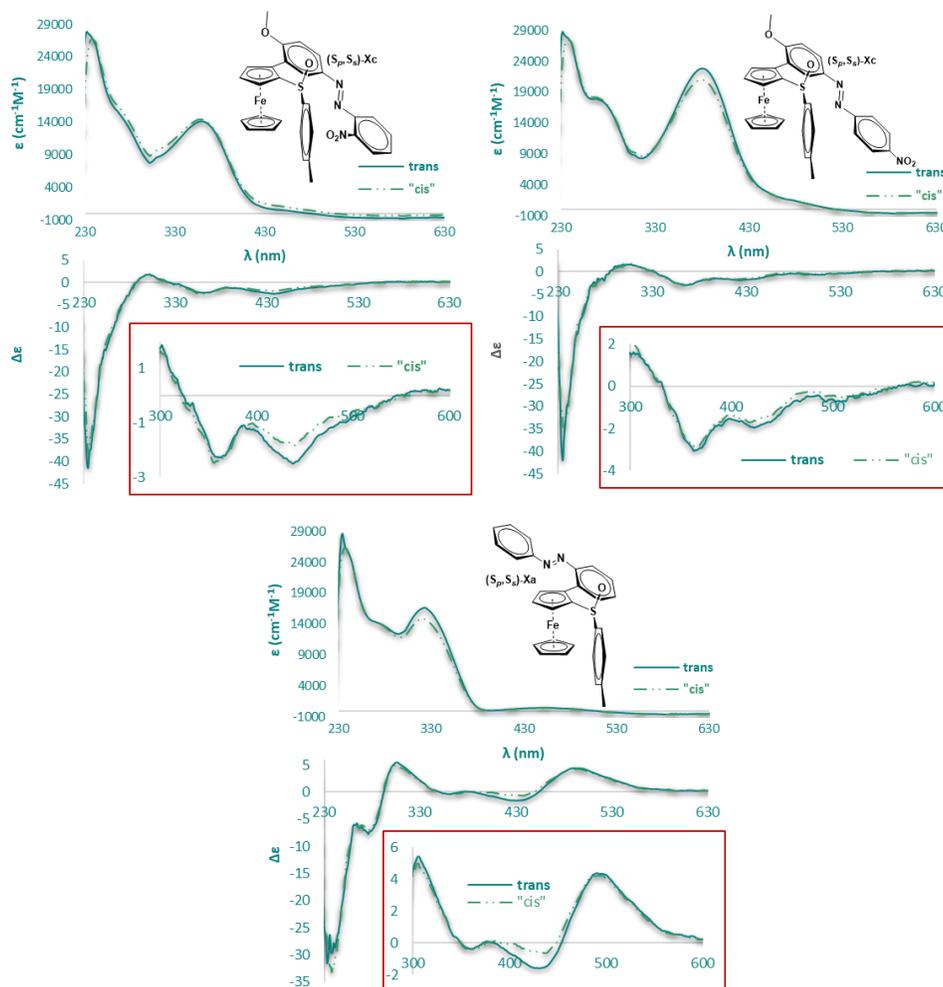
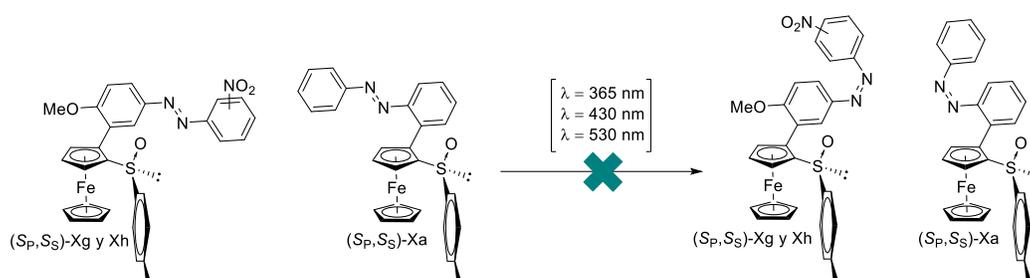


Figura 2. 3. 6. 2. 1. 6

Los espectros de UV/Vis iniciales presentaban las bandas de absorción características de un azobenceno *trans* (*E*) y en los espectros de DC se podían observar las tres bandas correspondientes con las bandas presentes en el espectro de UV/Vis (Figura 2. 3. 6. 2. 1. 6). En el caso de (S_P, S_S) -2-(*p*-tolil-sufinil)ferrocenilazobenceno Y, en torno a $\lambda \approx 450$ nm, se pueden observar un acoplamiento excitónico, negativo/positivo.

-Fotoisomerización: Los espectros de absorción y de dicroísmo circular de los compuestos 33g, 33h y 33a permanecieron prácticamente inalterados tras largos tiempo de irradiación con luz de diferentes λ (365, 430 y 530 nm), indicando un decaimiento en la fotoactividad de estos derivados. En el caso de los nitro-derivados, esto podía deberse al gran carácter electrón-atractor que tiene el grupo NO_2 que ni la presencia de dos grupos electrón-donadores como son el OMe y el ferroceno pueden superar.^[98] En el caso del

derivado Y, este dato concordaba con lo ya descrito en la bibliografía.^[111] Este hecho hacía imposible su uso como interruptores moleculares.



2. 3. 4. 6. 2. 2 *p*-Tolilsulfenilferrocenil azobencenos enantiopuros (TIOETERS).

2',5'-Difluoro-4-metoxi-3-(*S_P*)-(p-tolil-sulfenil)ferrocenlazobenceno [(*S_P*)-34c] y 2'-Trifluorometil-4-metoxi-3-(*S_P*)-(p-tolil-sulfenil)ferrocenlazobenceno [(*S_P*)-34d].

Los espectros de absorción (arriba) y dicroísmo circular (abajo) de los compuesto 34c y 34d, realizados en diclorometano con una concentración de $3 \cdot 10^{-5}$ M, se encuentran recogidos en la siguiente imagen.

[111] a) J. Dokic, M. Gothe, J. Wirth, M. V. Peters, J. Schwartz, S. Hecht, P. Saalfrank, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 6763.; b) H. M. D. Bandara, S. C. Burdette, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1809.; c) F. Cisnetti, R. Ballardini, A. Credi, M. T. Gandolfi, S. Masiero, F. Negri, S. Pieraccini, G. P. Spada, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2011.

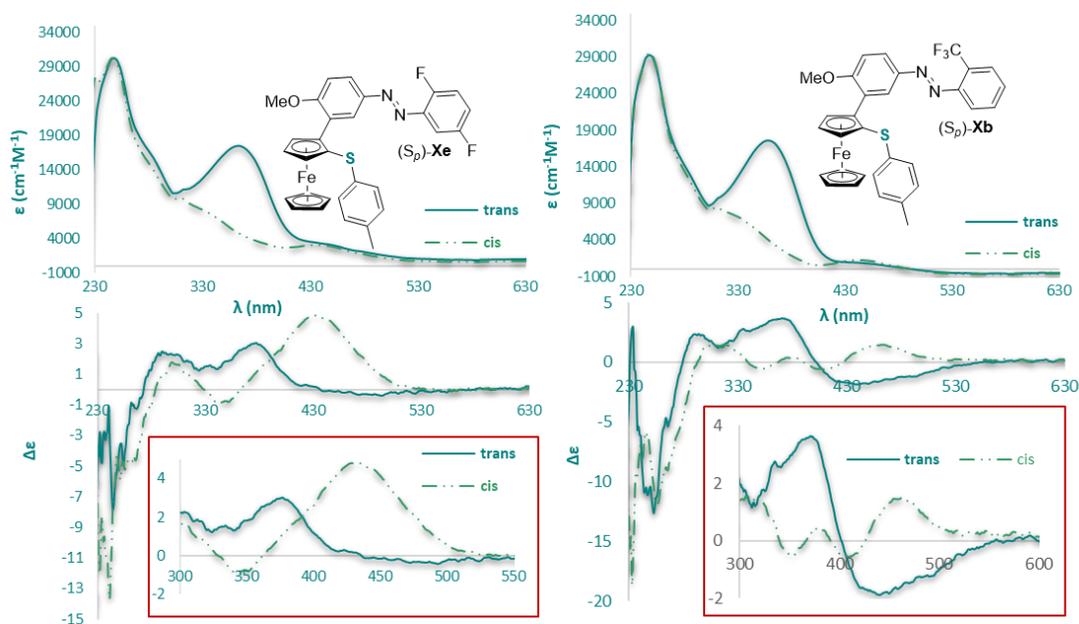


Figura 2. 3. 6. 2. 2. 1

Los espectros de UV/Vis iniciales presentaban las bandas de absorción características de un azobenceno *trans* (*E*): una en la región de $\lambda < 250$ nm, correspondiente a la absorción del grupo sulfenilo, otra entre 350 y 400 nm correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del azocromóforo, y una tercera mucho más débil entorno a los 450 nm, que podría deberse a la transición $n \rightarrow \pi^*$ del grupo azo.

En los espectros de DC se pueden observar tres bandas correspondientes con las bandas presentes en el espectro de UV/Vis: La primera de ellas, en torno a los 230 nm, correspondiente al grupo sulfenilo de efecto Cotton negativo, una segunda, en torno a 350 nm, correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$, de signo positivo y una última en torno a los 450 nm correspondiente a la transición $n \rightarrow \pi^*$ del azobenceno inapreciable en caso del compuesto **34c** y de signo negativo en el caso del compuesto **34d**.

-EFE_{cis}: Se llevó a cabo la fotoisomerización *trans* \rightarrow *cis* irradiando las disoluciones con una longitud de onda λ de 365 nm, en los pocillos equipados con led UV del fotoreactor con una intensidad de corriente de 0.26 A. Nuevamente, se registraron los espectros de UV/Vis y una vez que no se observaron cambios significativos, se concluyó que se había alcanzado el estado fotoestacionario *cis* (EFE_{cis}, línea verde punteada). los azobencenos **34c** y **34d** alcanzaba el estado fotoestacionario tras solo 30 segundos de irradiación.

UV/Vis: Los cambios que se observaban en sus espectros de absorción eran los que cabría esperar en este tipo de dispositivos. La banda de 230 nm permanecía inalterada, la banda de absorción en torno a 350 nm (transición $\pi \rightarrow \pi^*$) del isómero *trans* sufría una drástica disminución en su intensidad. Por otro lado, se observó un aumento muy suave de la banda en torno a 450 nm.

DC: En ambos casos, la banda de 230 nm permanecía inalterada y la banda de 350 nm sufre una disminución en su intensidad y cambia de signo de positivo a negativo. Por último, la banda de 450 nm aumenta de intensidad de signo positivo en el caso del compuesto **34c** y se desdoblaba en dos bandas consecutivas de signo opuesto negativo/positivo (acoplamiento excitónico) en el caso de azocompuesto **34d** trifluorometil *orto* sustituido.

-EFE*trans*: Tras haber alcanzado el estado fotoestacionario *cis*, una nueva irradiación de las disoluciones resultantes con una longitud de onda de 430 nm (luz azul), permitía revertir el proceso de foto-isomerización, ya que, después de tan solo 30 segundos de irradiación, el espectro UV-Vis de la disolución final era prácticamente idéntico a la inicial (línea azul).

UV/Vis: La banda de 350 nm había recuperado toda su intensidad y la banda de 450 nm había disminuido. Por otro lado, la re-isomerización *cis/trans* térmica se daba de una manera mucho más lenta que la inducida por la luz. Por ejemplo, el *cis*-**33b** tenía una vida media en la oscuridad de 36 horas a temperatura ambiente.

DC: De la misma manera que se había observado en los espectros de UV/Vis, los cambios producidos en los espectros de dicroísmo circular en el proceso de fotoisomerización *cis* \rightarrow *trans*, eran reversibles. Así, cuando se irradiaron las disoluciones del *cis*-azobencenos **34** con luz de longitud de onda de 430 nm (azul) durante 30 segundos, se observó como en los espectros de DC, como la banda del sulfoxido continuaba inalterada, la banda de 350 nm recuperaba su intensidad original y la banda de 450 nm, también recuperaba su intensidad y el signo del efecto Cotton original (Figura 2. 3. 6. 2. 2. 1). Estos cambios demostraban que la fotoisomerización era reversible, se realizaron varios ciclos de irradiación, primero con luz de 365 nm y posteriormente con luz de 430 nm para comprobar la fatiga. Tras 5 ciclos, no se observaron alteraciones apreciables de los espectros de UV/Vis ni de DC, lo que avalaba la integridad configuracional de estos nuevos sistemas.

En el caso de los tioeter derivados, la aparición en dicroísmo circular de la segunda y última banda, solo podría deberse a una transferencia de quiralidad desde el ferroceno estereoselectivamente disustituido hasta el grupo azo del azobenceno, ya que, en estos casos, la quiralidad generada por el sulfóxido había desaparecido. Por tanto, se demostró que el ferroceno debidamente sustituido actuaba como stereocontrolador durante el proceso de fotoisomerización gracias a su quiralidad planar.

3'-Trifluorometil-4-metoxi-3-(S_P)-(p-tolil-sulfenil)ferrocenlazobenceno [(S_P)- 34e] y 4'-Trifluorometil-4-metoxi-3-(S_P)-(p-tolil-sulfenil)ferrocenlazobenceno [(S_P)- 34f].

Los espectros de absorción (arriba) y dicroísmo circular (abajo) de los compuesto 34e y 34f, realizados en diclorometano con una concentración de $3 \cdot 10^{-5}$ M, se encuentran recogidos en la siguiente imagen.

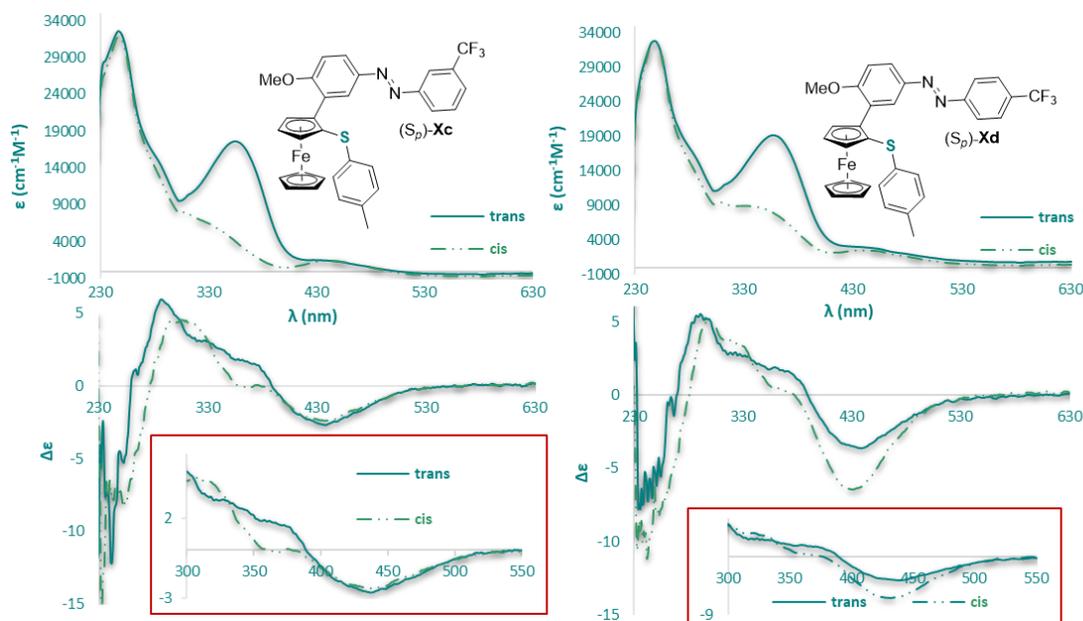


Figura 2. 3. 6. 2. 2. 2

Los espectros de UV/Vis iniciales presentaban las bandas de absorción características de un azobenceno *trans* (*E*): una en la región de $\lambda < 250$ nm, correspondiente a la absorción del grupo sulfenilo, otra entre 350 y 400 nm correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del azocromóforo, y una tercera mucho más débil entorno a los 450 nm, que podría deberse a la transición $n \rightarrow \pi^*$ del grupo azo.

En los espectros de DC se pueden observar tres bandas correspondientes con las bandas presentes en el espectro de UV/Vis: La primera de ellas, en torno a los 230 nm, correspondiente al grupo sufenilo de efecto Cotton negativo, una segunda, en torno a 350 nm, correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$, de signo positivo y una última en torno a los 450 nm correspondiente a la transición $n \rightarrow \pi^*$ del azobenceno de signo negativo.

-EFE_{cis}: Se llevó a cabo la fotoisomerización *trans* \rightarrow *cis* irradiando las disoluciones con una longitud de onda λ de 365 nm, en los pocillos equipados con led UV del fotoreactor con una intensidad de corriente de 0.26 A. Nuevamente, se registraron los espectros de UV/Vis y una vez que no se observaron cambios significativos, se concluyó que se había alcanzado el estado fotoestacionario *cis* (EFE_{cis}, línea verde punteada). El azobenceno 34e alcanzaba el estado fotoestacionario tras solo 30 segundos de irradiación.

UV/Vis: Los cambios que se observaban en sus espectros de absorción eran los que cabría esperar en este tipo de dispositivos. La banda de 230 nm permanecía inalterada, la banda de absorción en torno a 350 nm (transición $\pi \rightarrow \pi^*$) del isómero *trans* sufría una drástica disminución en su intensidad. Por otro lado, se observó un aumento muy suave de la banda en torno a 450 nm.

DC: En ambos casos, la banda de 230 nm permanecía inalterada y se observaba una ligera disminución de la intensidad en la banda en torno a 350 nm correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$. La banda de 450 nm permanecía inalterada en el caso del compuesto 34e mientras que, aumentaba su intensidad (conservando el signo del efecto Cotton) en el caso del compuesto 34f.

-EFE_{trans}: Tras haber alcanzado el estado fotoestacionario *cis*, una nueva irradiación de las disoluciones resultantes con una longitud de onda de 430 nm (luz azul), permitía revertir el proceso de foto-isomerización, ya que, después de tan solo 30 segundos de irradiación, el espectro UV-Vis de la disolución final era prácticamente idéntico a la inicial (línea azul).

UV/Vis: La banda de 350 nm había recuperado toda su intensidad y la banda de 450 nm había disminuido. Por otro lado, la re-isomerización *cis/trans* térmica se daba de una manera mucho más lenta que la inducida por la luz. Por ejemplo, el *cis*-34e tenía una vida media en la oscuridad de 36 horas a temperatura ambiente.

DC: De la misma manera que se había observado en los espectros de UV/Vis, los cambios producidos en los espectros de dicroísmo circular en el proceso de fotoisomerización *cis* → *trans*, eran reversibles. Así, cuando se irradiaron las disoluciones del *cis*-azobencenos **34** con luz de longitud de onda de 430 nm (azul) durante 30 segundos, se observó como en los espectros de DC, como la banda del sulfóxido continuaba inalterada, la banda de 350 nm recuperaba su intensidad original y la banda de 450 nm, también recuperaba su intensidad y el signo del efecto Cotton original (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Estos cambios demostraban que la fotoisomerización era reversible, se realizaron varios ciclos de irradiación, primero con luz de 365 nm y posteriormente con luz de 430 nm para comprobar la fatiga. Tras 5 ciclos, no se observaron alteraciones apreciables de los espectros de UV/Vis ni de DC, lo que avalaba la integridad configuracional de estos nuevos sistemas.

2'-Nitro-4-metoxi-3-(*S_P*)-(p-tolil-sulfenil)ferrocenlazobenceno [(*S_P*)- **34g**], 4'-Nitro-4-metoxi-3-(*S_P*)-(p-tolil-sulfenil)ferrocenlazobenceno [(*S_P*)- **34h**] y 2-(*S_P*)-(p-Tolil-sulfenil)ferrocenlazobenceno [(*S_P*)- **34a**].

Los espectros de absorción (arriba) y dicroísmo circular (abajo) de los compuesto **34g**, **34h** y **34a**, realizados en diclorometano con una concentración de $3 \cdot 10^{-5}$ M, se encuentran recogidos en la siguiente imagen.

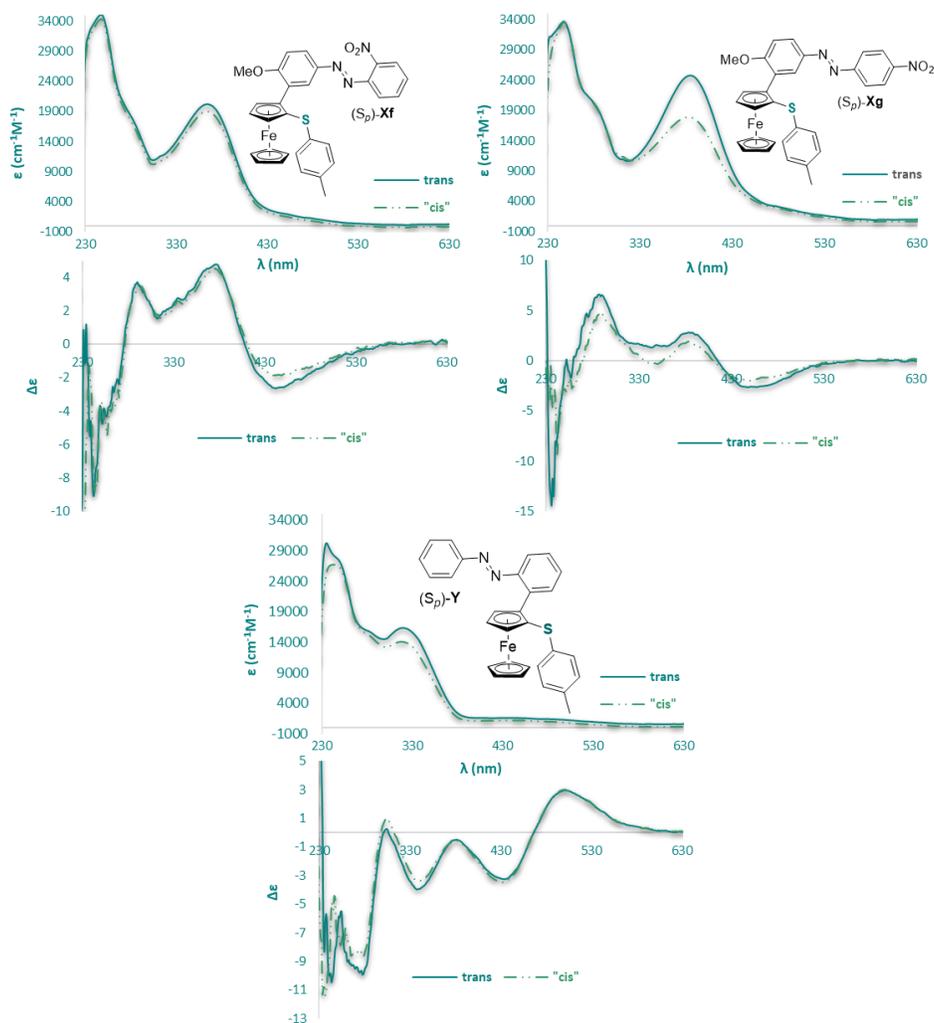
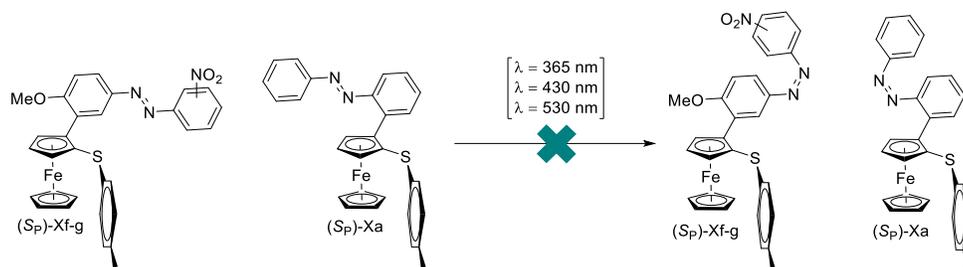


Figura 2. 3. 6. 2. 2. 3

Al igual que en el caso de sus precursores de tipo sulfóxido, los espectros de UV/Vis iniciales presentaban las bandas de absorción características de un azobenceno *trans* (*E*) y en los espectros de DC se podían observar las tres bandas correspondientes con las bandas presentes en el espectro de UV/Vis. En el caso de (S_P)-2-(*p*-tolil-sufenil)ferrocenilazobenceno **34a**, en torno a 450 nm, se pueden observar un acoplamiento excitónico, negativo/positivo.

-Fotoisomerización: Los espectros de absorción y de dicroísmo circular de los compuestos **34g**, **34h** y **34a** permanecieron prácticamente inalterados tras largos tiempo de irradiación con luz de diferentes λ (365, 430 y 530 nm), indicando un decaimiento en la fotoactividad de estos derivados. En el caso de los nitro-derivados, esto podía deberse al gran carácter electrón-atractor que tiene el grupo NO₂ que ni la presencia de dos grupos

electrón-donadores como son el OMe y el ferroceno pueden superar [98]. En el caso del derivado Y, este dato concordaba con lo ya descrito en la bibliografía [111]. Este hecho hacía imposible su uso como interruptores moleculares.



2. 4. PARTE EXPERIMENTAL

2. 4. 1. TÉCNICAS Y APARATOS.

Procedimientos cromatográficos.

Cromatografía en capa fina.

El seguimiento de las reacciones se ha efectuado por cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios de gel de sílice (*Merck*-60 230-400 mesh) de 0.2 mm de espesor. El análisis de las placas se ha llevado a cabo en una lámpara de luz ultravioleta de 254/365 nm y/o utilizando un revelador químico adecuado como el ácido fosfomolibdico, 2,4-dinitrofenilhidracina o permanganato potásico.

Cromatografía en columna.

Las cromatografías en columna (cromatografía flash)²⁰⁵ se realizaron con gel de sílice (*Merck*, 230-400 mesh ASTM). El eluyente se indica en cada caso, así como las proporciones relativas de disolventes en volumen/volumen.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los excesos enantioméricos (e.e.) se han determinado por experimentos llevados a cabo a temperatura ambiente, empleando un aparato *Agilent 1100* equipado con un detector de UV-Visible de longitud de onda variable. La columna cromatográfica, el flujo (mL/min) y el eluyente se indica en cada caso, y en todos los casos se ha evaluado previamente en compuesto racémico.

Espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN).

Los espectros de ¹H-RMN ¹³C-RMN y ¹⁹F-RMN fueron realizados a temperatura ambiente en los equipos *Bruker AC-300* (300,75 y 282.4 MHz, respectivamente) del Departamento de Química Orgánica de la Universidad Autónoma de Madrid ó *AC-500* (500, 125 y 470.6 MHz, respectivamente) del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm, tomando como referencia el disolvente empleado: CDCl₃ (7.26 y 77.0 ppm). Para los espectros realizados en otros disolventes se indica el disolvente deuterado entre paréntesis en cada caso.

Espectrometría de masas.

Los espectros de masas (EM) y los espectros de masas de alta resolución (EMAR) se han registrado en un espectrómetro *Hewlett-Packard HP-5985* usando técnicas de impacto electrónico a 70 eV, BAR+, Electrospray o APCI+ como modo de ionización. Los resultados se expresan en función de la relación masa/carga (m/z) para los picos más importantes y los valores entre paréntesis (%) corresponden a las intensidades relativas respecto al pico base (100%).

Puntos de fusión (P.f.).

Los puntos de fusión se han determinado en un aparato *GallempKamp* en tubos capilares abiertos.

Rotaciones específicas.

Los valores de rotación óptica ($[\alpha]_D^{20}$) se han medido a temperatura ambiente en un polarímetro *Perkin Elmer 241C*. En cada caso se indica el disolvente y la concentración c (g/mL) utilizados.

Espectroscopía de UV-Visible y Dicroísmo Circular (DC).

Los espectros de UV-Visible fueron registrados en un espectrómetro *Hewlett Packard 8453 JASCO Tipo U-best 560*. Los espectros de dicroísmo circular fueron recogidos en un espectropolarímetro *JASCO Tipo J-710*. Las muestras fueron disueltas en THF o CHCl_3 .

Fotoisomerización de los azocompuestos

Para los experimentos de DC y de UV/Vis, la fotoisomerización de los azocompuestos fue llevada a cabo a 20 °C irradiando las disoluciones de azocompuesto contenidas en una cubeta de cuarzo termostática de 0.1 cm, con una lámpara de Xe de 150 W del dicrógrafo.

Para los experimentos de HPLC y RMN la fotoisomerización se llevó a cabo irradiando con una lámpara de Hg de 400 W de alta presión. Para seleccionar las longitudes de onda se utilizaron filtros de interferencia (*Oriel*) de 365 nm, 436 nm y 546 nm. Los estados fotoestacionarios se determinaron monitorizando los cambios de composición con el tiempo, realizando espectros UV a diferentes intervalos hasta que no se observaron cambios en la

proporción relativa de isómeros. La proporción *trans/cis* de los isómeros medida en HPLC se realizó utilizando como punto isobéptico 210 nm.

2. 4. 2. DISOLVENTES, REACTIVOS Y CONDICIONES DE REACCIÓN.

Disolventes

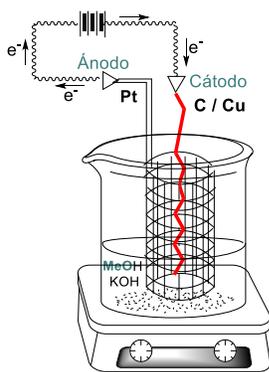
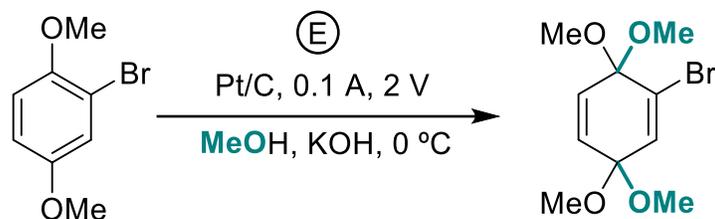
Los disolventes anhidros utilizados (CH₃CN, THF, MeOH y Et₂O) se secaron y almacenaron sobre tamiz molecular de 3 ó 4 Å. Previamente el tamiz molecular se activó en un horno de microondas (500 W, 2 min) y se secó a presión reducida, repitiendo este proceso dos veces. Dichos disolventes se dejaron reposar en presencia del tamiz activado durante dos semanas antes de su utilización.

Reactivos

Los reactivos comerciales utilizados provienen de la marca *Aldrich, Fluka, Acros o Fluorochem*.

2. 4. 3. MÉTODOS DE SÍNTESIS.

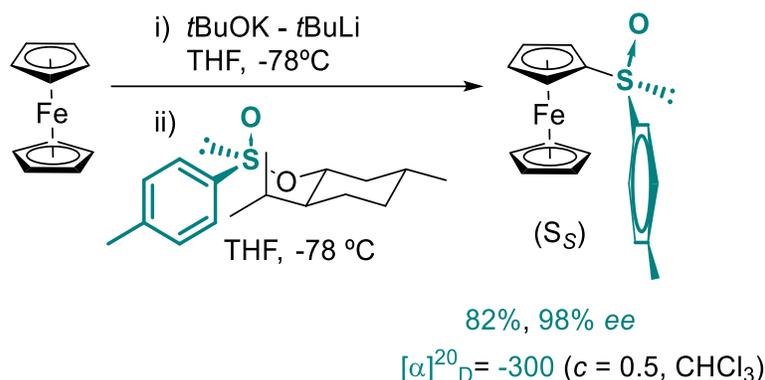
Síntesis del 1-bromo-3,3,6,6-tetrametoxiciclohexa-1,4-dieno (8a)^[ref].



El 1-bromo-3,3,6,6-tetrametoxiciclohexa-1,4-dieno **8a** se obtiene a partir del 1-bromo-2,5-dimetoxibenceno **32** a través de una oxidación anódica, la cual se lleva a cabo en una celda electrolítica sencilla utilizando como ánodo una malla cilíndrica de platino (diámetro 5 cm x 5cm), como cátodo una barra de grafito, con un potenciostato AMEL modelo 549, manteniendo la diferencia de potencial en 2 V a temperatura ambiente. El compuesto **32** (10 g, 7.0 ml, 46.1 mmol) se disuelve en metanol (200 ml) y sobre la disolución resultante se va añadiendo hidróxido sódico sólido hasta que se observa que el amperímetro indica una intensidad de corriente de 0.1 A. El paso de corriente se mantiene constante hasta que se observa la desaparición total del sustrato de partida. Una vez acabada la reacción, el disolvente se elimina *in vacuo*. El residuo que se obtiene se disuelve en pentano caliente y se filtra despreciando un residuo insoluble que queda en el fondo. La disolución de pentano se enfría en un baño de hielo y se filtra el sólido resultante. Este proceso se repite con las aguas madre. La totalidad del sólido obtenido se recristaliza en éter de petróleo, obteniéndose así el bisacetal **8a** como un sólido cristalino blanco con un 76% de rendimiento (18.6 g, 93 mmol).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.67 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.30 (dd, *J* = 10.5 y 2.6 Hz, 1H), 5.97 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 3.32 (s, 6H), 3.22 (d, *J* = 0.7 Hz, 6H).

Síntesis del (*S_s*)-2-(*p*-tolil-sufinil)ferroceno (22)^[ref].

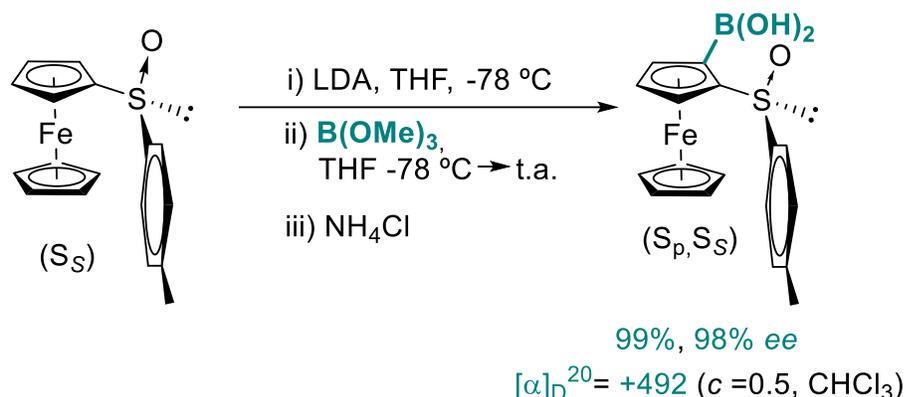


En un matraz de 500 ml equipado con un imán, se añade el ferroceno (4.00 g, 21.5 mmol) y el *tert*-butoxido de potasio (0.294 g, 2.58 mmol). El matraz se deja en atmosfera inerte hacienda ciclos de vacio-argon 3 veces antes de añadir 180 ml de THF anhidro. La disolución se enfría a -78 °C y sobre ella se añade el *tert*-butillitio 1.7 M en pentano (25.3 ml, 43.0 mmol) gota a gota durante 40 min. La reacción se deja agitando a -78 °C durante 1.5 h y a temperatura ambiente durante 1 h. Tras ese periodo de tiempo, la reacción se enfría nuevamente a -78 °C y sobre ella se añade gota a gota vía cánula, una disolución de (1*R*,3*R*,4*S*)-Mentil-(*SS*)-*p*-toluensulfinato en 110 ml de THF anhidro durante 50 min. Después de 1 h agitando a -78 °C, se añade agua a la reacción, la disolución resultante se extrae con dietileter, se separan las fases, la fase orgánica se seca sobre MgSO_4 anhidro y se elimina el exceso de disolvente a vacio. Finalmente, el (*S_s*)-2-(*p*-tolil-sufinil)ferroceno se obtiene como un polvo amarillo, con un rendimiento del 80 % y un 98 % de *ee* (5.6 g, 17.2 mmol) tras purificación en columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla de heptano/Acetato de-Etilo 3/1.

$[\alpha]_D^{20} = -305$ ($c = 0.5$, CHCl_3).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.52$ (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.61 (dt, $J = 1.5$ y 2.3 Hz, 1H), 4.39 - 4.35 (s+m, 7H), 4.33 - 4.31 (m, 1H), 2.37 (s, 3H).

Síntesis del ácido (S_p, S_s)-2-(*p*-tolil-sufinil)ferrocenil borónico (23)^[ref].

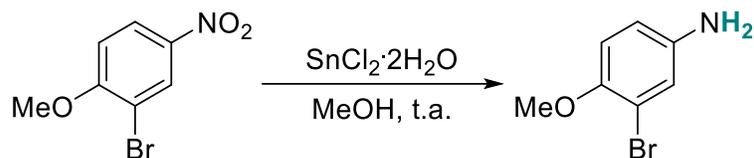


En un matraz de 250 ml equipado con un imán, se añade el (S_s)-2-(*p*-tolil-sufinil)ferroceno (4.1 g, 12.6 mmol). El matraz se deja en atmosfera inerte hacienda ciclos de vacío-argon 3 veces antes de añadir 130 ml de THF anhidro. La disolución resultante se enfría a -78 °C y sobre ella se añade, gota a gota via canula, una disolución de LDA (5.6 ml, 13.9 mmol de *n*BuLi 2.5 M y 1.96 ml, 13.9 mmol de diisopropilamina) en THF (10 ml). La reacción se agita 30 min a -78 °C antes de añadir el $B(OMe)_3$ (4.4 mL, 39.2 mmol) y tras otros 30 min de agitación a dicha temperatura, se añaden otros 2.2 ml (19.6 mmol) de $B(OMe)_3$. Después de 1 h de agitación a -78 °C, la disolución resultante se deja calentar lentamente a temperatura ambiente antes de diluirla con CH_2Cl_2 (100 ml). Sobre la reacción se añade una disolución saturada de NH_4Cl (aq), se separan las fases, la fase orgánica se lava con una disolución de salmuera, la fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 , el combinado de fases orgánicas se seca sobre $MgSO_4$ anhidro y se elimina el exceso de disolvente *in vacuo*. Finalmente, el ácido (S_p, S_s)-2-(*p*-tolil-sufinil)ferrocenil borónico se obtiene como un polvo amarillo, con un rendimiento del 99 % y un 98 % de ee (5.6 g, 17.2 mmol) sin necesidad de una purificación adicional.

$[\alpha]_D^{20} = +492$ (c = 0.50, $CHCl_3$).

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.38 (d, J = 8.5, 2H), 7.19 (d, J = 8.5, 2H), 6.92 (bs, 2H), 4.84 (m, 1H), 4.69 (m, 1H), 4.62 (m, 1H), 4.46 (s, 5H), 2.35 (s, 3H).

3-Bromo-4-metoxianilina (30).



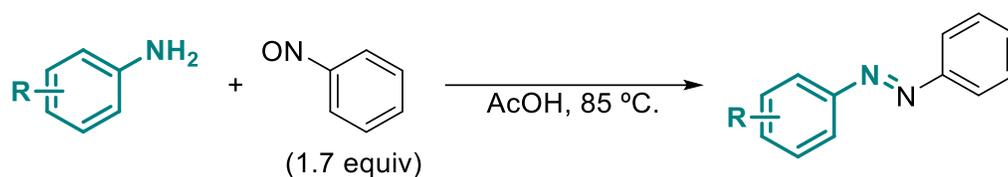
Sobre una disolución de 2-bromo-1-metoxi-4-nitrobenceno (2.50 g, 10.8 mmol) en MeOH (30 mL) se añade SnCl₂·2H₂O (12.2 g, 53.9 mmol) y deja agitar 3 h a temperatura ambiente. Tras ese periodo de tiempo, se añade sobre la mezcla de reacción H₂O (100 mL) y AcOEt (100 mL) dando lugar a la formación de una emulsión espesa. Sobre esta emulsión se añade una disolución saturada de NaHCO₃ aq (30 ml), se separan las fases, la fase acuosa se extrae con AcOEt (3 x 30 ml), el combinado de fases orgánicas se seca sobre MgSO₄ anhidro y se elimina el exceso de disolvente *in vacuo*. Finalmente, la 3-bromo-4-metoxianilina **30** se obtiene, como un sólido blanquecino, con un rendimiento del 64% (2.g, 8.7 mmol) sin necesidad de una purificación adicional.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.89 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.57 (dd, *J* = 8.6 y 2.6 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.46 (s, 2H).

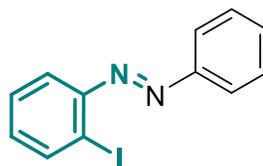
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 148.83, 141.02, 120.05, 114.91, 113.64, 112.14, 56.82.

2. 4. 3. 1. PROCEDIMIENTOS GENERALES

Procedimiento general A para la síntesis de haloazobencenos a través de la reacción de Mills.



La correspondiente arilamina (1.0 equiv) y el nitrosobenzene (1.7 equiv) se disuelven en AcOH (0.1 M). La mezcla resultante se agita a 85 °C (tiempo indicado en cada caso). Cuando se observa la desaparición total del producto de partida, la mezcla de reacción se diluye con AcOEt, se lava con agua (3 veces) y con una disolución de salmuera (3 veces), la fase acuosa se extrae con AcOEt, el combinado de fases orgánicas se seca sobre MgSO₄ anhidro y se elimina el exceso de disolvente *in vacuo*. Finalmente, el residuo resultante se purifica en columna cromatográfica usando como eluyente Hexano, obteniéndose así el producto deseado.

Síntesis del 3-iodoazobenceno (27a)^[ref].

Siguiendo el procedimiento general A (72 h), usando 2-iodoanilina 28 (357 mg, 1.7 mmol) y nitrosobenceno 29 (330 mg, 2.9 mmol), se obtiene el compuesto 27a como un sólido anaranjado con un rendimiento del 95 % (498 mg) tras purificación en columna Hexano/AcOEt-9:1.

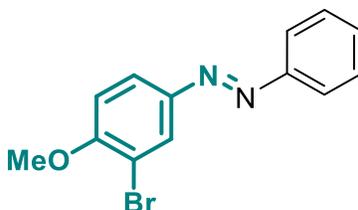
p.f.: 57-59 °C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.09 – 7.96 (m, 2H), 7.64 (dd, *J* = 8.0 y 1.6 Hz, 1H), 7.59 – 7.48 (m, 3H), 7.43 (td, *J* = 7.7 y 1.6 Hz, 1H), 7.17 (td, *J* = 7.7 y 1.6 Hz, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 152.2, 151.2, 139.7, 132.1, 131.5, 129.1 (2C), 128.8, 123.5 (2C), 117.3, 102.5.

EMAR (IE): Calculada para C₁₂H₉IN₂ (M⁺): 307.9811; encontrada: 307.9804.

Síntesis del 4-methoxy-3-bromoazobenzene (27b)



Siguiendo el procedimiento general A (18 h), usando 3-bromo-4-metoxianilina 30 (250 mg, 1.24 mmol) y nitrosobenceno 29 (225 mg, 2.1 mmol), se obtiene el compuesto 27b como un sólido anaranjado con un rendimiento del 95 % (342 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-9/1.

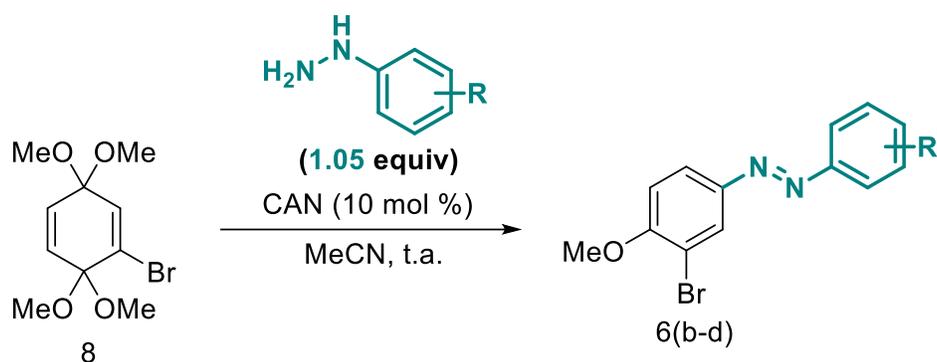
p.f.: 68-70 °C

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.20 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.93 (dd, *J* = 8.7 y 2.4 Hz, 1H), 7.91 – 7.86 (m, 2H), 7.50 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H), 7.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.98 (s, 3H).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ = 157.9, 152.5, 147.1, 130.9, 129.2 (2C), 126.2, 125.9, 122.9 (2C), 112.7, 111.4, 56.5.

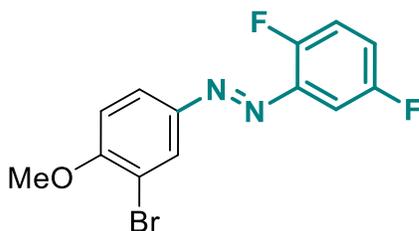
EMAR (IE): Calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}$ (M^+): 290.0055; encontrada: 290.0064.

Procedimiento general B para la síntesis lo 3-bromo-4-metoxi-azobencenos.



Sobre una disolución de 1-bromo-3,3,6,6-tetrametoxiciclohexa-1,4-dieno (1 equiv) en CH_3CN (0.1 M), se añade la correspondiente arilhidracina **11a-f** (1.05 equiv) y el $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ (CAN) (10 % mol). La mezcla resultante se deja agitando a temperatura ambiente durante 2-3 h. Tras ese periodo de tiempo, se añade agua sobre la reacción, se separan las fases, la fase acuosa se extrae con AcOEt (3 veces), el combinado de fases orgánicas se seca sobre MgSO_4 anhidro y se elimina el exceso de disolvente *in vacuo*. Finalmente, el residuo resultante se purifica en columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla de Hexano/ AcOEt -5/1, obteniéndose así el producto deseado como un sólido naranja.

2',5'-Difluoro-4-methoxy-3-bromoazobenzene (27c).



Siguiendo el [procedimiento general B](#), usando 1-bromo-3,3,6,6-tetrametoxiciclohexa-1,4-dieno [8a](#) (500 mg, 1.79 mmol), 2,5-difluorofenilhidracina [11a](#) (215 mg, 1.9 mmol) y CAN (103 mg, 0.18 mmol), se obtiene el compuesto [27c](#) como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 98% (574 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-5/1.

p.f.: 106-109 °C

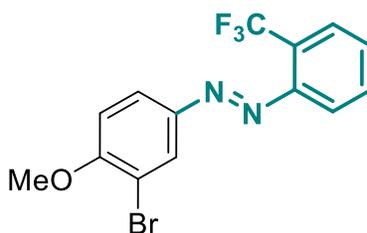
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.20 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.7 y 2.3 Hz, 1H), 7.51–7.38 (m, 1H), 7.25–7.17 (m, 1H), 7.18 – 7.08 (m, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.5, 158.7, 147.1, 140.8, 126.5 (d, *J* = 31.1 Hz), 118.7 (d, *J* = 8.2 Hz), 118.4 (d, *J* = 8.2 Hz), 118.1 (d, *J* = 8.6 Hz), 117.8 (d, *J* = 8.6 Hz), 112.8, 111.4, 104.0 (d, *J* = 25.2 Hz), 56.6.

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -117.29 (d, *J* = 16.3 Hz), -129.34 (d, *J* = 16.3 Hz).

EMAR (IE): Calculada para C₁₃H₉BrF₂N₂O (M⁺): 325.9866; encontrada: 325.9870.

2'-Trifluorometil-4-metoxi-3-bromoazobenceno (27d).



Siguiendo el [procedimiento general B](#), usando 1-bromo-3,3,6,6-tetrametoxiciclohexa-1,4-dieno [8a](#) (400 mg, 1.43 mmol), 4-trifluorometilfenilhidracina [11b](#) (265 mg, 1.5 mmol) y CAN (77 mg, 0.14 mmol), se obtiene el compuesto [27d](#) como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 95% (488 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-5/1.

p.f.: 62-64 °C

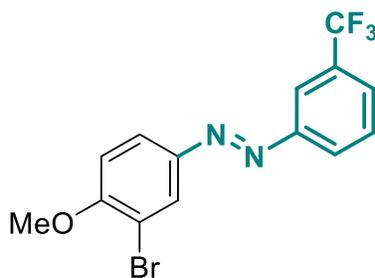
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.20 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.7 y 2.3 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.64 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 158.7, 149.4, 147.3, 132.5, 130.2, 127.8, 126.5, 125.6, 116.2, 112.7, 111.4, 56.5.

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -57.51 (s).

EMAR (IE): Calculada para C₁₄H₁₀BrF₃N₂O (M⁺): 357.9929; encontrada: 357.9923.

3'-Trifluorometil-4-metoxi-3-bromoazobenceno (27e).



Siguiendo el [procedimiento general B](#), usando 1-bromo-3,3,6,6-tetrametoxiciclohexa-1,4-dieno [8a](#) (400 mg, 1.43 mmol), 4-trifluorometilfenilhidracina [11c](#) (265 mg, 1.5 mmol) y CAN (77 mg, 0.14 mmol), se obtiene el compuesto [27e](#) como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 96% (493 mg) tras purificación en columna empleando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt-5/1.

p.f.: 62-64 °C;

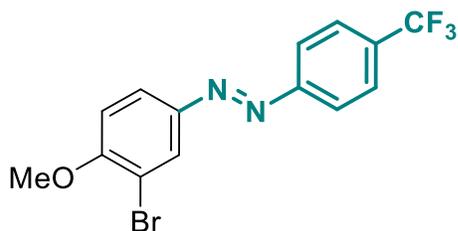
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.21 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.97 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.63 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 158.5, 152.4, 146.8, 131.5 (d, *J* = 32.0 Hz), 129.5 (d, *J* = 28.1 Hz), 127.0 (q, *J* = 3.9 Hz), 126.3, 126.2 (2C), 123.9 (q, *J* = 272.4 Hz), 119.3 (q, *J* = 3.9 Hz), 112.8, 111.4, 56.6.

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -62.68 (s).

EMAR (IE): Calculada para C₁₄H₁₀BrF₃N₂O (M⁺): 357.9929; encontrada: 357.9927.

4'-Trifluorometil-4-metoxi-3-bromoazobenceno (27f).



Siguiendo el [procedimiento general B](#), usando 1-bromo-3,3,6,6-tetrametoxiciclohexa-1,4-dieno [8a](#) (400 mg, 1.43 mmol), 4-trifluorometilfenilhidracina [11d](#) (265 mg, 1.5 mmol) y CAN (77 mg, 0.14 mmol), se obtiene el compuesto [27f](#) como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 93% (478 mg), tras purificación en columna empleando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt-5/1.

p.f.: 65-67 °C

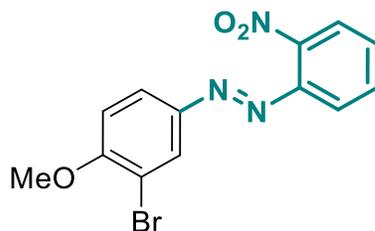
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.21 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.77 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 158.6, 154.2, 146.9, 132.2, 131.8, 126.4, 126.3, 126.3 (q, J = 3.8 Hz), 123.9 (q, J = 272.5 Hz), 122.88 (2C), 112.8, 111.3, 56.6.

$^{19}\text{F-RMN}$ (282 MHz, CDCl_3): δ = -62.52 (s).

EMAR (IE): Calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrF}_3\text{N}_2\text{O}$ (M^+): 357.9929; encontrada: 357.9938.

2'-Nitro-4-metoxi-3-bromoazobenzene (27g).



Siguiendo el [procedimiento general B](#), usando 1-bromo-3,3,6,6-tetrametoxiciclohexa-1,4-dieno [8a](#) (250 mg, 0.9 mmol), 2-nitrofenilhidracina [11e](#) (144 mg, 0.94 mmol) y CAN (49 mg, 0.09 mmol), se obtiene el compuesto [27g](#) como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 91% (275 mg) tras purificación en columna Hexano/AcOEt-5/1.

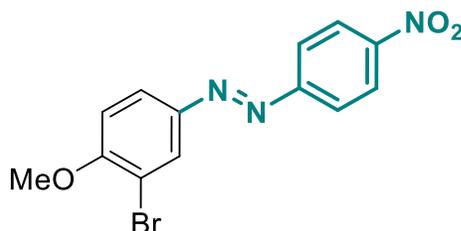
p.f.: 115-117 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.16 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.72–7.62 (m, 2H), 7.60-7.50 (m, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 158.9, 147.3, 146.8, 145.0, 132.9, 130.2, 127.3, 126.1, 123.9, 118.4, 112.6, 111.3, 56.1.

EMAR (IE): Calculada para C₁₃H₁₀BrN₃O₃ (M⁺): 334.9906; encontrada: 334.9889.

4'-Nitro-4-methoxy-3-bromoazobenzene (27h).



Siguiendo el [procedimiento general B](#), usando 1-bromo-3,3,6,6-tetrametoxiciclohexa-1,4-dieno [8a](#) (250 mg, 0.9 mmol), 4-nitrofenilhidracina [11f](#) (144 mg, 0.94 mmol) y CAN (49 mg, 0.09 mmol), se obtiene el compuesto [27h](#) como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 90% (272 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-371.

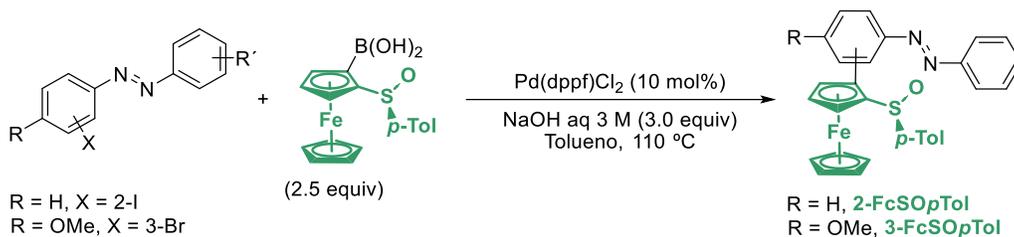
p.f.: 170-172 °C;

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.37 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.23 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.9 Hz, 3H), 7.06 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 159.1, 155.6, 148.6, 146.9, 126.9, 126.5, 124.7 (2C), 123.2 (2C), 112.9, 111.4, 56.7.

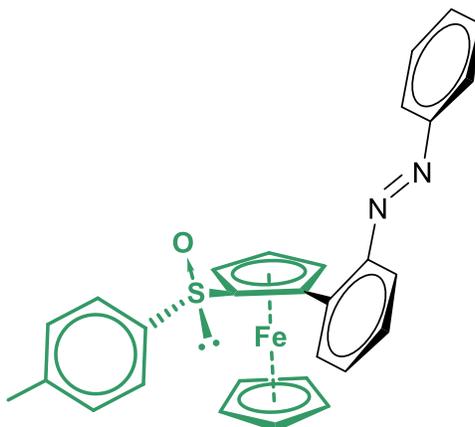
EMAR (IE): Calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrN}_3\text{O}_3$ (M^+): 334.9906; encontrada: 334.9905.

Procedimiento general C para la síntesis de ferrocenil azobencenos.



El correspondiente 3-bromo-5-metoxiazobenceno (**27a-h**) (1.0 equiv), el correspondiente ácido borónico **23** (2.5 equiv) y el Pd(dppf)Cl₂ (10 mol%) se añaden en un tubo de microondas previamente secado en el horno. El tubo se sella y se deja en atmósfera inerte haciendo ciclos de vacío-argón 3 veces antes de añadir el tolueno desgasificado (0.1 M) y una disolución acuosa desgasificada de NaOH (3.0 equiv, 3.0 M). La disolución resultante se deja agitando 18 h a 110 °C. Tras de ese periodo de tiempo, la reacción se diluye en AcOEt, se lava con agua y salmuera y se separan las fases. La fase acuosa se extrae con AcOEt (3 veces), el combinado de fases orgánicas se seca sobre MgSO₄ anhidro y se elimina el exceso de disolvente *in vacuo*. Finalmente, el residuo resultante se purifica en columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt-3/1, obteniéndose así el producto deseado como un sólido naranja.

Síntesis del (S_{Fc}, S_s)-2-(*p*-Tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno (33a).



Siguiendo el [procedimiento general C](#), usando 2-iodoazobenceno [27a](#) (150 mg, 0.49 mmol), ácido (S_p, S_s)-2-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenil borónico [23](#) (361 mg, 0.98 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (36 mg, 0.05 mmol), y NaOH (aq, 3.0 M) (0.49 ml, 1.47 mmol), se obtiene el compuesto [33a](#) como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 69% (171 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-3/1.

p.f.: 71-74 °C;

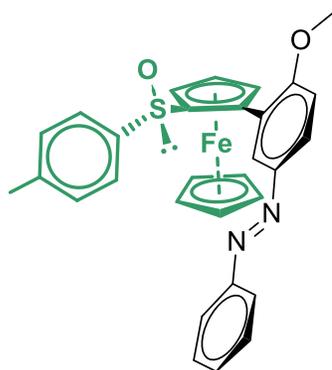
$[\alpha]_{20}^D = + 340$ ($c = 0.005$, CHCl₃)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.35$ (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.70 (dd, $J = 7.8$ y 2.2 Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.52 – 7.49 (m, 4H), 7.47 – 7.43 (m, 4H), 7.08 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.64 (dd, $J = 2.6$ y 1.5 Hz, 1H), 4.50 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.41 (dd, $J = 2.6$ y 1.5 Hz, 1H), 4.26 (s, 5H), 2.28 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 152.6, 150.9, 140.4$ (2C), 134.8, 134.2, 130.7, 129.9, 128.8 (4C), 127.8, 124.7 (2C), 123.1 (2C), 115.1, 95.1, 85.6, 75.5, 70.9 (5C), 69.4, 68.8, 21.2.

EMAR (BAR) Calculada para C₂₉H₂₅N₂OS (M+H): 505.1037; encontrada: 505.1049.

(S_{Fc} , S_s)-4-Metoxi-3-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno (33b).



Siguiendo el **procedimiento general C**, usando 3-bromo-4-metoxiazobenceno **27** (300 mg, 1.0 mmol), ácido (S_p , S_s)-2-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenil borónico **23** (759 mg, 2.0 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (74 mg, 0.1 mmol), y NaOH (aq, 3.0 M) (1.0 ml, 3.1 mmol), se obtiene el compuesto **33** como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 72% (396 mg). tras purificación en columna hexano/AcOEt-3/1.

p.f.: 80-84 °C.

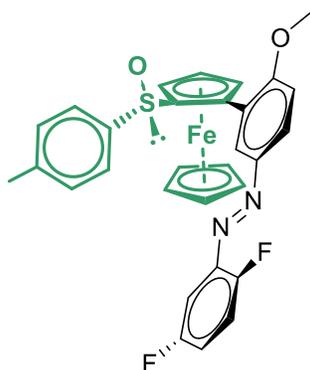
$[\alpha]_{20}^D = -518$ ($c = 0.005$, CHCl₃)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.55$ (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.07 – 7.85 (m, 3H), 7.73 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.53 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 7.32 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.76 (s, 1H), 4.47 (s, 1H), 4.27 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 4.17 (s, 5H), 3.84 (s, 3H), 2.44 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 159.6$, 152.6, 145.9, 140.8, 140.7, 130.2, 128.9 (2C), 128.8 (2C), 127.9, 125.2 (2C), 124.2, 122.5 (2C), 110.6, 94.1, 85.0, 73.4, 70.8 (5C), 68.9, 67.7, 55.5, 21.2.

EMAR (BAR): Calculada para C₃₀H₂₇N₂O₂S (M+H): 535.1143; encontrada: 535.1138.

(S_{Fc} , S_S)-2',5'-Difluoro-4-metoxi-3-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno (**33c**).



Seguendo el procedimiento general C, usando 2',5'-difluoro-3-bromo-4-metoxizobenceno (400 mg, 1.22 mmol), ácido (S_p , S_S)-2-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenil borónico (899 mg, 2.44 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (90 mg, 0.12 mmol), y NaOH (aq, 3.0 M) (1.2 ml, 3.7 mmol), se obtiene el compuesto **33c** como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 73% (508 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-3/1.

p.f.: 87-92 °C.

[α]_D²⁰ = - 667 (*c* = 0.00125, CHCl₃).

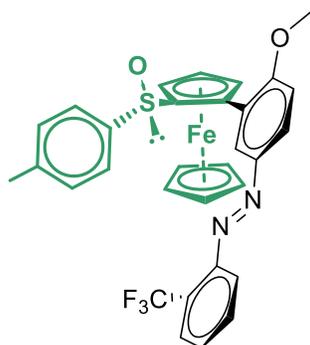
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.60 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.64 – 7.48 (m, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.29 – 7.18 (m, 1H), 7.17 – 7.06 (m, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.75 (dd, *J* = 2.6 y 1.4 Hz, 1H), 4.47 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.31 (dd, *J* = 2.6 y 1.4 Hz, 1H), 4.13 (s, 5H), 3.82 (s, 3H), 2.43 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.3, 158.5 (d, *J* = 244.7 Hz), 156.0 (d, *J* = 253.0 Hz), 145.8, 140.8 (2C), 128.9 (2C), 127.8, 125.6, 125.0 (2C), 124.4, 118.9 - 116.5 (m, 2C), 110.4, 103.7, 103.4, 94.5, 84.9, 73.2, 70.8 (5C), 69.0, 67.4, 55.4, 21.1.

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -117.5 (d), -129.6 (d).

EMAR (BAR) Calculada para C₃₀H₂₄F₂FeN₂O₂S (M⁺): 570.0876; encontrada: 570.0884.

(S_{FC} , S_S)-2'-Trifluorometil-4-metoxi-3-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno (**33d**).



Siguiendo el [procedimiento general B](#), usando 2'-trifluorometil-3-bromo-4-metoxizobenceno (500 mg, 1.4 mmol), ácido (S_p , S_S)-2-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenil borónico (1.03 g, 2.8 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (103 mg, 0.14 mmol), y NaOH (aq, 3.0 M) (1.4 ml, 4.2 mmol), se obtiene el compuesto **33d** como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 71% (599 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-3/1.

p.f.: 85-89 °C.

[α]_D²⁰ = - 700 (*c* = 0.005, CHCl₃).

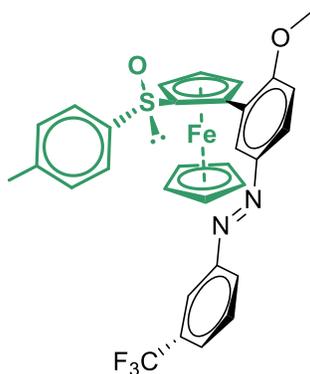
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.64 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.6 y 2.3 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.67 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 6.99 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.74 (dd, *J* = 2.6 y 1.4 Hz, 1H), 4.46 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.21 (dd, *J* = 2.6 y 1.4 Hz, 1H), 4.16 (s, 5H), 3.82 (s, 3H), 2.44 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.5, 149.3, 145.9, 140.8, 140.3, 132.3, 129.5, 128.9 (2C), 128.7, 126.0, 125.0 (2C), 124.8, 124.5, 115.9, 110.3, 94.37, 85.1, 73.4, 70.6 (5C), 68.9, 66.9, 55.4, 21.1

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -57.17 (s).

EMAR (BAR) Calculada para C₃₁H₂₅F₃FeN₂O₂S (M⁺): 602.0938; encontrada: 602.0922.

(*S*_{FC}, *S*_S)-3'-Trifluorometil-4-metoxi-3-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno (33e).



Seguendo el procedimiento general C, usando 3'-trifluorometil-3-bromo-4-metoxizobenceno (150 mg, 0.42 mmol), el ácido (*S*_p, *S*_s)-2-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenil borónico (309 mg, 0.84 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (31 mg, 0.042 mmol), y NaOH (aq, 3.0 M) (0.42 ml, 1.26 mmol), se obtiene el compuesto 33e como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 75% (190 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-3/1.

p.f.: °C.

[α]_D²⁰ = - (c = 0.005, CHCl₃).

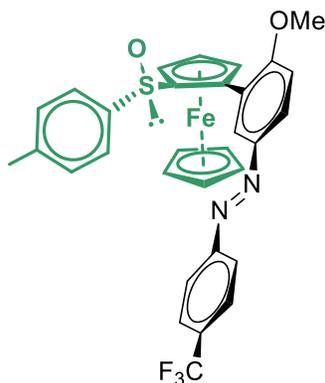
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.57 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.13 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.95 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 7.73 – 7.61 (m, *J* = 8.1 Hz, 4H), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.76 (m, 1H), 4.47 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.19 (s, 5H), 3.84 (s, 3H), 2.43 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.2, 152.6, 145.82, 140.9, 140.7, 131.4 (q, *J* = 30.9 Hz), 129.5, 129.1 (2C), 128.2, 126.4, 125.9, 125.2 (2C), 124.7, 124.5, 123.8 (q, *J* = 270.3 Hz), 119.3, 110.7, 94.1, 85.2, 73.5, 70.9 (5C), 69.1, 68.0, 55.6, 21.3.

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -62.42 (s).

EMAR (MALDI) Calculada para C₃₁H₂₅F₃FeN₂O₂S (M⁺): 602.0933; encontrada 602.0948.

(S_{FC} , S_S)-4'-Trifluorometil-4-metoxi-3-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno (33f).



Seguindo el procedimiento general C, usando 4'-trifluorometil-3-bromo-4-metoxizobenceno (150 mg, 0.42 mmol), ácido (S_p , S_S)-2-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenil borónico (309 mg, 0.84 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (31 mg, 0.04 mmol), y NaOH (aq, 3.0 M) (0.42 ml, 1.26 mmol), se obtiene el compuesto 33f como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 82% (207 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-3/1.

p.f.: °C

$[\alpha]_{20}^D = -$ ($c = 0.005$, CHCl₃).

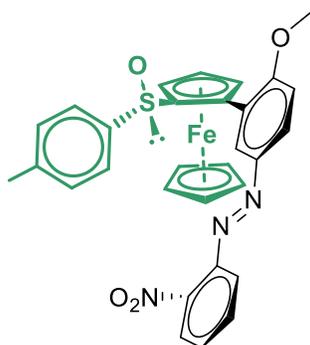
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.59 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.95 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.69 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.76 (dd, $J = 3.0, 1.5$ Hz, 1H), 4.47 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H), 4.26 (dd, $J = 3.0, 1.5$ Hz, 1H), 4.19 (s, 5H), 3.84 (s, 3H), 2.43 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.4, 154.7, 146.1, 141.0, 140.8, 131.5 (q, $J = 32.5$ Hz), 129.1 (2C), 128.5, 126.1 (q, $J = 3.7$ Hz), 125.3 (2C), 124.8, 124.6, 124.0 (q, $J = 272.50$ Hz), 122.8 (2C), 110.7, 94.4, 85.3, 73.5, 71.0 (5C), 69.1, 68.2, 55.7, 21.34.

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -62.36 (s).

EMAR (MALDI) Calculada para C₃₁H₂₅F₃FeN₂O₂S (M⁺): 602.0933; encontrada 602.0934.

(S_{FC}, S_S)-2'-Nitro-4-metoxi-3-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenceno (33g).



Siguiendo el [procedimiento general C](#), usando 2'-nitro-3-bromo-4-metoxizobenceno (300 mg, 0.9 mmol), ácido (S_p, S_S)-2-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenil borónico (656 mg, 1.8 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (66 mg, 0.09 mmol), y NaOH (aq, 3.0 M) (0.9 ml, 2.7 mmol), se obtiene el compuesto **33g** como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 75% (387 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-3/1.

p.f.: 93-99 °C.

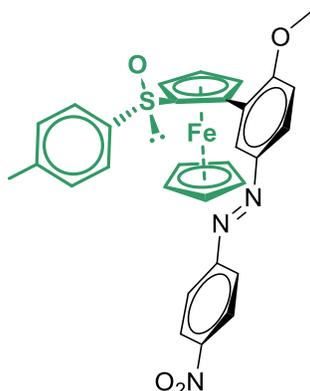
[α]_D²⁰ = - 700 ($c = 0.005$, CHCl₃).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.60$ (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.82 (dd, $J = 8.0$ y 1.3 Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.70 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.56 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.76 (dd, $J = 2.6$ y 1.4 Hz, 1H), 4.47 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.24 (dd, $J = 2.6$ y 1.4 Hz, 1H), 4.13 (s, 5H), 3.83 (s, 3H), 2.45 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 161.0, 148.1, 146.1, 145.1, 141.1, 140.8, 132.8, 129.9, 129.1$ (2C), 127.8, 126.7, 125.4 (2C), 124.9, 123.7, 118.0, 110.6, 94.8, 85.1, 73.5, 71.1 (5C), 69.2, 67.3, 56.8, 21.4.

EMAR (BAR): Calculada para C₃₀H₂₅FeN₃O₄S (M⁺): 579.0915; encontrada: 579.0916.

(S_{FC}, S_S)-4'-Nitro-4-metoxi-3-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenilazobenzene (33h).



Siguiendo el [procedimiento general C](#), usando 2'-nitro-3-bromo-4-metoxizobenceno [27h](#) (300 mg, 0.9 mmol), ácido (S_p, S_s)-2-(*p*-tolil-sulfinil)ferrocenil borónico [23](#) (656 mg, 1.8 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (66 mg, 0.09 mmol), y NaOH (aq, 3.0 M) (0.9 ml, 2.7 mmol), se obtiene el compuesto [33h](#) como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 73% (376 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-3/1.

p.f.: 93-97 °C.

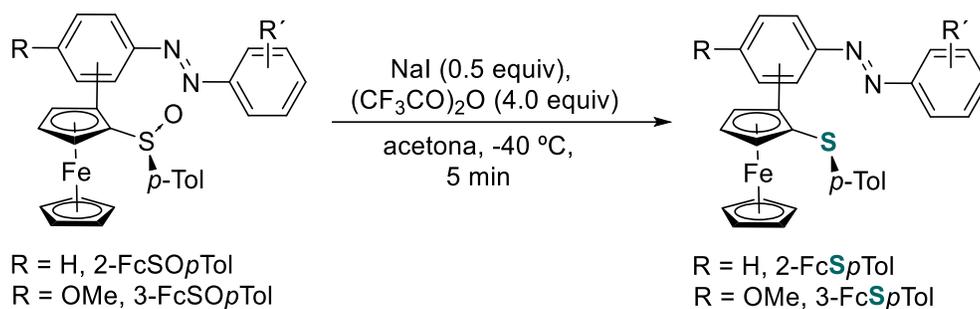
$[\alpha]_D^{20} = -580$ ($c = 0.002$, CHCl₃).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.64$ (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.39 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.06 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.98 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 4.76 (dd, $J = 2.6$ y 1.4 Hz, 1H), 4.48 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.27 (dd, $J = 2.6$ y 1.4 Hz, 1H), 4.22 (s, 5H), 3.8 (s, 3H), 2.44 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 161.0, 156.1, 148.3, 146.2, 141.1, 140.8, 129.2$ (2C), 128.9, 125.3 (2C), 125.2, 124.9, 124.7 (2C), 123.3 (2C), 110.8, 94.4, 85.2, 73.7, 71.1 (5C), 69.2, 68.4, 55.8, 21.5.

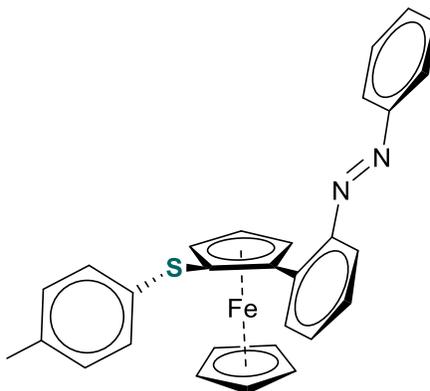
EMAR (BAR) Calculada para C₃₀H₂₅FeN₃O₄S (M⁺): 579.0915; encontrada: 579.0914.

Procedimiento general D para la síntesis de (*p*-tolil-sulfenil)ferrocenil azobencenos []



Sobre una disolución del correspondiente ($S_{\text{Fc}}, S_{\text{S}}$)-2-(*p*-Tolil-sulfenil)ferrocenilazobenceno **33** (1 equiv) y yoduro sódico (0.5 equiv) en acetona (0.075 M) a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, se añade el anhídrido trifluoroacético (4.0 equiv) y se deja agitando durante 5 min. Tras ese periodo de tiempo, se añade sobre la reacción una disolución saturada de Na_2SO_3 aq y otra de NaHCO_3 aq. Sobre la mezcla resultante se añade CH_2Cl_2 y se separan las fases. La fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 (3 veces), el combinado de fases orgánicas se seca sobre MgSO_4 anhidro y se elimina el exceso de disolvente *in vacuo*. Finalmente, el residuo resultante se purifica en columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla de hexano/AcOEt-10/1, obteniéndose así el producto deseado **34** como un sólido naranja.

(S_{Fc}, S_s)-2-(*p*-Tolil-sulfenil)ferrocenilazobenceno (34a).



Siguiendo el procedimiento general D, usando (S_p, S_s)-2-(*p*-tolil-sufinil)ferrocenilazobenceno 33a (76 mg, 0.15 mmol), NaI (11 mg, 0.075 mmol) y $(CF_3CO)_2O$ (126 mg, 83 μ l, 0.6 mmol), se obtiene el compuesto 34a como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 98% (51mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-10/1.

p.f.: °C;

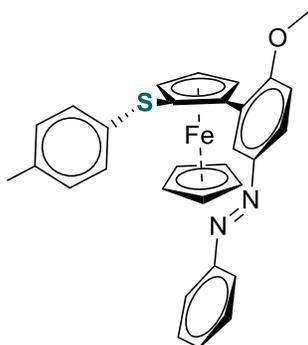
$[\alpha]^{D}_{20} = (c = 0.005, CHCl_3)$

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = \delta$ 8.21 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.48 (m, $J = 16.2, 8.0$ Hz, 5H), 7.38 – 7.28 (m, 1H), 6.88 – 6.67 (m, $J = 8.4$ Hz, 4H), 4.70 – 4.61 (m, 1H), 4.60 – 4.51 (m, 1H), 4.51 – 4.44 (m, $J = 4.9, 2.4$ Hz, 1H), 4.25 (s, 5H), 2.11 (s, 3H).

^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 152.9, 151.4, 136.3, 135.8, 134.5, 133.7, 130.8, 129.6, 129.2$ (2C), 129.1 (2C), 127.5, 126.4 (2C), 123.1 (2C), 115.3, 88.1, 78.6, 75.0, 74.2, 70.9 (5C), 68.8, 20.7.

EMAR (EI) Calculada para $C_{29}H_{25}N_2S$ (M+H): 488.1010; encontrada: 488.0988.

(*S_p*)-4-Metoxi-3-(*p*-tolil-sulfenil)ferrocenilazobenze (34b).



Siguiendo el **procedimiento general D**, usando 4-metoxi-(*S_p*, *S_s*)-3-(*p*-tolil-sufinil)ferrocenilazobenceno **33b** (80 mg, 0.15 mmol), NaI (11 mg, 0.075 mmol) y el (CF₃CO)₂O (126 mg, 83 μ l, 0.6 mmol), se obtiene el compuesto **34b** como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 93% (72 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-10/1.

p.f.: °C;

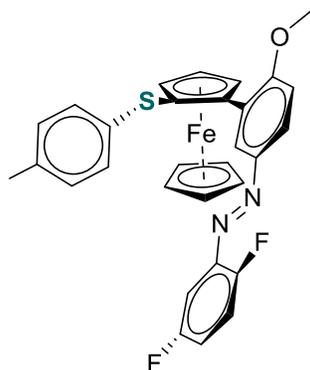
$[\alpha]_D^{20} = -44$ ($c = 0.05$, CHCl₃).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.44$ (d, $J = 2.5$ Hz, 3H), 7.90 – 7.79 (m, 9H), 7.56 – 7.39 (m, 10H), 6.95 (s, 12H), 6.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 3H), 4.75 (s, 3H), 4.60 (s, 3H), 4.49 (d, $J = 3.2$ Hz, 4H), 4.30 (s, 15H), 3.70 (s, 9H), 2.24 (s, 9H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): $\delta =$ ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 159.93, 152.75, 146.11, 137.00, 134.31, 130.19, 129.19, 128.88, 127.25, 126.30, 125.55, 124.36, 122.62, 110.34, 87.79, 75.51, 72.62, 71.36, 71.01, 70.84, 68.85, 55.41, 20.83.

EMAR (IE) Calculada para C₃₀H₂₆FeN₂OS (M⁺): 518.1128; encontrada 518.1115.

(S_{FC})-2',5'-Difluoro-4-metoxi-3-(*p*-tolil-sulfenil)ferrocenilazobenceno (34c).



Siguiendo el **procedimiento general D**, usando 2',5'-difluoro-4-metoxi-(S_p , S_s)-3-(*p*-tolil-sufinil)ferrocenilazobenceno **33c** (86 mg, 0.15 mmol), NaI (11 mg, 0.075 mmol) y $(CF_3CO)_2O$ (126 mg, 83 μ l, 0.6 mmol), se obtiene el compuesto **34c** como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 87% (72 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-10/1.

p.f.: °C.

$[\alpha]_{20}^D = +96$ ($c = 0.005$, $CHCl_3$).

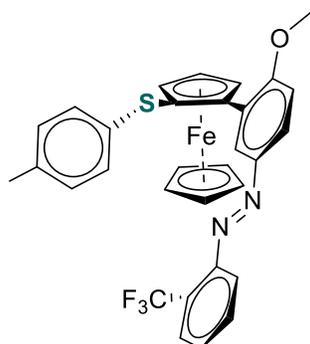
1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.51$ (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.88 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 7.47 (ddd, $J = 9.2, 5.9, 3.2$ Hz, 1H), 7.25 – 7.16 (m, 1H), 7.15 – 7.05 (m, 1H), 6.94 (s, 4H), 6.90 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.72 (dd, $J = 2.6, 1.5$ Hz, 1H), 4.60 (dd, $J = 2.6, 1.5$ Hz, 1H), 4.48 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.30 (s, 5H), 3.67 (s, 3H), 2.23 (s, 3H).

^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 160.7, 158.9$ (dd, $J = 2464.9, 2.8$ Hz), 156.2 (dd, $J = 253.2, 2.8$ Hz), 146.14, 141.24 (dd, $J = 8.8, 6.0$ Hz), 136.8, 134.5, 129.2 (2C), 128.9, 126.5 (2C), 125.8, 124.2, 118.3 – 117.3 (m, 2C), 110.4, 104.31, 104.0, 87.8, 75.4, 72.6, 71.1 (5C), 68.8, 55.5, 20.8.

^{19}F -RMN (282 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -117.65$ (d, $J = 16.3$ Hz), -129.79 (d, $J = 16.4$ Hz).

EMAR (IE) Calculada para $C_{30}H_{24}F_2FeN_2OS$ (M+): 554.0912; encontrada 554.0927.

(*S_{Fc}*)-2'-Trifluorometil-4-Metoxi-3-(*p*-tolil-sulfenil)ferrocenilazobenceno (34d).



Seguendo el [procedimiento general D](#), usando 2'-trifluorometil-4-metoxi-(*S_p*, *S_s*)-3-(*p*-tolil-sufinil)ferrocenilazobenceno [33d](#) (90 mg, 0.15 mmol), NaI (11 mg, 0.075 mmol) y (CF₃CO)₂O (126 mg, 83 μl, 0.6 mmol), se obtiene el compuesto [34d](#) como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 86% (76 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-10/1.

p.f.: °C

[α]^D₂₀ = -15 (c = 0.06, CHCl₃).

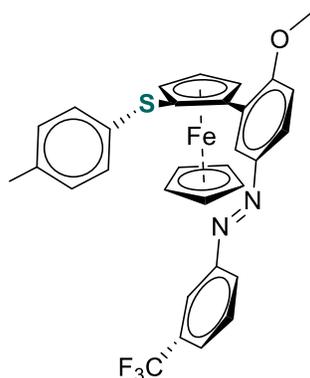
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.61 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.93 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 7.89–7.75 (m, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.65 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.00–6.78 (m, *J* = 7.0 Hz, 5H), 4.69 (dd, *J* = 2.7, 1.5 Hz, 1H), 4.59 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 1H), 4.47 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.32 (s, 5H), 3.60 (s, 3H), 2.21 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = .

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -(s).

EMAR (BAR) Calculada para C₃₁H₂₅F₃FeN₂OS (M⁺): 586.0989; encontrada 586.0984.

(S_{FC})-3'-Trifluorometil-4-Metoxi-3-(*p*-tolyl-sulfenil)ferrocenilazobenze (34e).



Siguiendo el **procedimiento general D**, usando 3'-trifluorometil-4-metoxi-(S_p , S_s)-3-(*p*-tolil-sufinil)ferrocenilazobenceno **33e** (90 mg, 0.15 mmol), NaI (11 mg, 0.075 mmol) y $(CF_3CO)_2O$ (126 mg, 83 μ l, 0.6 mmol), se obtiene el compuesto **34e** como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 93% (82 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-10/1.

p.f.: °C;

$[\alpha]_D^{20} = -44$ ($c = 0.05$, $CHCl_3$).

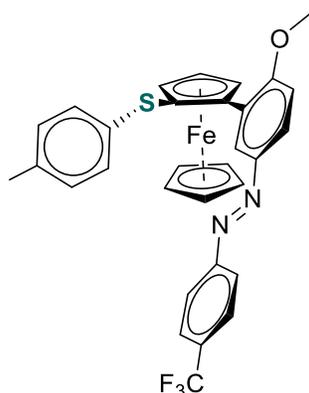
1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.44$ (d, $J = 2.5$ Hz, 3H), 7.90 – 7.79 (m, 9H), 7.56 – 7.39 (m, 10H), 6.95 (s, 12H), 6.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 3H), 4.75 (s, 3H), 4.60 (s, 3H), 4.49 (d, $J = 3.2$ Hz, 4H), 4.30 (s, 15H), 3.70 (s, 9H), 2.24 (s, 9H).

^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta = ^{13}C$ RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ 159.93, 152.75, 146.11, 137.00, 134.31, 130.19, 129.19, 128.88, 127.25, 126.30, 125.55, 124.36, 122.62, 110.34, 87.79, 75.51, 72.62, 71.36, 71.01, 70.84, 68.85, 55.41, 20.83.

^{19}F -RMN (282 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -$ (s).

EMAR (IE) Calculada para $C_{30}H_{26}FeN_2OS$ (M⁺): 518.1128; encontrada 518.1115.

(*S_{Fc}*)-4'-Trifluorometil-4-Metoxi-3-(*p*-tolil-sulfenil)ferrocenilazobenceno (34f).



Siguiendo el [procedimiento general D](#), usando 3'-trifluorometil-4-metoxi-(*S_p*, *S_s*)-3-(*p*-tolil-sufinil)ferrocenilazobenceno [33f](#) (90 mg, 0.15 mmol), NaI (11 mg, 0.075 mmol) y (CF₃CO)₂O (126 mg, 83 μl, 0.6 mmol), se obtiene el compuesto [34f](#) como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 93% (82 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-10/1.

p.f.: °C;

[α]^D₂₀ = -44 (*c* = 0.05, CHCl₃).

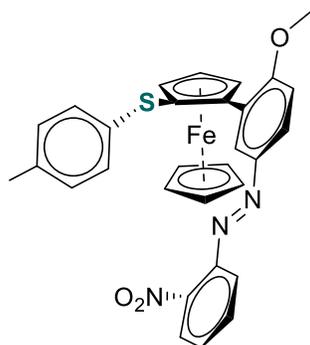
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.44 (d, *J* = 2.5 Hz, 3H), 7.90 – 7.79 (m, 9H), 7.56 – 7.39 (m, 10H), 6.95 (s, 12H), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 3H), 4.75 (s, 3H), 4.60 (s, 3H), 4.49 (d, *J* = 3.2 Hz, 4H), 4.30 (s, 15H), 3.70 (s, 9H), 2.24 (s, 9H).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = - (s).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 159.93, 152.75, 146.11, 137.00, 134.31, 130.19, 129.19, 128.88, 127.25, 126.30, 125.55, 124.36, 122.62, 110.34, 87.79, 75.51, 72.62, 71.36, 71.01, 70.84, 68.85, 55.41, 20.83.

EMAR (IE) Calculada para C₃₀H₂₆FeN₂OS (M⁺): 518.1128; encontrada 518.1115.

(*S_{Fc}*)-2'-Nitro-4-metoxi-3-(*p*-tolil-sulfenil)ferrocenilazobenceno (34g).



Siguiendo el **procedimiento general D**, usando 2'-nitro-4-metoxi-(*S_p*, *S_s*)-3-(*p*-tolil-sufinil)ferrocenilazobenceno **33g** (87 mg, 0.15 mmol), NaI (11 mg, 0.075 mmol) y (CF₃CO)₂O (126 mg, 83 μl, 0.6 mmol), se obtiene el compuesto **34g** como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 86% (73 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-10/1.

p.f.: °C

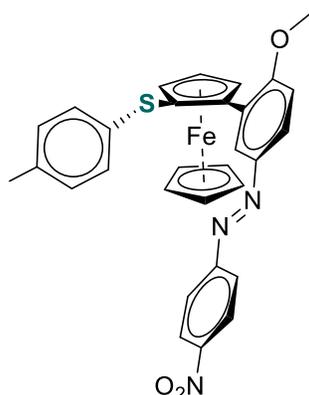
[α]_D²⁰ = -15 (c = 0.06, CHCl₃).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.61 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.93 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 7.89 – 7.75 (m, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.65 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.00 – 6.78 (m, *J* = 7.0 Hz, 5H), 4.69 (dd, *J* = 2.7, 1.5 Hz, 1H), 4.59 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 1H), 4.47 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.32 (s, 5H), 3.60 (s, 3H), 2.21 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ =

EMAR (BAR) Calculada para C₃₁H₂₅F₃FeN₂OS (M⁺): 586.0989; encontrada 586.0984.

(S_{FC})-4'-Nitro-4-metoxi-3-(*p*-tolil-sulfenil)ferrocenilazobenceno (34h).



Siguiendo el **procedimiento general D**, usando 4'-nitro-4-metoxi-(S_p , S_s)-3-(*p*-tolil-sufinil)ferrocenilazobenceno **33h** (87 mg, 0.15 mmol), NaI (11 mg, 0.075 mmol) y $(CF_3CO)_2O$ (126 mg, 83 μ l, 0.6 mmol), se obtiene el compuesto **34h** como un sólido cristalino naranja con un rendimiento del 93% (79 mg) tras purificación en columna hexano/AcOEt-10/1.

p.f.: °C;

$[\alpha]_D^{20} = -44$ ($c = 0.05$, $CHCl_3$).

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta =$ 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.44 (d, $J = 2.5$ Hz, 3H), 7.90 – 7.79 (m, 9H), 7.56 – 7.39 (m, 10H), 6.95 (s, 12H), 6.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 3H), 4.75 (s, 3H), 4.60 (s, 3H), 4.49 (d, $J = 3.2$ Hz, 4H), 4.30 (s, 15H), 3.70 (s, 9H), 2.24 (s, 9H).

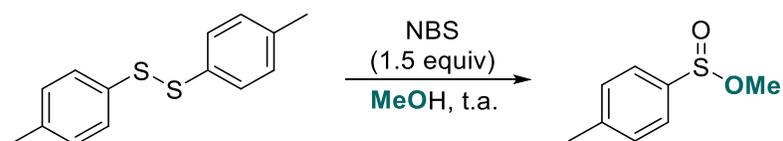
^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta =$ ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ 159.9, 152.8, 146.1, 137.0, 134.3, 130.2, 129.2, 128.9, 127.3, 126.3, 125.6, 124.4, 122.6, 110.3, 87.8, 75.5, 72.62, 71.34, 71.0, 70.8, 68.9, 55.4, 20.8.

EMAR (IE) Calculada para $C_{30}H_{26}FeN_2OS$ (M⁺): 518.1128; encontrada 518.1115.

2. 4. 3. 2. COMPUESTOS RACÉMICOS.

Para la obtención de los derivados racémicos, se siguieron los mismo procedimientos ya comentados (con los mismos resultados), cambiando el (S_S)-*p*-toluensulfinato de (-)-(1*R*,3*R*,4*S*)-mentilo por *p*-toluensulfinato de metilo, el cual fue preparado siguiendo la metodología descrita en la bibliografía.

Síntesis del *p*-toluensulfinato de metilo^[ref].



Sobre una disolución de disulfuro de *p*-tolilo (0.08 mol) en MeOH (200 mL) a temperatura ambiente, se añade lentamente NBS (0.12 mol). La reacción se deja agitando hasta que se observa la desaparición completa del producto de partida (por cromatografía en capa fina). Una vez la reacción a terminado, se diluye con CH₂Cl₂ (200 mL), se lava con NaHSO₃ (10 mL) y varias veces con una disolución saturada de NaHCO₃ aq (4x20 mL) y se separan las fases. La fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ (3 veces), el combinado de fases orgánicas se seca sobre MgSO₄ anhidro y se elimina el exceso de disolvente *in vacuo*. Finalmente, se obtiene el *p*-toluensulfinato de metilo, como un aceite incoloro, con un rendimiento cuantitativo sin necesidad de una etapa de purificación adicional.

¹H-RMN (300 MHz): δ = 7.54 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.30 (d, J= 7.9 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 2.38 (s, 3H).

Capítulo 3

*Síntesis de nuevos azocompuestos basados en
BODIPY como inhibidores de fluorescencia.*

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1. BODIPYs

Los 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno derivados o BODIPYs (acrónimo de su nombre abreviado BOron DIPYrrromethene) son compuestos apolares con una estructura zwitteriónica formada por dos unidades de pirrol unidas a un puente metilénico y a un grupo BF_2 que conecta ambos nitrógenos pirrólicos (Figura 3. 1. 1. 1).

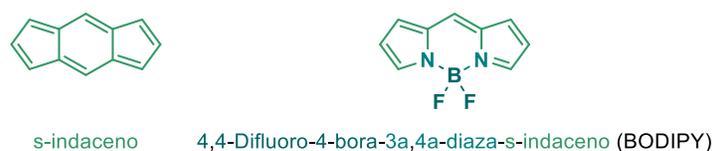


Figura 3. 1. 1. 1

El sistema de numeración IUPAC en el BODIPY es diferente al utilizado en dipirrometanos y metenos,^[112] a diferencia de los términos α , β y *meso* se usan del mismo modo para ambos (Figura 3. 1. 1. 2).



Figura 3. 1. 1. 2

Entre las propiedades más importantes de los BODIPYs destaca su estabilidad química y fotoestabilidad, su buena solubilidad en disolventes orgánicos y su elevada absorción y emisión fluorescente en el visible, con bandas estrechas y reducidos desplazamientos de Stoke (Figura 3. 1. 1. 3).^[113] Estos complejos son estables en pH fisiológico y presentan rendimientos cuánticos muy altos, lo que combinado con su baja toxicidad los convierte en candidatos ideales para su uso en sistemas biológicos. Por ello, los BODIPYs vienen

^[112] H. B. F. Dixon, A. Cornish-Bowden, C. Liebecq, K. L. Loening, G. P. Moss, J. Reedijk, S. F. Velick, P. Venetianer, J. F. G. Vliegthart, *Pure Appl. Chem.* **1987**, 59, 779.

^[113] a) F. Lopez Arbeloa, J. Bañuelos, V. Martínez, T. Arbeloa, I. Lopez Arbelos, *Inter. Rev. Phys. Chem.* **2005**, 24, 339.; b) G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harrima, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 47, 1184.

recibiendo un interés creciente en campos como la bioimagen, el marcaje biológico o la terapia fotodinámica.^[114]

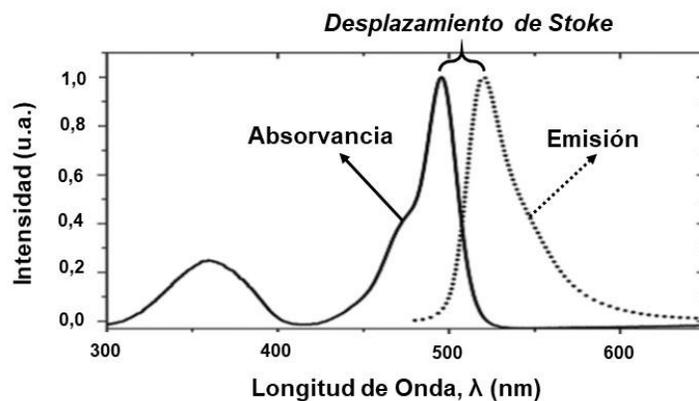
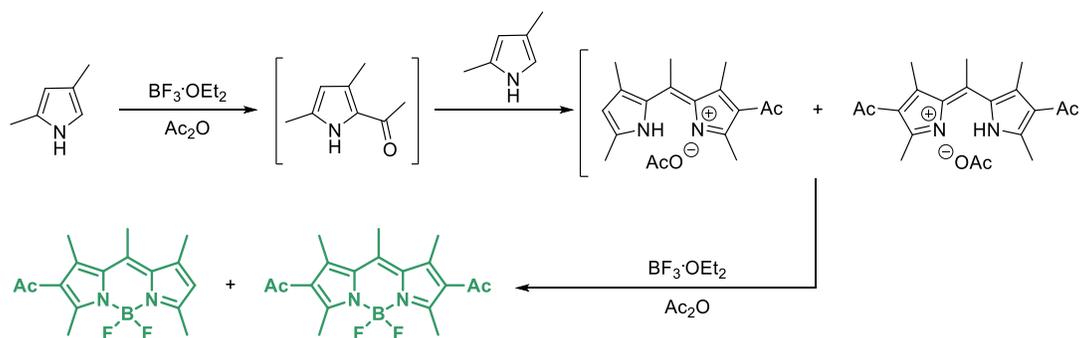


Figura 3. 1. 1. 3

Los BODIPYs fueron descritos en 1968 por Treibs y Kreuzer al intentar α -acetilar el 2,4-dimetilpirrol con el anhídrido acético en presencia de trifluoruro de boro eterato (Esquema 3. 1. 1. 1).^[115]

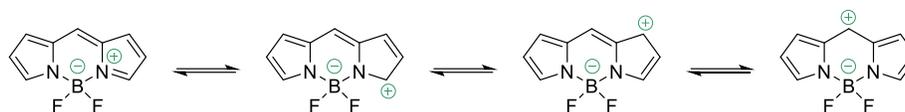


Esquema 3. 1. 1. 1

Estos mismos autores propusieron las formas resonantes del cromóforo que justifican su baja polaridad y alta solubilidad en medios orgánicos (Esquema 3. 1. 1. 2).

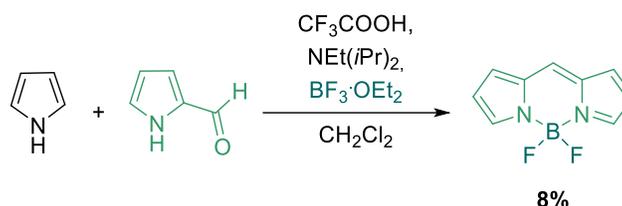
^[114] F. Bergström, I. Mikhalyov, P. Hägglöf, R. Wortmann, T. Ny, L.B.-Å. Johansson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 196.; N. Boens, V. Leen, W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130.; T. Gayathri, A.K. Barui, S. Prashanthi, C.R. Patra, S.P. Singh, *RSC Adv* **2014**, *4*, 47409.

^[115] a) Treibs, F. H. Kreuzer, *Justus Liebeigs Ann. Chem.* **1968**, *718*, 208.; b) X. van Koevinge and J. Lugtenburg, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1977**, *96*, 55.



Esquema 3. 1. 1. 2

Sin embargo, el derivado más sencillo de esta familia de cromóforos no fue descrito hasta el año 2009 debido a la inestabilidad térmica del intermedio de dipirrometeno, el cual descompone a partir de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, y a que la ausencia de sustituyentes en la estructura de indaceno lo hace susceptible a ataques nucleófilos (Esquema 3. 1. 1. 3).^[116]

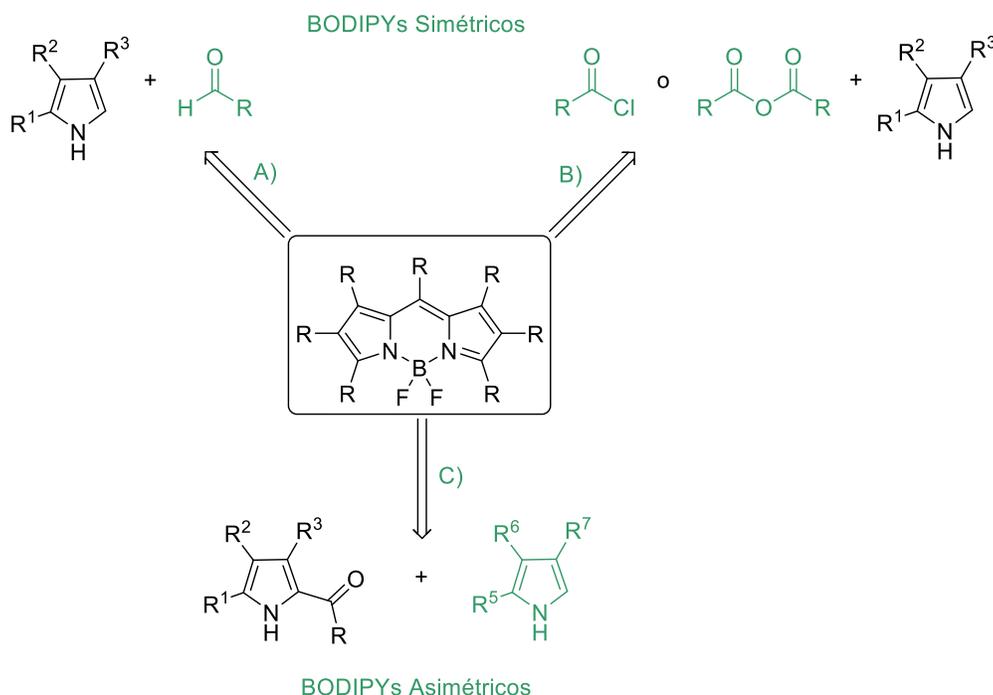


Esquema 3. 1. 1. 3

3. 1. 1. 1. Síntesis de BODIPYs

Desde su descubrimiento hace más de cinco décadas, los BODIPYs han despertado un interés creciente que ha dado lugar a infinidad de métodos de síntesis enfocados a la obtención de “BODIPYs a la carta”. Estos métodos pueden clasificarse en función de la simetría del BODIPY, es decir, los BODIPYs simétricos se sintetizan por condensación de pirroles con I) aldehídos o con II) cloruros ácidos y anhídridos, mientras que los asimétricos se obtienen por condensación de pirroles con III) acilpirroles (Esquema 3. 1. 1. 4).

^[116] a) A. Schmitt, B. Hinkeldey, M. Wild and G. Jung, *J. Fluoresc.*, **2009**, 19, 755.; b) J. Arroyo, R. Hu, G. Merino, B. Z. Tang and E. Peña-Cabrera, *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 5719. c) K. Tram, H. Yan, H. A. Jenkins, S. Vassiliev. D. Bruce, *Dyes Pigm.*, **2009**, 82, 392.

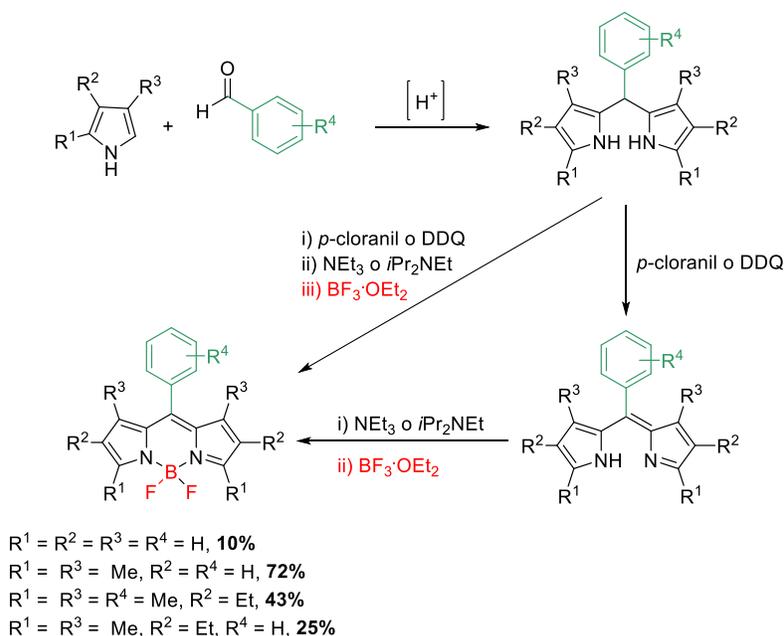


Esquema 3. 1. 1. 4

l) La condensación entre pirroles y aldehídos catalizada por medio ácido es uno de los métodos más usados para la síntesis de BODIPYs simétricos. Originalmente esta reacción se llevaba a cabo utilizando el pirrol como disolvente para prevenir procesos de polimerización. Posteriormente las condiciones de reacción fueron optimizadas empleando un exceso de 3 equivalentes de pirrol.^[117] Cuando los pirroles presentan sustituyentes en la posición 2, no se precisa el exceso de pirrol debido a que la reacción de multicondesación ya no es posible. Los dipirrometanos que se obtienen tras dicha condensación son compuestos bastante inestables ya que son sensibles a la luz, al aire y a condiciones ácidas. Estos dipirrometanos son posteriormente oxidados a dipirrometeno con agentes oxidantes tales como DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona) o *p*-Cloranil (2,3,5,6-tetracloro-*p*-benzoquinona). Este último permite el uso de condiciones suaves de reacción. Por último, el tratamiento del dipirrometano con base (generalmente diisopropilamina o trietilamina), seguido del trifluoruro de borato eterato da lugar al complejo de difluoruro de Boro con buenos rendimientos. Por lo general se emplean aldehídos aromáticos ya que de lo contrario la etapa de oxidación no tiene lugar de manera eficiente (Esquema 3. 1. 1. 5).^[118]

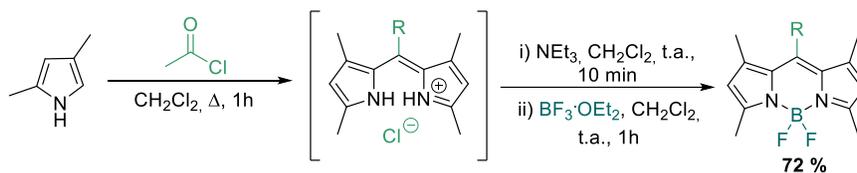
[117] T. Rohand, E. Dolusic, T. H. Ngo, W. Maes, W. Dehaen, *ARKIVOC*, **2007**, 10, 307.

[118] a) Z. Yang, Y. He, J. H. Lee, N. Park, M. Suh, W. S. Chae, J. Cao, X. Peng, H. Jung, C. Kang, J. Seung Kim, *J. Am Chem. Soc.*, **2013**, 135, 9181.; b) Y. Kubota, J. Uehara, K. Funabiki, M. Ebihara, M. Matsui.



Esquema 3. 1. 1. 5

II) Cuando en el proceso de condensación con el pirrol se emplean cloruros de ácido o anhídridos se obtienen como intermedios sales de dipirrometeno, lo que supone el ahorro de la etapa de oxidación. Estas sales de dipirrometeno intermedias se pueden manipular y purificar, pero normalmente no se aíslan en las síntesis de BODIPYs (Esquema 3. 1. 1. 6).^[119]



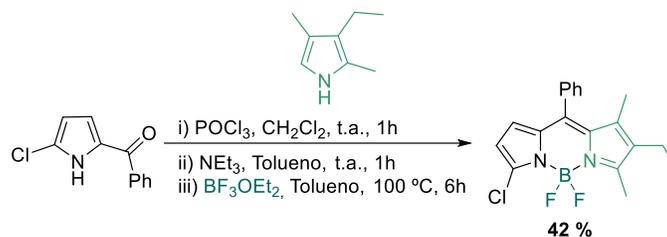
Esquema 3. 1. 1. 6

III) La síntesis de BODIYs asimétricos requiere la preparación previa de intermedios carbonilpirrólicos para su posterior condensación con un pirrol catalizada por un ácido Lewis (Esquema 3. 1. 1. 7).^[120]

Tetrahedron Letters, **2010**, 51, 6195.; c) S. Mula, A. K. Ray, M. Banerjee, T. Chaudhuri, K. Dasgupta., S. Chattopadhyay., *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 2146.

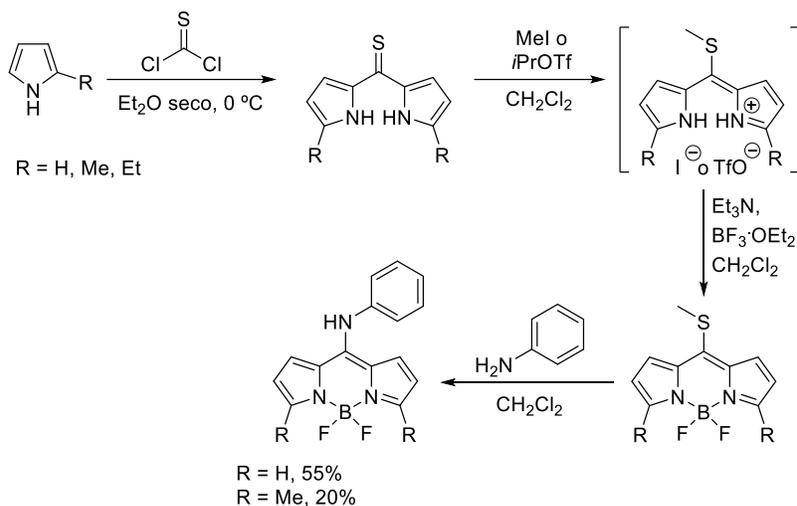
^[119] A. B. Nepomnyashchii, M. Bröring, J. Ahrens, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 8633.

^[120] a) C. Zhao, Y. Zhang, P. Feng, J. Cao. *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 831.; b) Este mismo método puede ser usado para la síntesis de BODIPYs simétricos, véase: L.Wu, K. Burgess, *Chem. Commun.*, **2008**. 4933.



Esquema 3. 1. 1. 7

IV) En 2006, Jean-François Biellmann y *col.* describieron la síntesis de una nueva familia de BODIPYs que poseía en la posición *meso* un sustituyente de tipo metiltioeter, el cual puede ser sustituido posteriormente por aminas. La preparación de estos tio-BODIPYs se realizó a través de la condensación de pirroles con tiosfogeno para dar lugar a las correspondientes tiocetonas, que por reacción con triflato de isopropilo o con yoduro de metio origina a las correspondientes sales de dipirrometeno. Finalmente, los tiobodipys se obtuvieron mediante el tratamiento habitual de las sales de dipirrometeno con Et₃N y BF₃·OEt₂ (Esquema 3. 1. 1. 8).^[121]

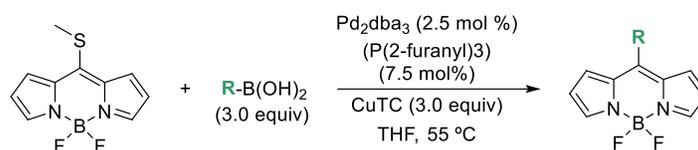


Esquema 3. 1. 1. 8

Un año más tarde, Eduardo Peña-Cabrera y *col.* desarrollaron una nueva metodología para la obtención de BODIPYs 8-sustituidos empleando los 8-metiltio-BODIPYs y reacciones de

^[121] T.V. Goud, A. Tutar, J. F. Biellmann. *Tetrahedron*. **2006**. 62. 5084.

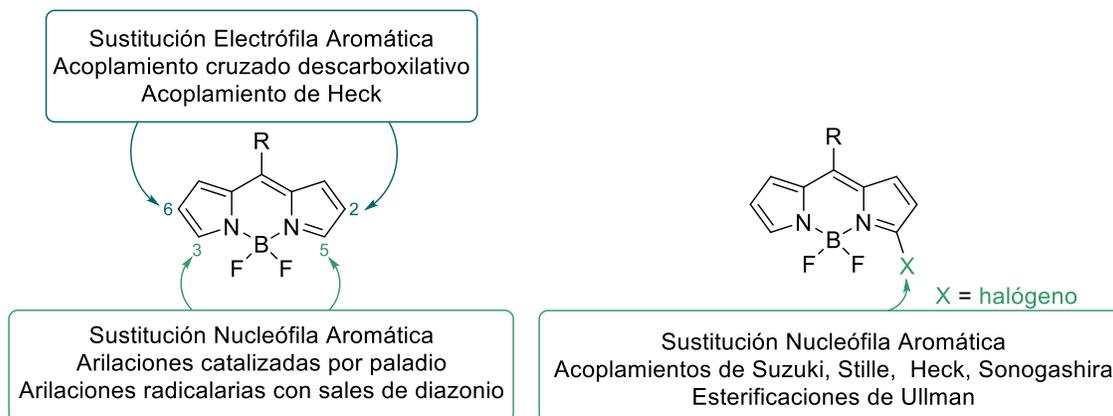
acoplamiento cruzado de tipo Liebeskind-Srögl^[122] con distintos ácidos borónicos (Esquema 3. 1. 1. 9).^[123]



Esquema 3. 1. 1. 9

3. 1. 1. 2. Reactividad de BODIPYs

El esqueleto aromático de los BODIPYs posee distintos tipos de reactividad dependiendo de la posición. Así las reacciones de sustitución electrófila aromática tienen lugar de forma exclusiva en las posiciones β (C-2 y C-6) mientras que la sustitución nucleófila aromática se produce en las α (C-3 y C-5). Además pueden experimentar funcionalizaciones selectivas mediadas por metales de transición, las cuales funcionalizan exclusivamente las posiciones α (C-3 y C-5) o las posiciones β (C-2 y C-6) (Esquema 3. 1. 1. 2. 1).



Esquema 3. 1. 1. 2. 1

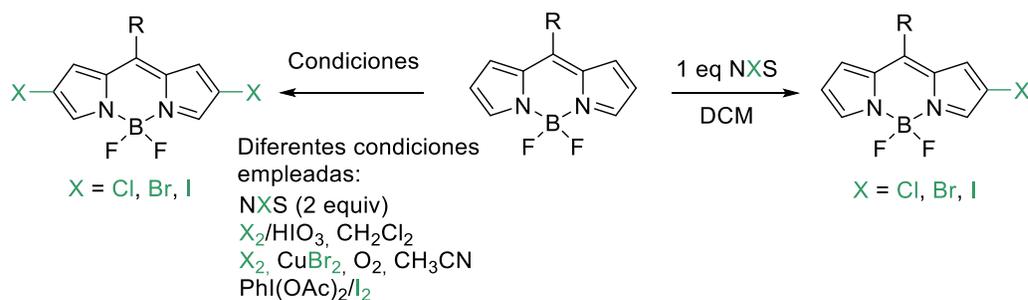
3. 1. 1. 2. 1. REACCIONES DE SUSTITUCIÓN ELECTROFÍLICA AROMÁTICA

La sustitución electrófila aromática es una de las reacciones más empleadas para llevar a cabo transformaciones sobre las posiciones β del BODIPY. Reacciones como la sulfonación,

^[122] a) J. Sörgl, L.S. Liebeskind, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11260.; b) R. Wittenberg, J. Sörgl, M. Egi, L. S. Liebeskind, *Org. Lett.* **2003**, 5, 3033.; c) H. Yang, R. Wittenberg, M. Egi, W. Huang, L. S. Liebeskind, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1132.

^[123] A. Aguilar-Aguilar, M. González-Domínguez, E. Lager, R. Zamudio-Vázquez, J. Godoy-Vargas, F. Villanueva-García, E. Peña-Cabrera, *Org. Lett.* **2007**, 9, 3985.

nitricación o la halogenación, dan lugar a los correspondientes BODIPYs sustituidos. De entre todas ellas la halogenación es sin duda la modificación más empleada y con mayor utilidad ya que los derivados halogenados resultantes son a su vez empleados en modificaciones posteriores para la síntesis de BODIPYs más complejos. La 3-mono o la 3,6-dihalogenación puede llevarse a cabo mediante el tratamiento del BODIPY con N-halosuccinimida o el halógeno correspondiente X_2 (Cl_2 , Br_2 , I_2) (Esquema 3. 1. 1. 2. 1. 1).^[124] Aumentando el número de equivalentes de los agentes halogenantes se pueden obtener diferentes BODIPYs polihalogenados.^[125]



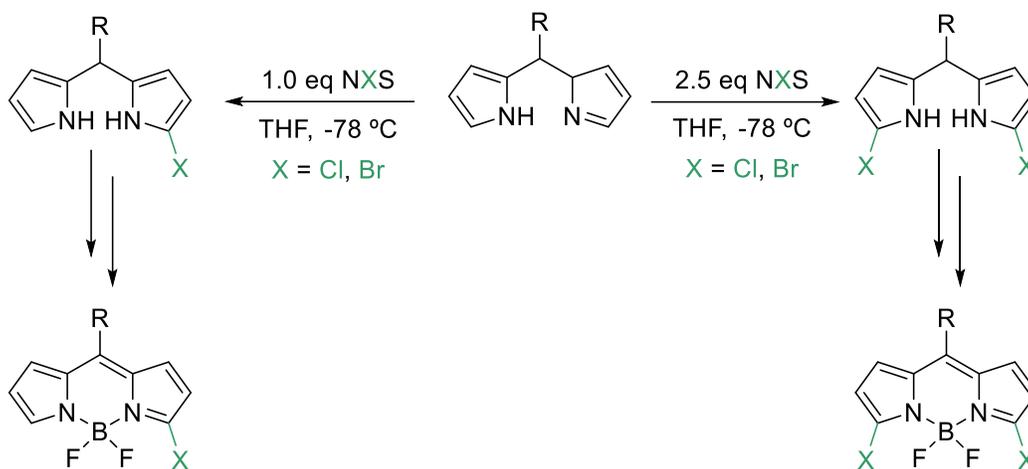
Esquema 3. 1. 1. 2. 1. 1

Cabe destacar que la halogenación directa de las posiciones α del BODIPY no es posible debido al carácter electrófilo de las posiciones C-3 y C-5. La preparación de BODIPYs halogenados en dichas posiciones se lleva a cabo mediante reacciones de sustitución electrófila aromática sobre el dipirrometano precursor del BODIPY empleando NCS o NBS y transcurre de forma regioselectiva sobre las posiciones α de los pirroles. El posterior tratamiento con el agente de oxidación seguido del tratamiento con base y $BF_3 \cdot OEt_2$ conduce a los 3,5-dihaloBODIPYs (Esquema 3. 1. 1. 2. 1. 2).^[126]

^[124] a) G. Duran-Sampedro, A. R. Agarrabeitia, I. Garcia-Moreno, A. Costela, J. Bañuelos, T. Arbeloa, I. López Arbeloa, J. L. Chiara and M. J. Ortiz, *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 6335.; b) L. Jiao, W. Pang, J. Zhou, Y. Wei, X. Mu, G. Bai, E. Hao, *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 9988.; c) C.W. Wan, A. Burghart, J. Chen, F. Bergström, L. B. Å. Johansson, M. F. Wolford, T. Gyum Kim, M. R. Topp, R. M. Hochstrasser and K. Burgess, *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 4430.; d) V. Leen, E. Braeken, K. Luckermans, C. Jackers, M. Van der Auweraer, N. Boens and W. Dehaen, *Chem. Commun.*, **2009**, 4515.; e) S. Niu, G. Ulrich, P. Retailleau R. Ziessel, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 4996.; f) W. Wu, J. Sun, X. Cui and J. Zhao, *J. Mater. Chem. C*, **2013**, *1*, 4577.; g) W. Wu, H. Guo, W. Wu, S. Ji and J. Zhao, *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 7056.; h) L. Wang, J. W. Wang, A. J. Cui, X. X. Cai, Y. Wan, Q. Chen, M. Y. He, W. Zhang, *RSC Adv.*, **2013**, *3*, 9219.

^[125] Vellanki Lakshmi, Malakalapalli Rajeswara Rao and Mangalampalli Ravikanth. *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 2501.

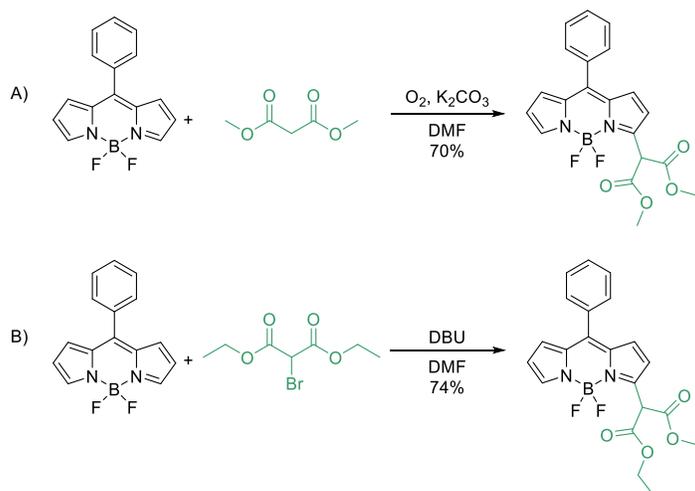
^[126] a) M. Baruah, W. Qin, N. Basarić, W. M. De Borggraeve and N. Boens, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 4152.; b) M. R. Rao, S. M. Mobin and M. Ravikanth, *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 1728.; c) T.K. Khan, M. Ravikanth. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5816.



Esquema 3. 1. 1. 2. 1. 2

3. 1. 1. 2. 2. REACCIONES DE SUSTITUCIÓN NUCLEÓFILA AROMÁTICA

Las posiciones α (C-3 y C-5) del esqueleto de BODIPY pueden funcionalizarse tanto si presentan un sustituyente halogenado como si no. En el caso de BODIPYs no sustituidos, dichas posiciones son funcionalizadas bien mediante un proceso de sustitución nucleófila oxidativa (Esquema 3. 1. 1. 2. 2. 1. A), o en ausencia del oxidante cuando el nucleófilo presenta un grupo saliente que permite la rearomatización (Esquema 3. 1. 1. 2. 2. 1. B).^[127]

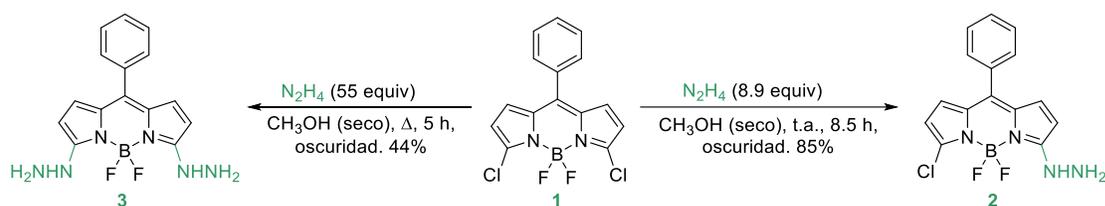


Esquema 3. 1. 1. 2. 2. 1

^[127] a) V. Leen, V. Zaragoza Gonzalvo, W. M. Deborggraeve, N. Boens, W. Dehaen, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 4908., b) V. Leen, M. Van der Auweraer, N. Boens, W. Dehaen. *Org. Lett.*, **2011**, 13, 1471.

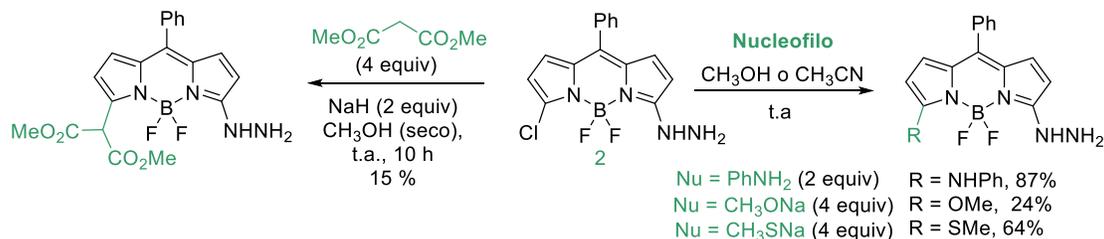
Por lo general, las reacciones de sustitución nucleofílica aromática en BODIPYs se realiza sobre sus derivados halogenados en las posiciones C-3 y C-5. Esta reacción tiene lugar mediante un mecanismo de adición/eliminación en las que se emplean nucleófilos carbonados, nitrogenados y oxigenados.^[128]

Un ejemplo muy representativo y directamente relacionado con el trabajo que se describe a continuación es el descrito por Bane y *col.* en 2008 para la preparación de BODIPYS sustituidos con un grupo hidracina. La reacción del 3,5-dicloroBODIPY **1** con hidracina empleando MEOH como disolvente, da lugar al BODIPY monohidracina **2**, empleando 8.9 equiv de hidracina, o al BODIPY 3,5-bishidracina **3**, usando un gran exceso de hidracina (55 equiv) [Esquema 3. 1. 1. 2. 2. 2].



Esquema 3. 1. 1. 2. 2. 2

Los mismos autores describieron reacciones de S_NAr a partir del derivado 5-cloro BODIPY hidracina **2**, con distintos nucleofilos como malonatos, anilinas, alcóxidos o tiolatos (Esquema 3. 1. 1. 2. 2. 3).

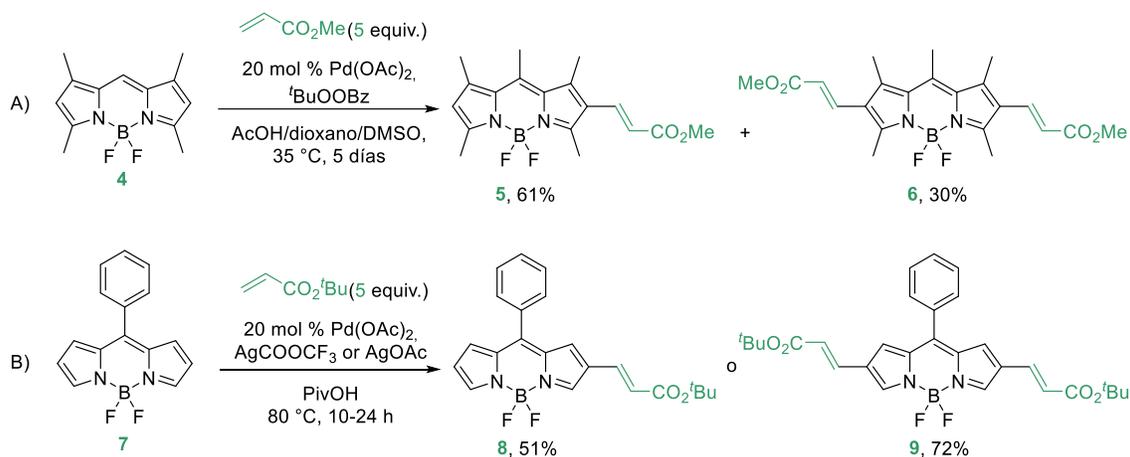


Esquema 3. 1. 1. 2. 2. 3

3. 1. 1. 2. 3. REACCIONES DE ACOPLAMIENTO Y ARILACIÓN CATALIZADAS POR METALES DE TRANSICIÓN.

^[128] Ö. Dilek, S. L. Bane, *Tetra. Lett.*, **2008**, 49, 1413.

En el año 2007, Burgess y *col.*^[129] describieron la funcionalización de las posiciones C-2 y C-6 del 1,3,5,7-tetrametil-BODIPY **4** mediante reacciones de acoplamiento de tipo Heck, empleando acrilatos y acetato de Paladio como catalizador (Esquema 3. 1. 1. 2. 3. 1. A). Sin embargo, debido a la naturaleza electrón-deficiente del esqueleto de BODIPY y a la coexistencia de enlaces C-H en el anillo de pirrol, la funcionalización selectiva de las posiciones C-2 y C-6 de los BODIPYs resulta complicado y hasta la fecha solo se han descrito algunos ejemplos;^[130] y de hecho, no ha sido hasta el presente año, cuando Jiao y *col.* han logrado llevar a cabo la olefinación regioselectiva de dichas posiciones empleando sales de plata, acrilatos y acetato de Paladio en ácido piválico (Esquema 3. 1. 1. 2. 3. 1. B).^[131]



Esquema 3. 1. 1. 2. 3. 1

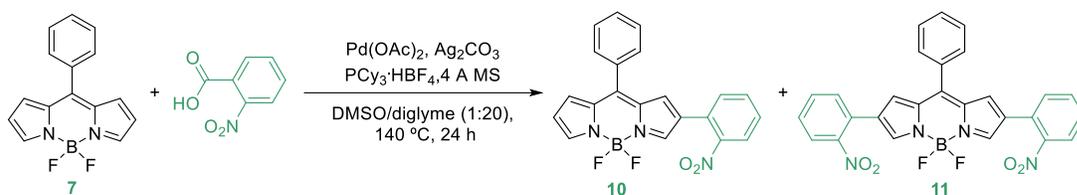
Tan solo unos años antes, You y *col.*^[132] publicaron el primer y único ejemplo de activación C-H de BODIPYs sin prefuncionalizar en las posiciones C-2 y C-6 mediante acoplamiento cruzado descarboxilativo empleando diferentes ácidos carboxílicos aromáticos y acetato de Paladio como catalizador (Esquema 3. 1. 1. 2. 3. 2).

^[129] C. Thivierge, R. Bandichhor, K. Burgess, *Org. Lett.*, **2007**, 9, 2135.

^[130] a) C. Yu, L. Jiao, H. Yin, J. Zhou, W. Pang, Y. Wu, Z. Wang, G. Yang, E. Hao, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 28, 5460-5468. b) L. Jiao, W. Pang, J. Zhou, Y. Wu, X. Mu, G. Bai, E. Hao, *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 9988. c) G. Duran-Sampedro, A. R. Agarrabeitia, I. Garcia-Moreno, A. Costela, J. Banuelos, T. Arbeloa, I. Lopez Arbeloa, J. L. Chiara, M. J. Ortiz, *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 2012, 6335. d) V. Lakshmi, M. Ravikanth, *Dalton Trans.*, **2012**, 41, 5903.; e) Y. Hayashi, S. Yamaguchi, W. Y. Cha, D. Kim, H. Shinokubo, *Org. Lett.*, **2011**, 13, 2992.; f) E. Heyer, P. Retailleau, R. Ziessel, *Org. Lett.*, **2014**, 16, 2330.; g) X. Zheng, W. Du, L. Gai, X. Xiao, Z. Li, L. Xu, Y. Tian, M. Kira, H. Lu, *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 8834.; h) S. Bandyopadhyay, S. Kundu, A. Giri, A. Patra, *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 9123.; i) I. J. Arroyo-Córdoba, R. Sola-Llano, N. Epelde-Elezcano, I. L. Arbeloa, V. Martínez-Martínez, E. Peña-Cabrera. *J. Org. Chem.*, **2018**, 83, 10186.

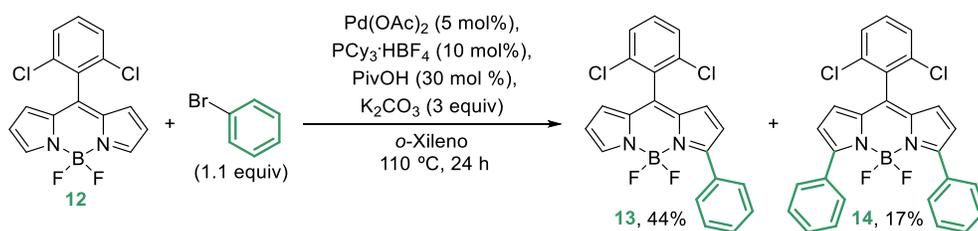
^[131] J. Wang, Y. Li, Q. Gong, H. Wang, E. Hao, P. Lo, L. Jiao, *J. Org. Chem.*, **2019**, 9, 5078.

^[132] L. Luo, D. Wu, W. Li, S. Zhang, Y. Ma, S. Yan, J. You, *Org. Lett.*, **2014**, 16, 6080.



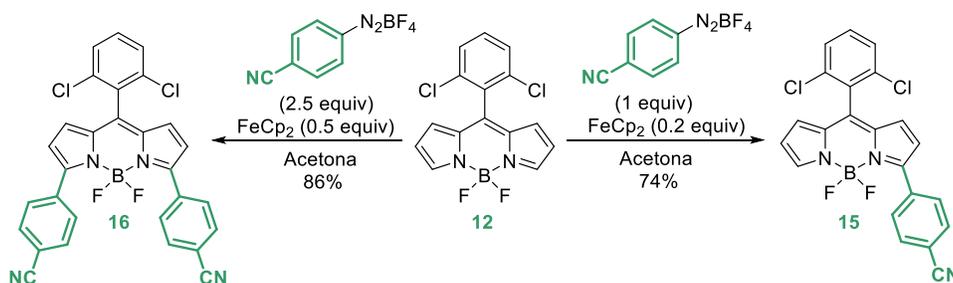
Esquema 3. 1. 1. 2. 3. 2

La arilación de las posiciones C-3 y C-5 de BODIPYs no sustituidos fue descrita por primera vez en el año 2012 por Dahen y *col.*, quienes llevan a cabo un proceso de activación C-H empleando acetato de Paladio como catalizador y bromuros de arilo (Esquema 3. 1. 1. 2. 3. 3).^[133]



Esquema 3. 1. 1. 2. 3. 3

Este mismo autor publica tan solo 3 años más tarde la reacción de arilación de las posiciones C-3 y C-5, empleando en este caso sales de diazonio como fuente de radicales de arilo y ferroceno como catalizador. Esta metodología permitió la obtención de una gran variedad de arilderivados en condiciones muy suaves y de manera regioselectiva (Esquema 3. 1. 1. 2. 3. 4).^[134]

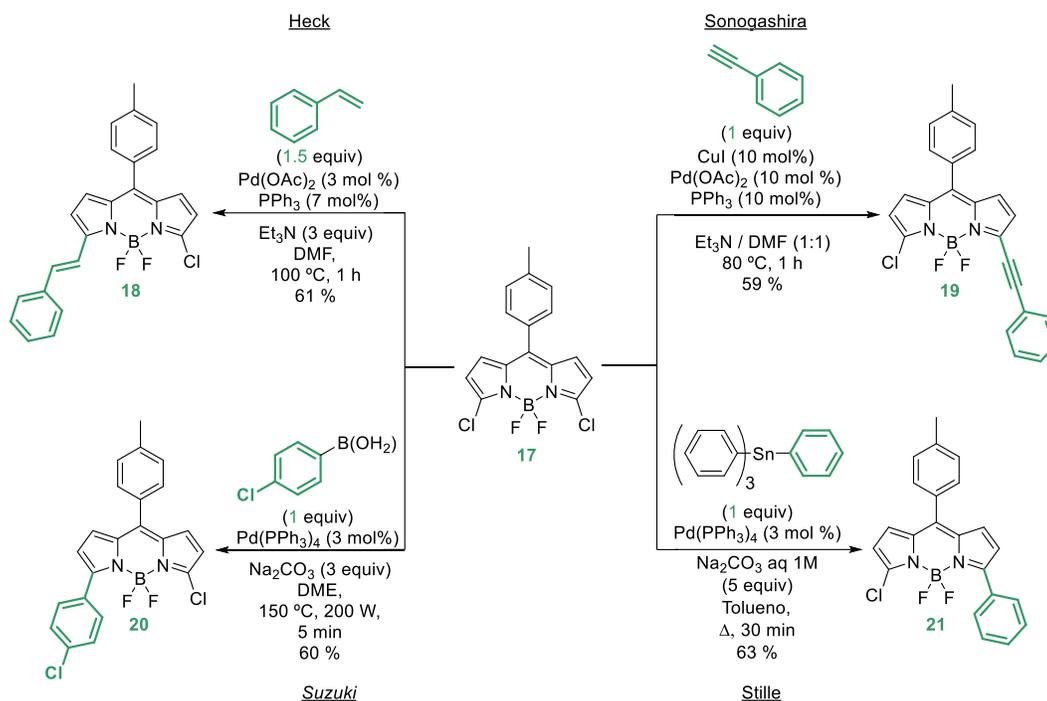


Esquema 3. 1. 1. 2. 3. 4

^[133] B. Verbelen, V. Leen, L. Wang, N. Boens and W. Dehaen, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 9129

^[134] B. Verbelen, S. Boodts, J. Hofkens, N. Boens, W. Dehaen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54, 4612.

Debido a las dificultades para funcionalizar BODIPYs no prefuncionalizados, la mayor parte de las investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha emplean BODIPYs halogenados, los cuales participan de forma eficiente en las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por metal de transición más habituales, tales como reacciones de acoplamiento de tipo Heck, Sonogashira, Suzuki, Stille (Esquema 3. 1. 1. 2. 3. 5).^[135]



Esquema 3. 1. 1. 2. 3. 5

^[135] T. Rohand, W. Qin, N. Boens, W. Dehaen. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4658.

3. 1. 2. AZOCOMPUESTOS COMO FOTO-CONTROLADORES DE LAS PROPIEDADES

Como se ha comentado con anterioridad en los capítulos anteriores de la presente tesis doctoral, en los últimos años, el interés en reacciones foto-controladas ha experimentado un crecimiento exponencial. En este tipo de reacciones la irradiación con luz de una determinada longitud de onda es la responsable de controlar la reactividad a modo de interruptor ON/OFF de un compuesto orgánico determinado. En este contexto, cabe destacar el papel de los azocompuestos como una de las familias de compuestos orgánicos más atractivos para ser usados en la categoría de reactivos fotoactivos. En la bibliografía se encuentran recogidos una variedad de ejemplos donde la actividad de una especie anclada a un azobenceno se puede regular por medio de irradiación con luz (Figura 3. 1. 2. 1).^[136]

3. 1. 2. 1. AZOCOMPUESTOS COMO INHIBIDORES DE LA FLUORESCENCIA

El proceso de fotoisomerización reversible que sufren los azobencenos les permite fluctuar

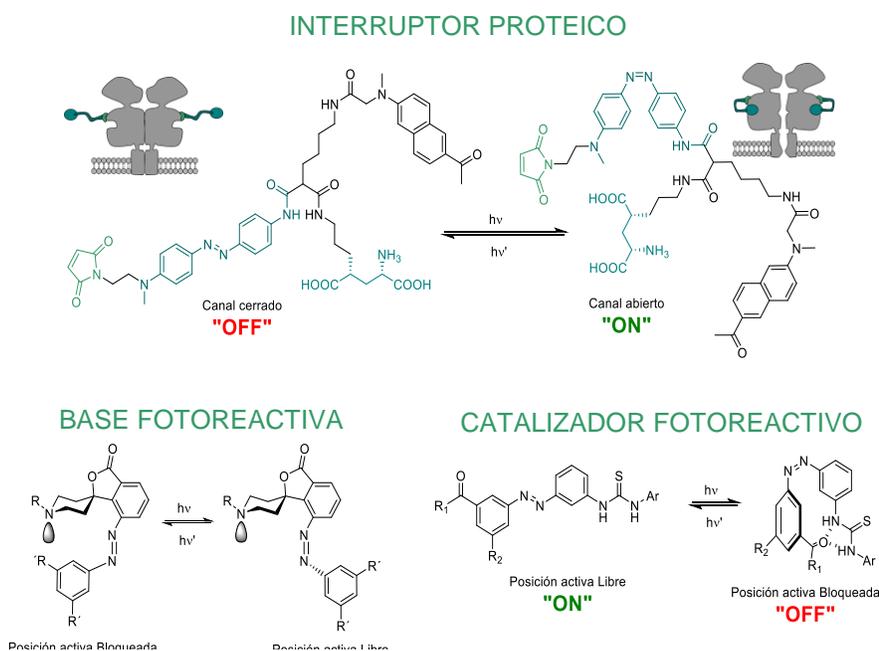
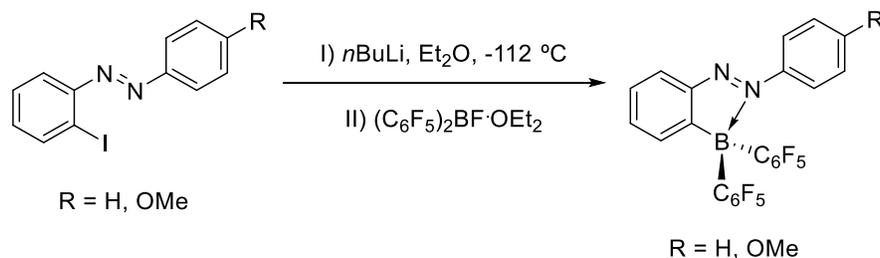


Figura 3. 1. 2. 1

de una manera controlada entre dos estereoisómeros *cis/trans*, con diferentes propiedades, electrónicas, estructurales y/o fotofísicas. Como ya se comentó anteriormente, la irradiación del azoisómero más estable *trans*, con una luz de una determinada longitud de onda, da lugar a un estado excitado que conduce al isómero *cis*, a través de un mecanismo de rotación

^[136] a) R. S. Stoll, M. V. Peters, A. Kuhn, S. Heiles, R. Goddard, M. Bühl, C. M. Thiele, S. Hecht. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 357.; b) M. Izquierdo-Serra, M. Gascón-Moya, J. J. Hirtz, S. Pittolo, K. E. Poskanzer, E. Ferrer, R. Alibés, F. Busqué, R. Yuste, Jordi Hernando, P. Gorostiza. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8693.; c) L. Osorio-Planes, C. Rodríguez-Esrich, M. A. Pericàs. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1704.

del enlace N=N o de un mecanismo de inversión. Como consecuencia de esta desactivación no-radiativa del estado excitado, los azobencenos en general no presentan fluorescencia. Los ejemplos descritos en la bibliografía de azobencenos que presentan fluorescencia presentan en su estructura sustituyentes capaces de bloquear o impedir dicha isomerización *trans/cis*, generalmente a través de la coordinación al grupo N=N (Esquema 3. 1. 2. 1. 1).^[137]



Esquema 3. 1. 2. 1. 1

Gracias a este proceso de fotoisomerización, los azobencenos se emplean como agentes de inhibición de la fluorescencia. En la bibliografía se encuentran recogidos varios ejemplos de colorantes orgánicos constituidos por un fluoróforo orgánico y un azocompuesto, unidos a través de un espaciador orgánico de mayor o menor longitud. El azocompuesto es capaz de inhibir la fluorescencia del fluoróforo, mediante procesos de transferencia de energía donde el azobenceno genera emisiones no radiativas, características de su rápida fotoisomerización *trans/cis* del doble enlace N=N presente en su estructura.^[138] Cuando el fluoróforo absorbe un fotón y el azobenceno está cerca, puede ocurrir, como resultado de la transferencia de energía una disminución o en ciertos casos una inhibición total de la intensidad de fluorescencia emitida por el fluoróforo. Esta inhibición de la fluorescencia, puede transcurrir a través de:

- I) Procesos de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET).
- II) Procesos de inhibición de contacto o inhibición estática

^[137] a) J. Yoshino, N. Kano, T. Kawashima, *Chem. Commun.* **2007**, 559.; b) H. Itoi, T. Kambe, N. Kano, T. Kawashima, *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *381*, 117.; c) N. Kano, A. Furuta, T. Kambe, J. Yoshino, Y. Shibata, T. Kawashima, N. Mizorogi, S. Nagase, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 1584.; d) J. Yoshino, N. Kano, T. Kawashima, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 15826.; e) N. Kano, M. Yamamura, T. Kawashima, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 16256.; f) P. P. Kasture, Y. A. Sonawane, R. N. Rajule, G. S. Shankarling, *Color. Technol.* **2010**, *126*, 348.; g) J. Jayabharathi, V. Thanikachalam, M. Venkatesh Perumal, N. Srinivasan, *Spectrochim. Acta Part A* **2011**, *83*, 200.; h) M. A. Satam, R. K. Raut, N. Sekar, *Dyes Pigm.* **2013**, *96*, 92.

^[138] *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 10994.

III) Procesos de transferencia electrónica fotoinducida (PeT).

IV) Procesos de transferencia de carga intramolecular (ICT).

Los procesos de transferencia de tipo Förster se basan en la transferencia directa de energía entre dos cromóforos distintos, uno con carácter aceptor y otro donador separados en distancias muy pequeñas (1-10 nm). La banda de emisión del donador (fluoróforo) se superpone en cierto grado con la banda de absorción del cromóforo aceptor (Figura 3. 1. 2. 1. 1).

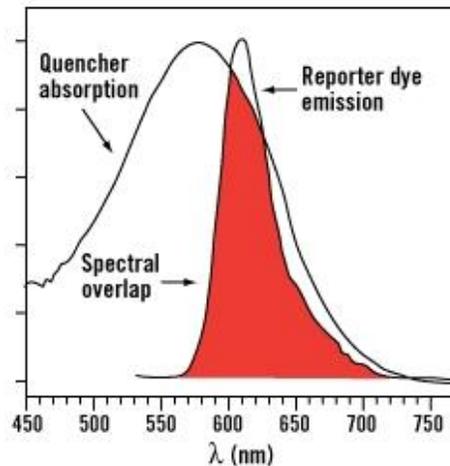


Figura 3. 1. 2. 1. 1

Como consecuencia, se produce la transferencia de energía del estado excitado del donante al aceptor por una vía no radiativa. La FRET es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre los dos cromóforos por lo que solo puede producirse cuando están muy próximos, a una distancia de entre 10 a 100 Å.

Ecuación FRET:

E : Eficiencia de la energía transferida

R_0 : Distancia entre aceptor-donador donde la transferencia de energía es del 50%.

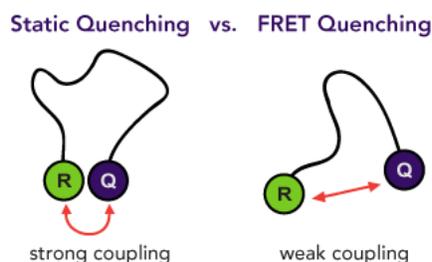
$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad \text{energía}$$

r : Distancia entre el donador y el aceptor.

I) Los procesos de inhibición de contacto o inhibición estática, son característicos de fluoróforos e inhibidores de la fluorescencia muy cercanos en el espacio, pudiendo incluso establecer un contacto entre ellos, formando una nueva especie no-fluorescente, que se

denomina dímero intramolecular. La eficiencia de la inhibición estática depende de la afinidad entre el fluoróforo y el inhibidor y suele ser dependiente de la temperatura y disolvente. Es importante señalar que aunque la inhibición de tipo FRET y la inhibición estática pueden estar presentes a la vez,^[139] hay diferencias que pueden indicar qué tipo de inhibición está operando. Por ejemplo, si la inhibición es estática, variaciones de la temperatura y/o el disolvente hacen que el espectro de absorción del fluoróforo se vea claramente alterado, mientras que en el proceso de tipo FRET no se ve alterado.

Principales diferencias entre la inhibición estática y el FRET



Inhibición estática

FRET

Contacto físico entre fluoróforo y inhibidor	Fluoróforo & inhibidor interaccionan a través del espacio
Dependiente de la temperatura y disolvente	No es muy dependiente de la temperatura ni del disolvente
Espectro de absorción del fluoróforo se ve alterado	Espectro de absorción del fluoróforo no se ve alterado

l) Cuando se trata de moléculas que poseen dos cromóforos, y uno es donador y el otro aceptor, puede operar el proceso no radiativo de tipo PET (transferencia electrónica fotoinducida), en donde el estado excitado de la especie donadora es desactivado por el aceptor de electrones, a través de un intercambio de electrones o una interacción dipolo-dipolo.

^[139] a) A. Salvatore, E. Marras, F. R. Kramer, S. Tyagi, *Nucleic Acids Research*, **2002**, *30*, 122.; b) M. K. Johansson, H. Fidder, D. Dick. R. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6950.

II) Por último, en procesos de transferencia de carga intramolecular (ICT) el proceso no-radiativo genera especies con separación de cargas, por lo que al ICT se le conoce como la recombinación de cargas.

Dentro de los azocompuestos inhibidores de la fluorescencia, conocidos como azo-NFQ (de las siglas en inglés *azo-based NonFluorescent Quenching dyes*),^[140] los Black Hole Quenchers (BHQ) son los más conocidos. Comercializados por Biosearch Technologies, estos azoderivados (BHQ0, BHQ1, BHQ2 y BHQ3), poseen espectros de absorción que abarcan distintas partes del espectro electromagnético y son capaces de inhibir la luminiscencia de un amplio rango de fluoróforos (Figura 3. 1. 2. 1. 2).

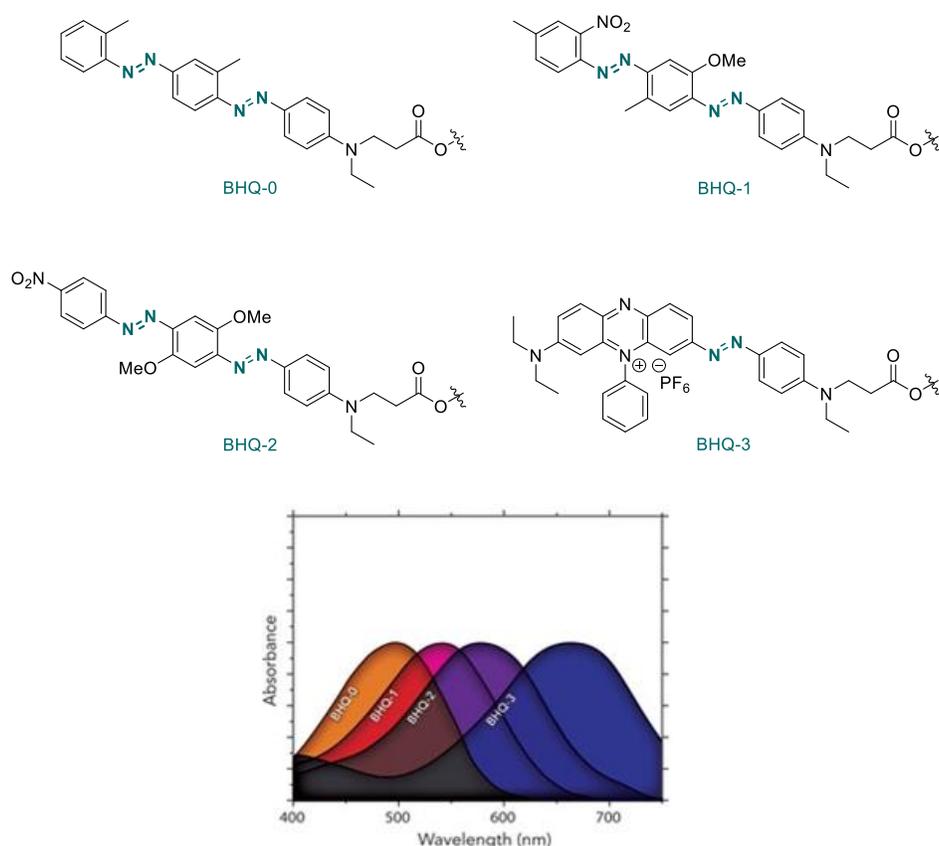


Figura 3. 1. 2. 1. 2

Los BHQ se utilizan como marcadores para PCR en tiempo real (polimerasa chain reaction). La PCR es una técnica usada en biología molecular que permite la amplificación de

^[140] C. R. Drake, D. C. Miller, E. F. Jones. *Curr. Org. Synth.* **2011**, 8, 498, R. T. Ranasinghe, T. Brown. *Chem. Commun.* **2005**, 5487; The Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th ed., Invitrogen, Oregon, 2006.

pequeñas cantidades de ADN, para su detección cuantitativa por fluorescencia. Los BHQ se unen al extremo de un oligonucleótido modificado que contiene en el extremo contrario un fluoróforo, cuya luminiscencia esta inhibida por FRET, tras la amplificación y la acción de la polimerasa, se libera el BHQ y el fluoróforo por separado, de forma que se recupera la luminiscencia.^[141] La inhibición de luminiscencia mediada por este tipo de colorantes no-fluorescentes permite medir cambios en la intensidad de fluorescencia, en vez de alteraciones en la forma del espectro de emisión, que son generalmente más difíciles de monitorizar y cuantificar (Figura 3. 1. 2. 1. 3).

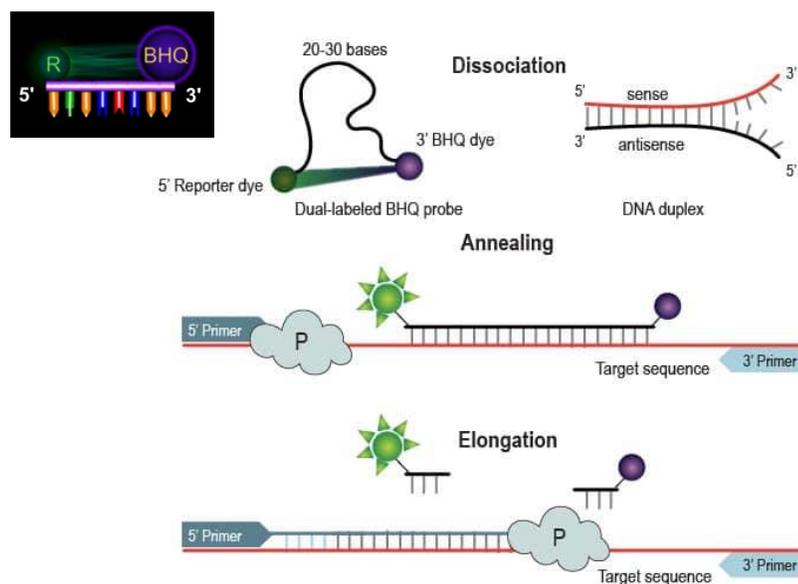


Figura 3. 1. 2. 1. 3

3. 1. 3. AZOcompuestos como sensores de medios reductores

Otra de las aplicaciones más relevantes de este tipo de azocompuestos es como sondas diagnósticas de hipoxia.^[140] La hipoxia es una condición asociada a niveles bajos de oxígeno en tejidos biológicos o células, que lleva implícita la sobreexpresión de enzimas reductoras. La hipoxia es un síntoma presente en lesiones asociadas a procesos inflamatorios,^[142] en tejidos isquémicos o en células cancerígenas de tumores sólidos.^[143] La detección de niveles de hipoxia en tejidos es por tanto una herramienta tremendamente valiosa para el

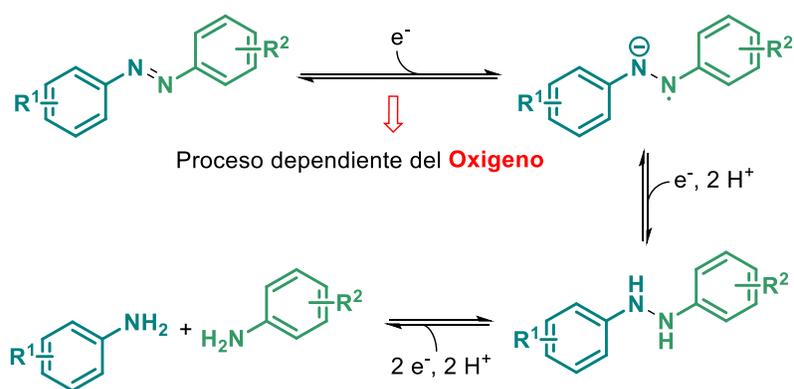
[141] Video explicativo de distintos tipos de PCR con BHQ quenchers ver:
<https://www.biosearchtech.com/support/videos/real-time-pcr-probe-animation-video>.

[142] H. K. Eltzschig, P. Carmeliet. *N. Engl. J. Med.* **2011**, 364, 656.

[143] W. R. Wilson, M. P. Hay. *Nat. Rev. Cancer*, **2011**, 11, 393.

diagnóstico temprano de lesiones celulares asociadas a este tipo de enfermedades tan devastadoras.^[144]

El doble enlace N=N de los azocompuestos puede reducirse a la correspondiente diarilhidracina en un proceso reversible de 2 electrones y dos protones, o a las correspondientes anilinas en un proceso global de 4 electrones y cuatro protones. La primera semirreducción de los azocompuestos, que genera el correspondiente anión radical (I), es muy dependiente del oxígeno del medio, de forma que en medios reductores y en ausencia de oxígeno, como puede ser en el caso de hipoxia, los azocompuestos sufren una ruptura reductora del N=N irreversible, liberando el fluoróforo y recuperándose la luminiscencia correspondiente correspondientes anilinas (Esquema 3. 1. 3. 1).

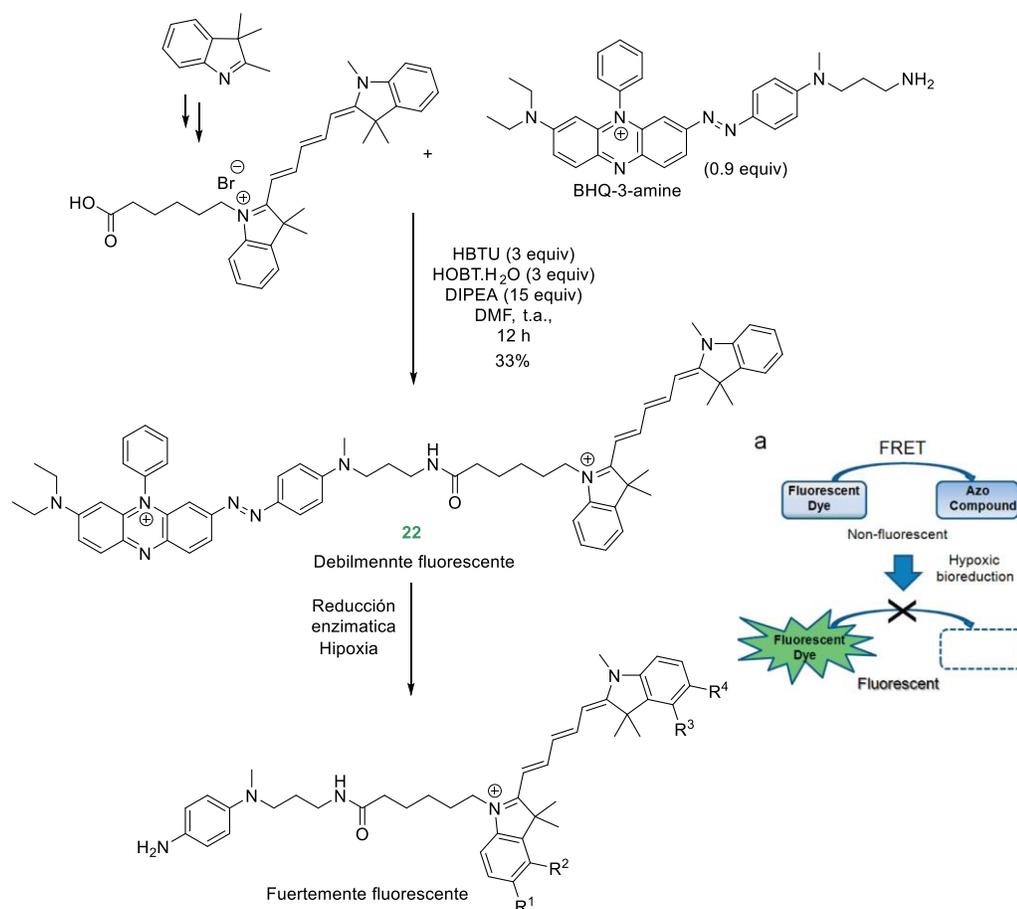


Esquema 3. 1. 3. 1

En el año 2010, Nagano y *col.*^[145] describieron un derivado de azobenceno unido a fluoróforos de tipo cianina **22** para la detección *in vivo* de isquemia aguda (Esquema 3. 1. 3. 2).

^[144] J. Liu, W. Bu, J. Shi, *Chem. Rev.* **2017**, 117, 6160.

^[145] K. Kiyose, K. Hanaoka, D. Oshiki, T. Nakamura, M. Kajimura, M. Suematsu, H. Nishimatsu, T. Yamane, T. Terai, Y. Hirata, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 15846



Esquema 3. 1. 3. 2

En el trabajo descrito por Nagano y col. demuestran el potencial de un derivado de tipo BHQ-3 unido a un fluoróforo de tipo cianina como sonda diagnóstica fluorescente de hipoxia en cultivos celulares. La conjugación del BHQ3 a la cianina a través de un enlace amida, condujo a un sistema no fluorescente. En presencia de medios reductores enzimáticos, se produce la ruptura del enlace N=N, recuperándose la luminiscencia de la cianina liberada.

Los autores también estudian la variación en la fluorescencia empleando un microscopio confocal. en cultivos celulares tratados con **22**, variando los niveles de oxígeno (Figura 3. 1. 3. 1: Células MCF-7 cells tratadas con 1 μM **22**: Variación de la fluorescencia en función de la cantidad de oxígeno. barra de escala: 50 μm .), En condiciones de normóxia (20% O₂) no se observa a penas fluorescencia, mientras que en condiciones de hipoxia (del 1% o 0.1% O₂) se observa claramente la fluorescencia característica de la cianina:

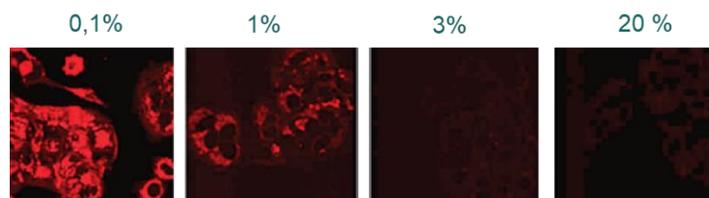


Figura 3. 1. 3. 1: Células MCF-7 cells tratadas con $1 \mu\text{M}$ 22: Variación de la fluorescencia en función de la cantidad de oxígeno. barra de escala: $50 \mu\text{m}$.

A raíz de este trabajo, se han publicado diferentes ejemplos de azobencenos unidos a fluoróforos de tipo rodamina,^[146] fluoresceína,^[147] 1,8-naftalimidias,^[148] porfirinas,^[149] pirenos,^[150] perilenos^[151] y se ha probado su utilidad en la detección de diferentes niveles de hipoxia.

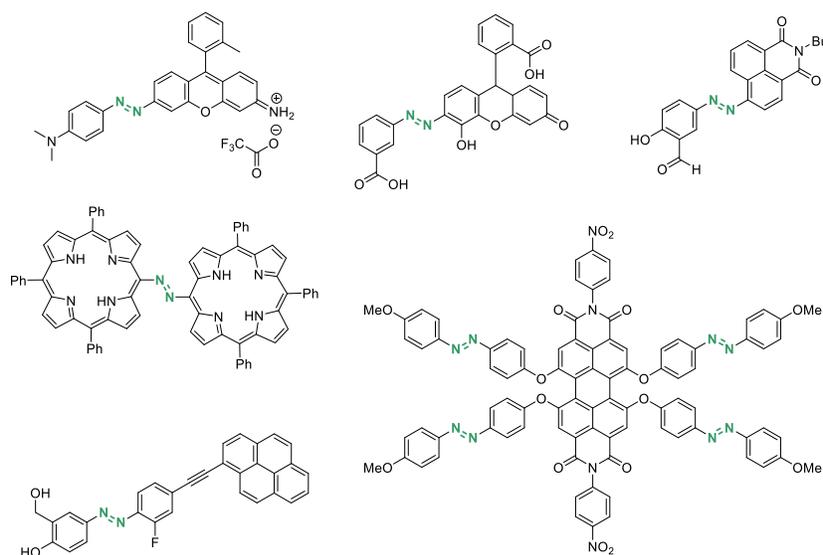


Figura 3. 1. 3. 2

- [146] N. Shin, K. Hanaoka, W. Piao, T. Miyakawa, T. Fujisawa, S. Takeuchi, S. Takahashi, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Tahara, M. Tanokura, T. Nagano, Y. Urano. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 558.
- [147] K. Chantalakana, N. Choengchan, P. Yingyuad, P. Thongyoo, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 1146.
- [148] Y. Hao, W. Chen, L. Wang, B. Zhou, Q. Zang, S. Chen, Y.-N. Liu, *Anal. Methods* **2014**, *6*, 2478.
- [149] a) L. J. Esdaile, P. Jensen, J. C. McMurtrie, D. P. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2090.; b) L. J. Esdaile, P. Jensen, J. C. McMurtrie, D. P. Arnold, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2136.
- [150] a) H. N. Joo, B. h. Le, Y. J. Seo, *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 679.; b) H. N. Joo, T. Van Thi Nguyen, H. K. Chae, Y. J. Seo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2415.
- [151] a) A. Saeed, G. Shabir, *Spectrochim. Acta Part A* **2014**, *133*, 7.; b) A. Saeed, G. Shabir, J. Mahar, M. Irfan, *Spectrochim. Acta Part A* **2015**, *151*, 72.

Recientemente,^[152] Hanaoka y Urano han publicado un sistema de seleno-rodamida conjugada a un azobenceno que actúa como fotosensibilizador (FS) en un medio de hipoxia suave, para terapia fotodinámica (TFD). La terapia fotodinámica es una modalidad terapéutica relativamente nueva, mínimamente invasiva y que ha sido aprobada para tratamientos paliativos o curativos de algunas formas de cáncer, lesiones precancerosas y también para degeneraciones maculares relacionadas con la edad ^[153]. La TFD se basa en la combinación de tres elementos no tóxicos *per se*: una molécula sensible a la luz que recibe el nombre de fotosensibilizador (FS) y que tiene la capacidad de acumularse selectivamente en células tumorales, luz y oxígeno. El FS es excitado mediante la irradiación del tejido dañado con luz visible de una determinada longitud de onda y, como consecuencia, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), que son las responsables de la muerte de las células tumorales, manteniendo intacto el tejido sano.^[153,154] (Figura 3. 1. 3. 3) La Terapia Fotodinámica puede ser útil para el tratamiento de tumores que presentan niveles moderados de hipoxia (entorno a un 5% de concentración de oxígeno).

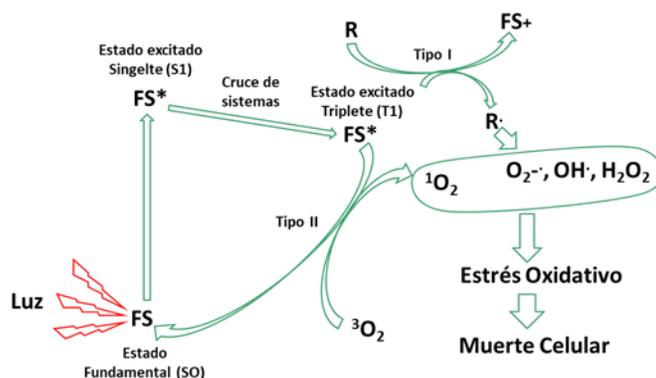


Figura 3. 1. 3. 3

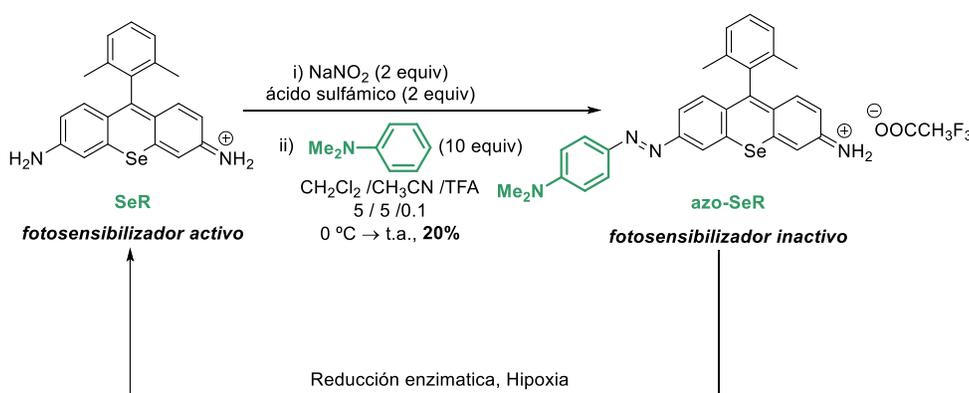
En el trabajo descrito por Hanaoka y Urano, un azo-NFQ basado en una seleno-rodamida conjugada a un azobenceno (azo-SeR), experimenta una ruptura reductora del azobenceno, recuperando la estructura del fluoróforo (SeR) que es capaz de actuar como fotosensibilizador (FS). Este compuesto, tras ser excitado con luz verde es capaz de generar

^[152] W. Piao, K. Hanaoka, T. Fujisawa, S. Takeuchi, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Tahara, T. Nagano, Y. Urano, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 13713.

^[153] Á. Juarranz, P. Jaén, F. Sanz-Rodríguez, J. Cuevas, S. González. *Clinical & Translational Oncology*, **2008**, 10, 148.

^[154] A. Juzeniene, Q. Peng, J. Moan. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2007**, 6, 1234.

especies reactivas de oxígeno (ROS), fundamentalmente oxígeno singlete, que causan la muerte de las células tumorales.



Esquema 3. 1. 3. 3

Todos estos trabajos reflejan el gran potencial de estos azo-NFQ, para la detección de hipoxia generalmente en experimentos *in vitro*, empleando la espectroscopia de fluorescencia para visualizar el evento con unos rangos de intensidad de luminiscencia alta. Sin embargo, su aplicación *in vivo* está más limitada debido al uso de luz visible, necesaria para activar y observar el proceso de emisión del fluoróforo. La luz visible tiene un bajo nivel de penetración en tejidos biológicos, por lo que se hace necesario el uso de altas densidades de potencia que pueden causar daños en los tejidos (por ejemplo, ablación termal o daños al ADN). Como alternativa biocompatible, en la última década se ha propuesto el uso de luz perteneciente a la región del infrarrojo cercano (NIR) del espectro electromagnético, ya que en dicha región es posible penetrar tejidos biológicos debido a la reducida absorción que presentan el agua, la hemoglobina y las grasas. Estas *ventanas biológicas* situadas en el NIR, llamadas NIR-I (650 – 980 nm) y NIR-II (1000 – 1450 nm), han provocado un cambio de paradigma en el campo de la bioimagen.^[155] Los ejemplos puntuales descritos en la bibliografía relativos a sensores de hipoxia que operan en el NIR, emplean fluoróforos altamente conjugados como derivados de cianina o derivados de silíceo-rodamina (650-670 nm) y azobencenos de tipo BHQ-3®, pertenecientes a la familia de los denominados *Black Hole Quenchers*. Estos azobencenos son compuestos estructuralmente muy elaborados, que requieren de métodos sintéticos de preparación tediosos, caros y poco modulables.

^[155] A. M. Smith, Michael C. Mancini, S. Nie, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 710.

Con el fin de mejorar la eficiencia y selectividad del método diagnóstico de la hipoxia, es necesario diseñar un nuevo concepto de sensores, que reúnen tres importantes características: un método de preparación fácil y modulable, que sean biocompatibles y que permitan operar en las ventanas biológicas, donde la luz llegue a tejidos profundos.

3.2 ANTECEDENTES

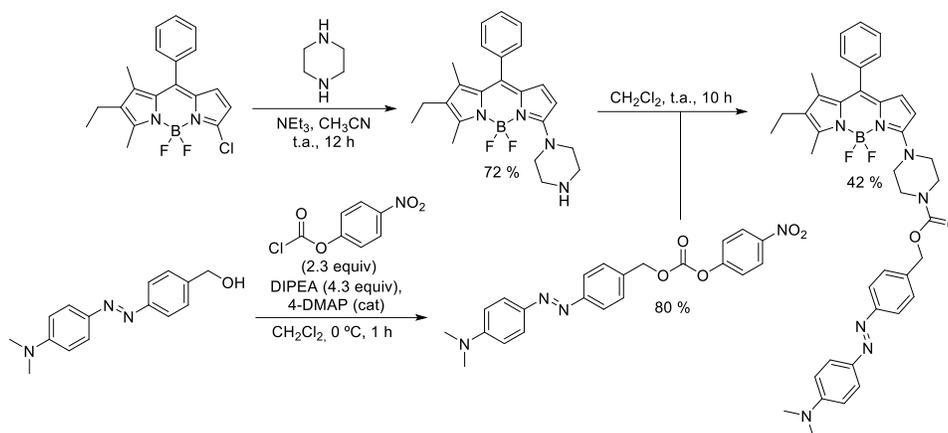
De entre las múltiples atractivas propiedades de los BODIPYs, cabe destacar aquellas que los convierten en candidatos ideales para su uso en biomedicina:

- Su fuerte absorción y emisión en la región del visible.
- Su estabilidad química.
- Su baja toxicidad y estabilidad en medios fisiológicos.
- Su esqueleto puede ser modificado de forma sencilla y eficiente de manera que se potencien las propiedades fotoactivas deseadas.

Por ello, estos compuestos se han convertido en los cromóforos más empleados en la actualidad; sin embargo, y pese al demostrado potencial de los AZO derivados en combinación con cromóforos para su aplicación en biomedicina, son muy pocos los ejemplos descritos en la bibliografía en los cuales el grupo AZO se emplea en combinación con un cromóforo de tipo BODIPY.

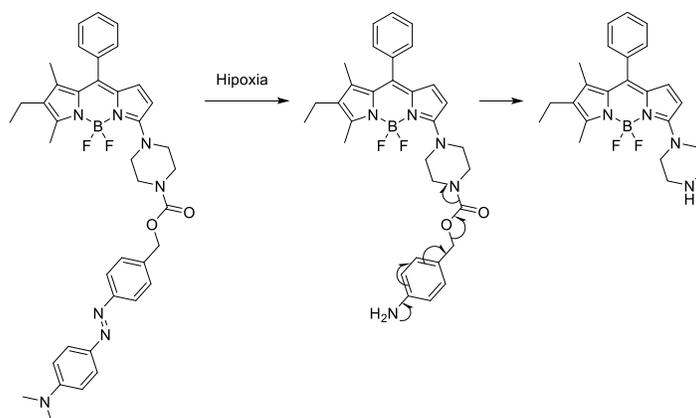
En concreto, la combinación de azobencenos como sensores de medios reductores y BODIPYS como fluoróforos, el único caso descrito hasta la fecha es el realizado por Zhao y Tung, quienes llevaron a cabo la síntesis de una sonda para la detección de lisosomas en células tumorales hipoxicas.^[156] Aprovechando la capacidad de los azobencenos para inhibir la fluorescencia, estos autores unieron un azobenceno a un BODIPY mediante un espaciador de tipo piperazina (Esquema 3. 2. 1).

^[156] S. Luo, Y. Liu, F. Wang, Q. Fei, B. Shi, J. An, C. Z., C. Tung, *Analyst*, **2016**, *141*, 2879.



Esquema 3. 2. 1

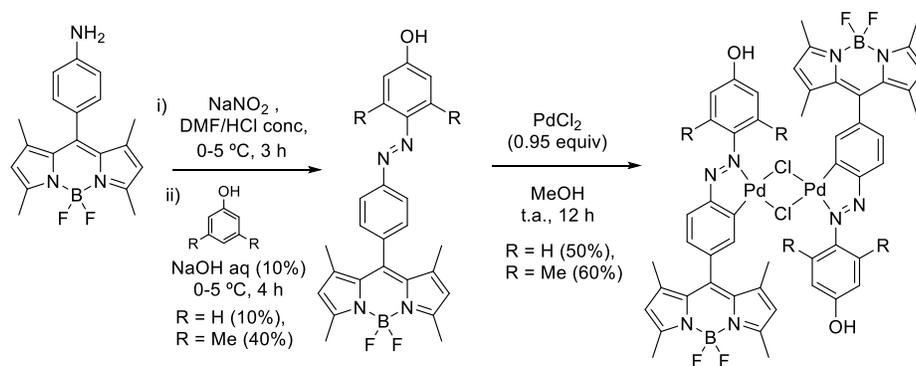
En este caso, la ruptura reductora libera el BODIPY con un sustituyente de aminobenzil carbamato que evoluciona, por pérdida de CO₂ al piperazinil-BODIPY (Esquema 3. 2. 2).



Esquema 3. 2. 2

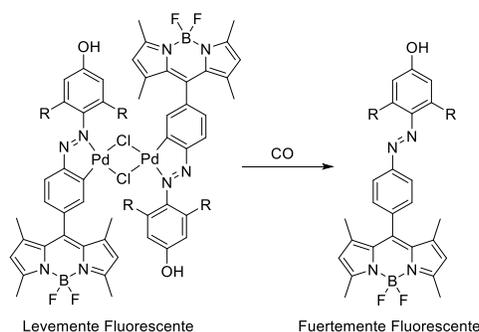
Por otro lado, el grupo de Bo Tang *y col.*, publicaron la síntesis de una nueva sonda fluorescente detectora de monóxido de carbono ^[157] basada en un sistema de BODIPY conjugado a través del anillo aromático de la posición 8 con un *p*-azobenceno. El azocompuesto se prepara mediante una reacción de acoplamiento azoico entre el 8-(4-aminofenil)-BODIPY **n** y diferentes fenoles (Esquema 3. 2. 3).

^[157] Y. Li, X. Wang, J. Yang, X. Xie, M. Li, J. Niu, L. Tong, B. Tang. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 11154.



Esquema 3. 2. 3

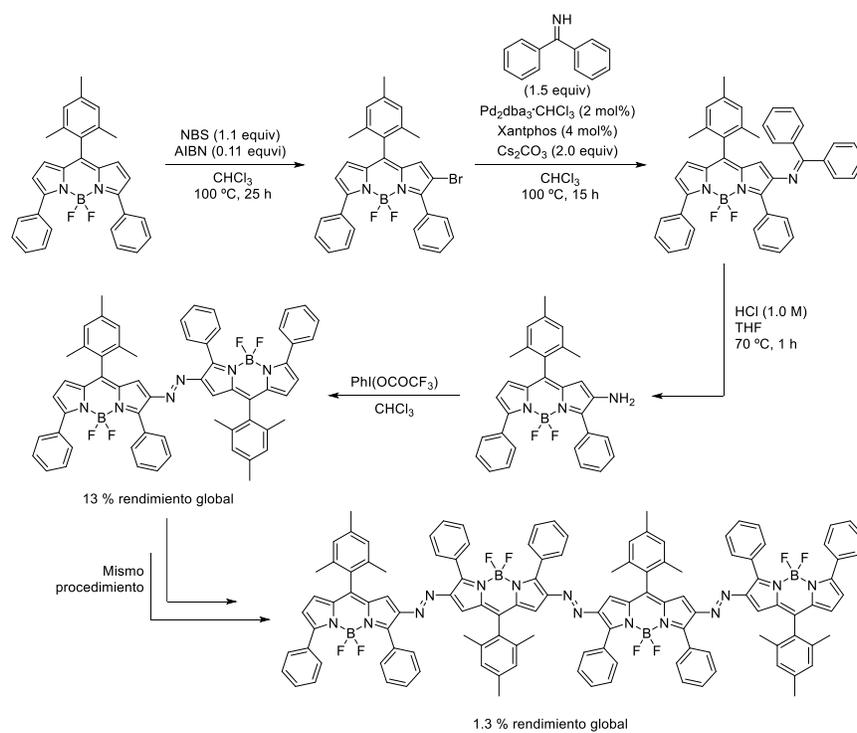
En este caso, la parte azobencénica de la sonda no inhibe la fluorescencia del BODIPY, si no que la inhibición se producía al formarse un dímero mediante la complejación con PdCl_2 de los grupos azo a través de la formación de dos paladaciclos. La recuperación de la fluorescencia de la sonda se debe a la interacción del CO con el Paladio, que desencadena la descomplejación del metal con el azobenceno, liberando así el monómero que presenta luminiscencia (Esquema 3. 2. 4).



Esquema 3. 2. 4

En 2014 el grupo del profesor Hiroshi Shinokubo publicó la síntesis de un dímero y un tetrámero de BODIPY unidos entre sí mediante un puente de tipo azo ($\text{N}=\text{N}$).^[158] En este caso la formación de los azoderivados se llevó a cabo mediante la aminación del BODIPY en la posición 2 y posterior acoplamiento oxidativo de la amina resultante; catalizado por el reactivo de iodo hipervalente PIDA. En este caso la gran conjugación que existía entre los BODIPYs mediante el puente azoico, desplazaba la absorbancia hasta regiones cercanas al infrarrojo cercano (700-800 nm) (Esquema 3. 2. 5).

[158] H, Yokoi, S. Hiroto, H. Shinokubo. Org. Lett. **2014**, 16, 3004.



Esquema 3. 2. 5

3.3. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la utilidad de los AZO compuestos como eficientes inhibidores de la fluorescencia de diversos fluoróforos y su demostrada aplicabilidad en biomedicina, junto con las convenientes propiedades de los BODIPYs, nos propusimos llevar a cabo el diseño, síntesis y evaluación de una nueva familia de azo compuestos que actuaran como inhibidores de la fluorescencia de fluoróforos de tipo BODIPY.

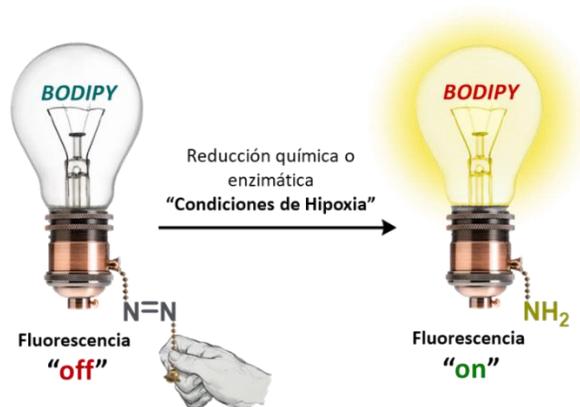


Figura 3. 3. 1

Objetivo 1: Desarrollar una metodología de síntesis eficiente y versátil de BODIPAZOS que permita solventar el mayor número posible de los problemas encontrados en los sensores similares descritos en la bibliografía:

- 1) Problemas de selectividad: espectros anchos
- 2) Problemas de sensibilidad: fluorescencia inhibida solo parcialmente
- 3) Problemas fisicoquímicos: estructuras demasiado grandes, lo que produce una limitación de la solubilidad y la permeabilidad celular.
- 4) Problemas de biocompatibilidad: longitudes de onda dañinas
- 5) Problemas de eficiencia: compuestos muy sofisticados con métodos de síntesis largos, que emplean intermedios inestables y bajos rendimientos.

Objetivo 2: Estudio de la reducción química y enzimática.

Objetivo 3: Estudio de las propiedades físico-químicas de los BODIPAZOS sintetizados y sus derivados reducidos.

Objetivo 4: Estudios de biocompatibilidad de los BODIPAZOS sintetizados y sus derivados reducidos para su posible posterior aplicación en áreas de biomedicina, tales como el marcaje biológico, la detección de hipoxia o el tratamiento de células tumorales.

3.4. RESULTADOS

En el año 2004, nuestro grupo de investigación, desarrolló un nuevo método de síntesis de azobencenos, empleando como productos de partida arilhidracinas y bisacetales de quinona. La reacción transcurre en condiciones muy suaves de reacción (MeCN como disolvente, cantidades catalíticas de CAN (10 mol%) y temperatura ambiente) para dar lugar a los azobencenos correspondientes con muy buenos rendimientos.^[159]

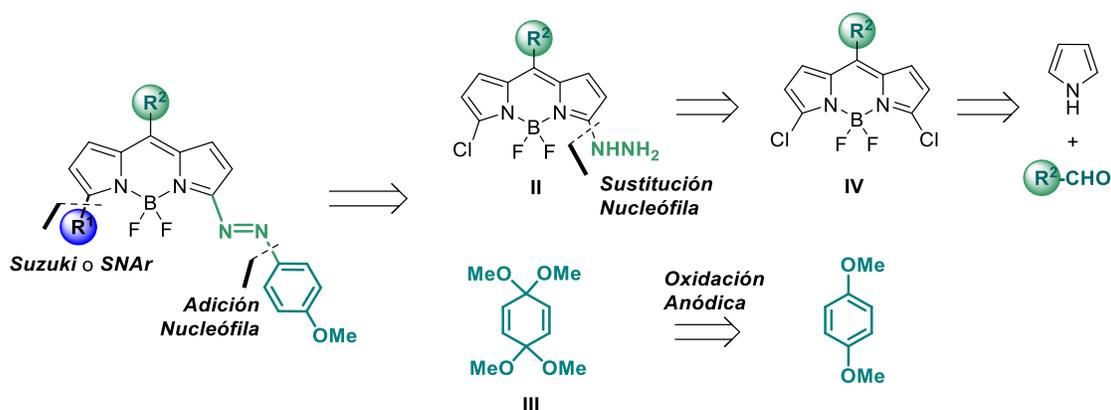
En esta parte de la Tesis Doctoral decidimos extender dicha metodología para la preparación de nuevos azocompuestos como inhibidores de luminiscencia. En concreto nos planteamos preparar una nueva familia de BODIPYs conjugados a una estructura de azobenceno. La ruta sintética planteada tenía dos objetivos principales:

- I) Desarrollar un método de síntesis de azocompuestos anclados a fluoróforos, que fuese complementaria a las rutas clásicas basadas en las reacciones de acoplamiento azoico o acoplamiento de Mills.
- II) Obtener un BODIPY-azo conjugado “cabeza de serie” que pueda posteriormente funcionalizarse fácilmente para modular sus propiedades fotofísicas y electroquímicas.

En el [Esquema 3. 4. 1](#) se recoge el análisis retrosintético planteado para la preparación de los BODIPY-azo derivados **I**, que implica la preparación del 5-cloro-BODIPY sustituido en la posición C-3 con un grupo hidracina **II** y del bisacetal de *p*-benzoquinona **III**. La hidracina precursora se prepararía mediante una reacción de sustitución nucleófila del 3,5-dicloro-BODIPY (IV) empleando hidracina como nucleófilo, siguiendo el protocolo descrito en la

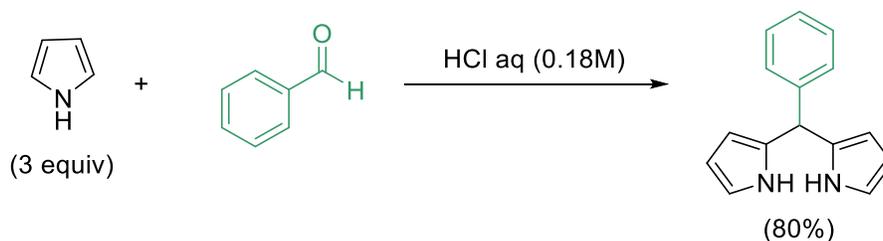
[159] a) G. F. Mudarra, E. Merino, M. Ribagorda, M. C. Carreño, *J. Org. Chem.* 2004. 69, 3413.; b) I. García, E. Merino, S. Pieraccini, M. Ribagorda, G. P. Spada, M. C. Carreño, *Org. Lett.* 2005. 7, 2869.; c) I. García, E. Merino, S. Pieraccini, M. Ribagorda, G. P. Spada, M. C. Carreño, *J. Am. Chem. Soc.* 2007. 129, 7089.; d) I. García, E. Merino, M. Lecea, S. Pieraccini, C. Rosini, G. Mazzeo, M. Ribagorda, M. C. Carreño, *Chem. Eur. J.* 2013. 19, 3397.

bibliografía ^[128] (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). El bisacetal de *p*-benzoquinona **III** se prepararía mediante la oxidación anódica del 1,4-dimetoxiarenos.^[160]



3. 4.1. SINTESIS DE AZO-BODIPY CABEZA DE SERIE

La ruta sintética comienza con la síntesis del 3,5-dicloro-BODIPY **1**.^[161] Para ello se sintetizó primero el fenilpirrometano **23** siguiendo la metodología descrita en la bibliografía en la cual se produce una reacción de condensación entre el benzaldehído y el pirrol, empleando agua y cloruro de hidrógeno. Tras cuatro horas de reacción el compuesto **23** se filtró y purificó mediante cromatografía en columna dando lugar al producto deseado con un 80% de rendimiento (Esquema 3. 4. 1. 1).^[162]



^[160] D. R. Henton, R. L. McCreery, J. S. Swenton, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 371.

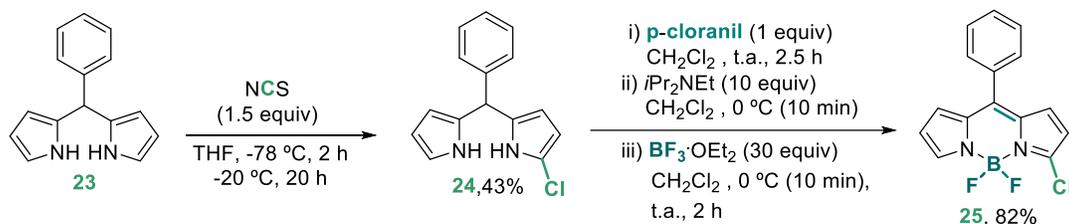
^[161] T. Rohand, E. Dolusic, T. H. Ngo, W. Maes, W. Dehaen, *Arkivoc*, **2007**, *X*, 307.

^[162] Aunque el procedimiento descrito en la bibliografía indica que no es necesario llevar a cabo ninguna purificación adicional, el espectro de ¹H-RMN del crudo de reacción en nuestro caso mostraba las señales correspondientes al producto deseado junto con otros subproductos con estructura de pirrol, siendo necesaria su purificación y obteniendo un rendimiento inferior al descrito.

Una vez obtenido el dipirrometano **23**, continuamos con la síntesis secuencial del BODIPYs, que constaba de tres etapas. Primero, la cloración de las posiciones alfa del dipirrometano, seguida de la oxidación a dipirrometeno y, por último, la formación del Boro derivado final de BODIPY.

La reacción de cloración se realizó siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía, mediante la adición de N-clorosuccinimida empleando THF como disolvente y bajo atmosfera inerte [163].

En el caso del producto monoclorado, la reacción se completó tras 2 horas agitando a -78 °C, y 16 h a -20 °C, obteniéndose el producto deseado **24**, con un 43 % de rendimiento tras purificación en columna cromatográfica. El esqueleto de BODIPY n se preparó siguiendo los protocolos descritos en la bibliografía, empleando *p*-cloranil como agente oxidante en CH₂Cl₂ anhidro y posterior reacción con BF₃·EtO₂. A continuación, el tratamiento consecutivo del crudo de reacción con *i*Pr₂NH (10. equiv.) a 0 °C durante 10 min, seguido por la adición de BF₃·OEt₂ (30 equiv.) condujo al 3,5-dicloro-BODIPY **25**, aislado con un rendimiento del 82% tras purificación mediante columna cromatográfica (Esquema 3. 4. 1. 2).

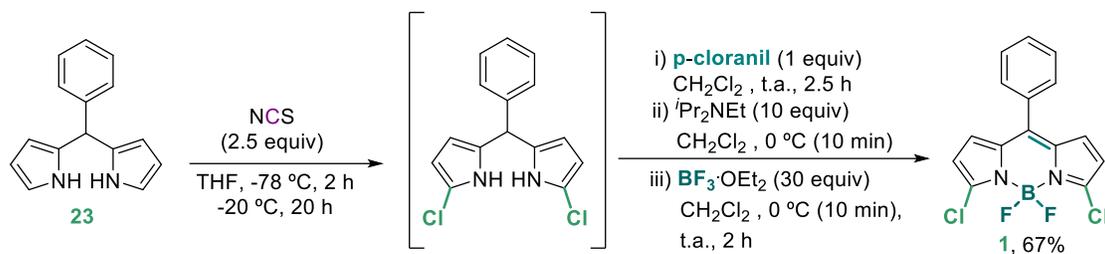


Esquema 3. 4. 1. 2

En el caso del producto diclorado, la reacción se completó tras 2 horas agitando a -78 °C, y 16 h a -20 °C, obteniéndose el producto diclorado **1** que pudo ser usado en el siguiente paso de reacción sin purificación adicional. El esqueleto de BODIPY n se preparó en “one-pot” siguiendo los protocolos descritos en la bibliografía, empleando *p*-cloranil como agente oxidante en CH₂Cl₂ anhidro y posterior reacción con BF₃·EtO₂. A continuación, el tratamiento consecutivo del crudo de reacción con *i*Pr₂NH (10. equiv.) a 0 °C durante 10 min, seguido por la adición de BF₃·OEt₂ (30 equiv.) condujo al 3,5-dicloro-BODIPY **1**, aislado con un

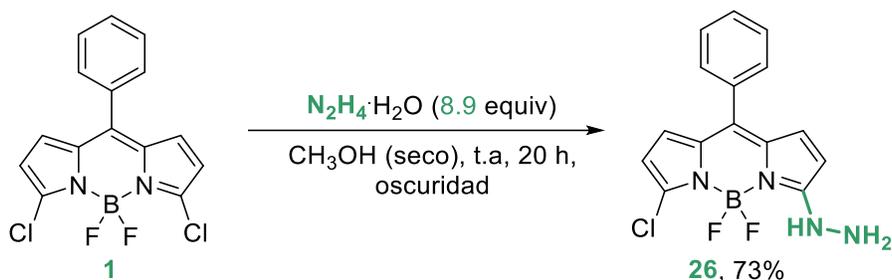
[163] a) M. Baruah, W. Qin, N. Basarić, W. M. De Borggraeve, N. Boens, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4152. b) M. Rajeswara Rao, K.V. Pavan Kumar, M. Ravikanth, *J. OrgMet. Chem.*, **2010**, *695*, 863.

rendimiento del 67% tras purificación mediante columna cromatográfica (Esquema 3. 4. 1. 3).



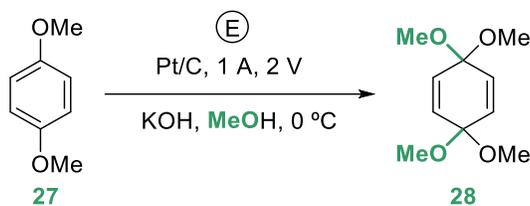
Esquema 3. 4. 1. 3

A continuación, preparamos el BODIPY sustituido con un grupo hidracina siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía, por reacción de **1** con hidracina monohidratada en exceso (8.9 equiv), MeOH seco como disolvente, a oscuridad y a temperatura ambiente durante 20 h [128]. Bajo estas condiciones se obtuvo la hidracina **26** con un 73% de rendimiento tras purificación mediante columna cromatográfica (Esquema 3. 4. 1. 4). Es importante resaltar que la hidracina-BODIPY **26** resultó ser poco estable, por lo que es aconsejable conservarla en atmosfera inerte o bien emplearla en la siguiente etapa de reacción una vez aislada.



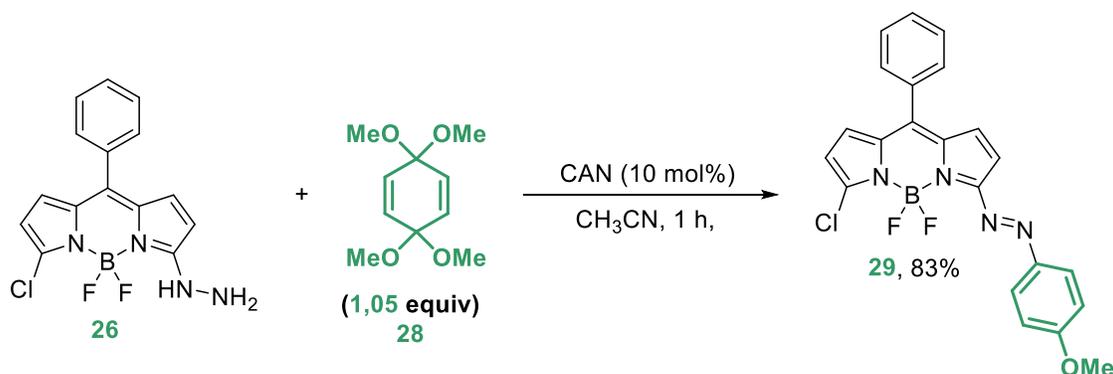
Esquema 3. 4. 1. 4

Por otro lado, se preparó el bisacetal de *p*-benzoquinona a partir del 1,4-dimetoxibenceno mediante la reacción de oxidación anódica, empleando la misma metodología descrita en el capítulo anterior de la presente tesis doctoral (Esquema 3. 4. 1. 5).



Esquema 3. 4. 1. 5

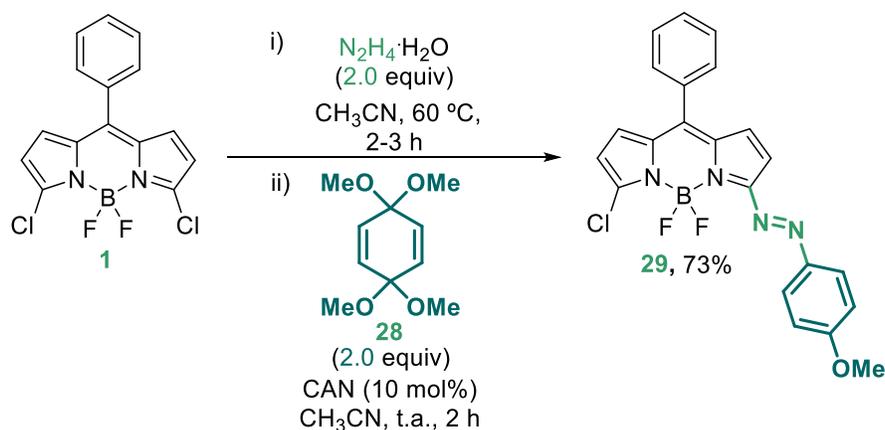
Una vez preparados ambos productos de partida, estudiamos la reacción entre el BODIPY-hidracina **26** y el bisacetal de quinona **28**, empleando CAN como catalizador (10 mol%) y MeCN como disolvente.^[Error! Marcador no definido.] La adición de CAN a una disolución que contenía una mezcla de BODIPY-hidracina **26** y bisacetal, se observó un cambio instantáneo del color de la disolución, de rojo a un azul marino. Tras una hora de reacción se obtuvo el 3-cloro-5-(*p*-metoxifenil)diazeno-azo-BODIPY **29** aislado con 83% de rendimiento (Esquema 3. 4. 1. 6).



Esquema 3. 4. 1. 6

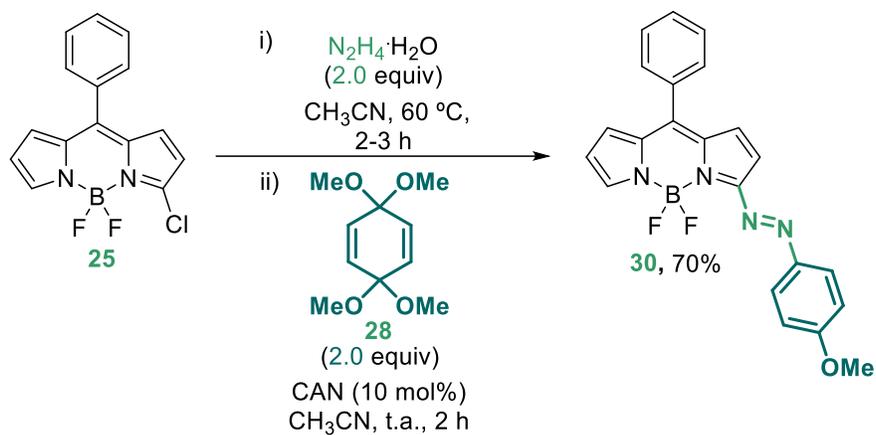
Teniendo en cuenta la inestabilidad del BODIPY **26** que posee un grupo hidracina, nos planteamos preparar del AZO-BODIPY **29** en un proceso “one-pot” a partir del 3,5-dicloro BODIPY, evitando el aislamiento de la hidracina-BODIPY intermedia. Para ello era preciso llevar a cabo la reacción del 3,5-dicloro BODIPY con la hidracina monohidrato seguida de la adición del bisacetal de quinona. Este proceso “one pot” requirió un breve proceso de optimización; en el que se cambió el disolvente, en este caso MeCN seco en lugar de metanol (ya que la segunda etapa de la reacción no es compatible con el empleo de disolventes que puedan actuar como nucleófilos), se aumentó la temperatura a 60 °C (debido a la baja solubilidad de la hidracina en MeCN) y se empleó una menor cantidad de hidracina monohidratada (2 equiv. para evitar posibles disustituciones debidas al calentamiento),

manteniendo las mismas condiciones de oscuridad y atmosfera inerte. El curso de la primera etapa de la reacción se siguió mediante TLC observando la desaparición del producto de partida y la aparición de un nuevo producto de color rojo. A continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de llevar a cabo la adición del bisacetal de *p*-benzoquinona y CAN (10 mol%). Al igual que en el caso anterior, tras la adición de CAN, el color de la disolución cambia de rojo oscuro a azul marino, lo que sugería la formación del azo. Siguiendo este protocolo, el 3-cloro-5-(*p*-metoxifenil)diazeno-BODIPy se obtuvo con un 73% de rendimiento aislado tras columna cromatográfica. Este nuevo rendimiento suponía una mejora del 10% frente a la síntesis secuencial y el ahorro de reactivos y un paso de purificación (Esquema 3. 4. 1. 7).



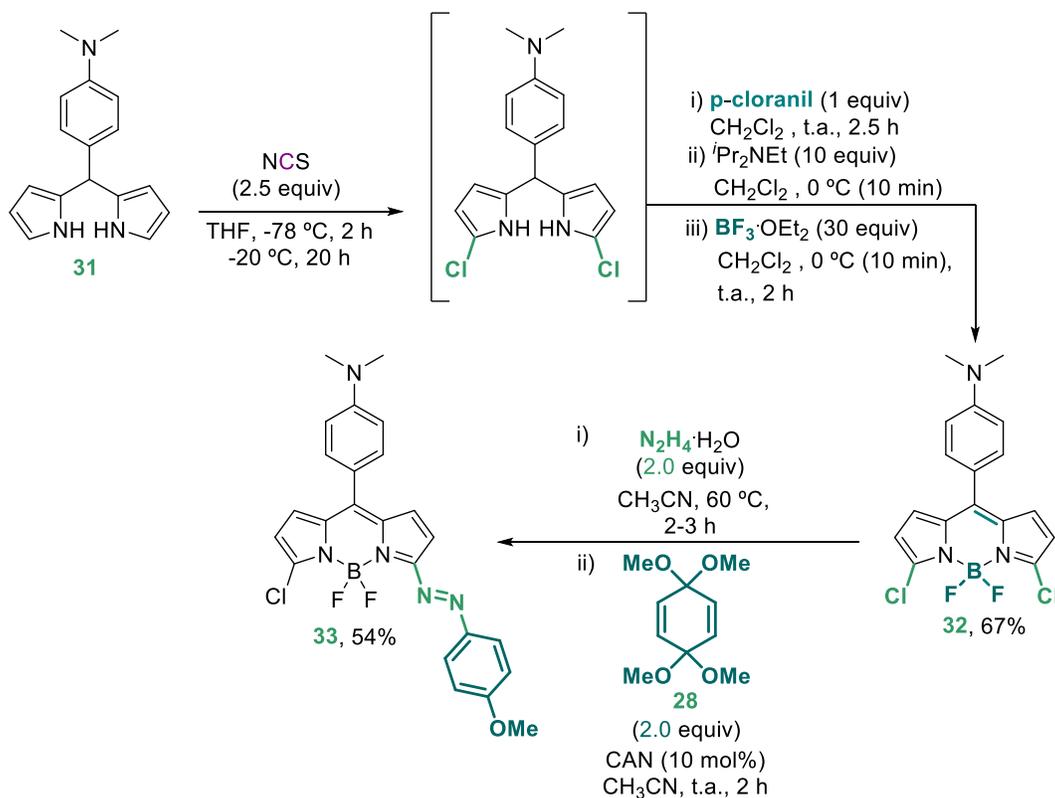
Esquema 3. 4. 1. 7

Empleando la misma metodología, a partir del BODIPy monoclorado 25, se obtuvo 3-(*p*-metoxifenil)diazeno-BODIPy 30 con un 70% de rendimiento aislado tras columna cromatográfica (Esquema 3. 4. 1. 8).



Esquema 3. 4. 1. 8

Siguiendo una ruta sintética similar, a continuación se preparó el BODIPY-AZO **33** más rico en electrones debido a la incorporación de un grupo dador (4-N,N-dimetilaminofenilo) en la posición C-8 del BODIPY. Para ello se empleó como producto de partida el 4-(N,N-dimetilamino)benzaldehído. Tras la formación del 3,5-dicloro-BODIPY, la reacción con la hidracina, seguida de la adición del bisacetal de la p-benzoquinona **28** y can condujo al BODIPY-AZO **33** con buenos rendimientos (Esquema 3. 4. 1. 9).



Esquema 3. 4. 1. 9

3. 4. 2. REACCIONES DE FUNCIONALIZACIÓN DEL ESQUELETO DE AZO-BODIPY

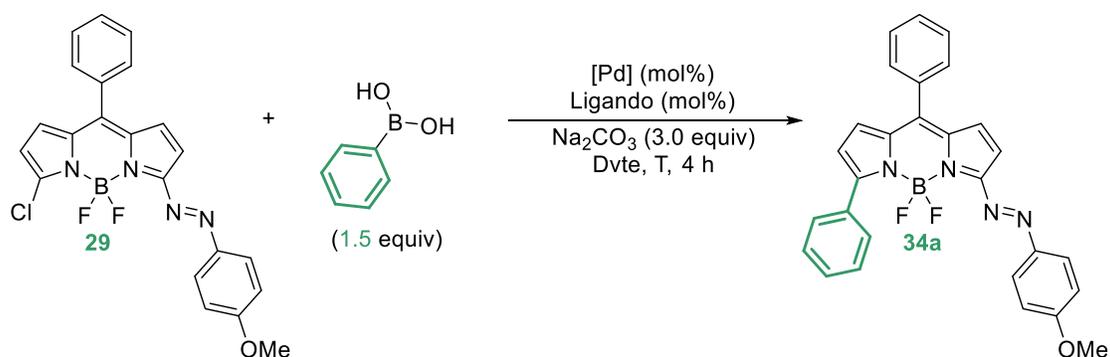
Con el fin de modular las propiedades fotocromáticas de estos BODIPY-AZO derivados, nos propusimos preparar una batería de compuestos a partir del 3-cloro-BODIPY-AZO 29 como cabeza de serie. Para ello se funcionalizó el esqueleto de BODIPY a través del átomo de cloro en posición α (C-3), mediante dos tipos de transformaciones: a) Reacciones de acoplamiento de tipo Suzuki y b) Reacciones de sustitución nucleófila.

I) Reacciones de acoplamiento de tipo Suzuki

Siguiendo las condiciones descritas por Boens y Dehaen,^[164] para acoplamientos de tipo Suzuki con cloro-BODIPYs análogos, en nuestro caso la reacción entre 29 y el ácido fenil borónico (1.3 equiv), empleando Pd(PPh₃)₄ (5 mol%) como catalizador y tolueno como disolvente a reflujo, dio lugar al producto deseado 5-fenil-3-(*p*-metoxifenil)diazeno-BODIPy 34a con un 13% de rendimiento. Con el fin de mejorar el rendimiento de la reacción, se llevó

[164] V. Leen, T. Leemans, N. Boens, W. Dehaen, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 4386.

a cabo un estudio con distintos catalizadores de paladio, ligandos y disolventes y temperaturas (Esquema 3. 4. 2. 1, Tabla 3. 4. 2. 1). El aumento de carga catalítica a un 10 mol%, así como el uso de otros disolventes tales como DME o Dioxano, no mejoró los resultados obtenidos. El empleo de otras fuentes de paladio como el Pd(dppp)Cl₂, Pd(acac)₂, XPhosPdG2, Pd(CH₃CN)₂Cl₂, Pd(dba)₃, Pd(dppf)Cl₂ fue completamente infructuoso (Tabla 3. 4. 2. 1, entradas 4-10). La combinación de Pd(OAc)₂ (10 mol%) como precatalizador con ligandos como P(^tBu)₃ o P(2-Furil)₃ (20 mol%) tampoco condujo al producto de acoplamiento deseado (Tabla 3. 4. 2. 1, entradas 11 y 12). Sin embargo, el empleo de P(2-OMePh)₃ (20 mol%) como ligando mejoró la conversión de la reacción a un 54%. La carga catalítica se pudo bajar a 5 mol% de catalizador de Pd(OAc)₂ y 10 mol% de ligando obteniendo un 60% de conversión (Tabla 3. 4. 2. 1, entrada 14). Finalmente, un aumento en la dilución (0.05M) condujo a los mejores resultados, obteniendo el compuesto 33a con un 80% de rendimiento aislado (Tabla 3. 4. 2. 1, entrada 15).



Esquema 3. 4. 2. 1

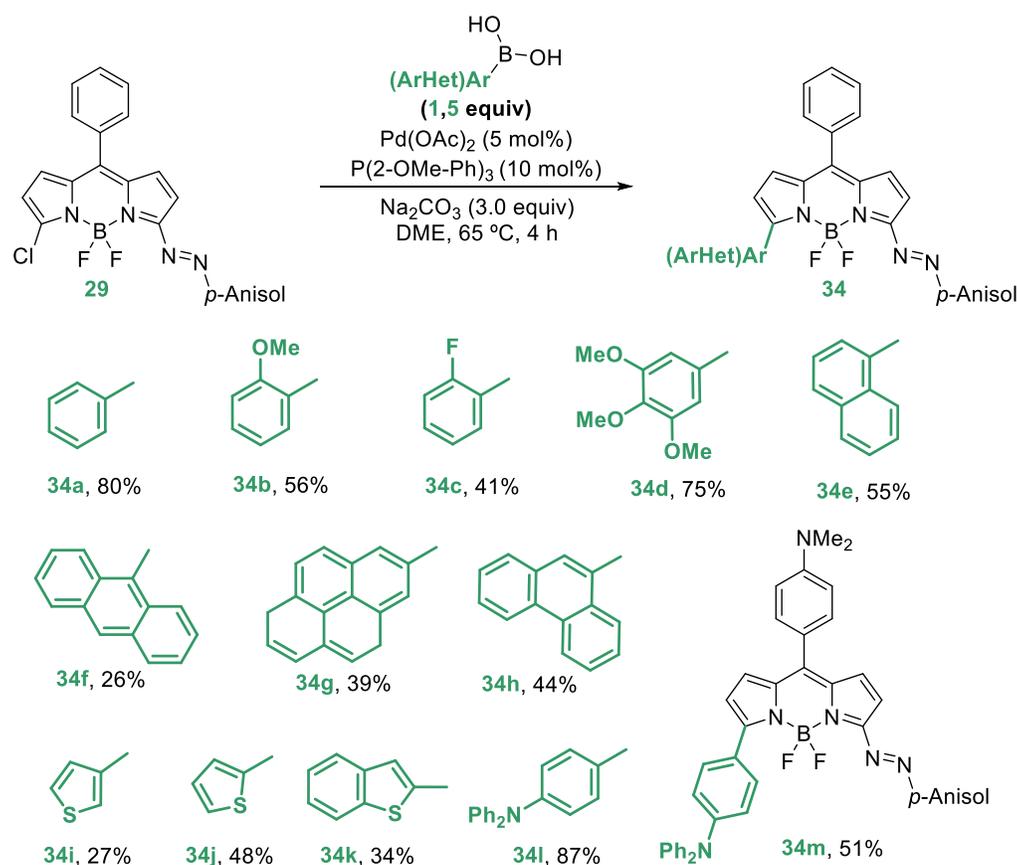
Tabla 3. 4. 2. 1

Entrada	[Cat]	%Cat/Ligando	Disolvente	T (C°)	M	%
1	Pd(PPh ₃) ₄	10	Tolueno	110	0.1	7 ^a
2	Pd(PPh ₃) ₄	10	Dioxano	110	0.1	6 ^a
3	Pd(PPh ₃) ₄	10	DME	65	0.1	14 ^a
4	Pd(acac) ₂	10	DME	65	0.1	-
5	Pd(dppe)Cl ₂	10	DME	65	0.1	-
6	Pd(dppp)Cl ₂	10	DME	65	0.1	-
7	XPhosPdG2	10	DME	65	0.1	12 ^a
8	Pd(CH ₃ CN) ₂ Cl ₂	10	DME	65	0.1	12 ^a
9	Pd(dba) ₃	10	DME	65	0.1	21 ^a
10	Pd(dppf)Cl ₂	10	DME	65	0.1	26 ^a
11	Pd(OAc) ₂ /P(^t Bu) ₃	10	DME	65	0.1	-
12	Pd(OAc) ₂ /P(2-Furyl) ₃	10	DME	65	0.1	-

13	Pd(OAc) ₂ /P(2-OMePh) ₃	10/20	DME	65	0.1	54 ^b
14	Pd(OAc) ₂ /P(2-OMePh) ₃	5/10	DME	65	0.1	61 ^b
15	Pd(OAc) ₂ /P(2-OMePh) ₃	5/10	DME	65	0.05	80 ^b

Estudio de optimización del acoplamiento de tipo Suzuki. ^a Rendimiento determinado mediante análisis de ¹H-RMN del crudo de reacción empleando un patrón interno. ^b Rendimiento aislado.

Una vez optimizadas las condiciones de reacción, se amplió el alcance estructural empleando diferentes ácidos borónicos, aromáticos y heteroaromáticos, con distintas propiedades electrónicas. Como puede verse en el Esquema n, en todos los caso se obtuvieron los 3-aryl(heteroaryl)-5-(*p*-metoxifenil)diazeno-BODIPys deseados, con rendimiento de moderados a buenos (30-87%) (Esquema 3. 4. 2. 2).



Esquema 3. 4. 2. 2

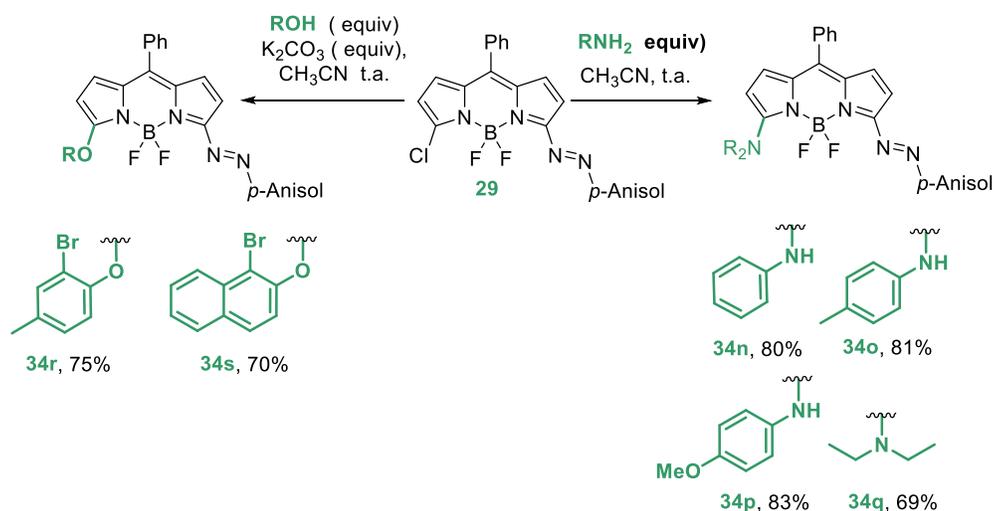
La reacción con ácidos borónicos aromáticos sustituidos con grupos dadores, como restos 4-metoxi, 3,4,5-trimetoxi o 4-N,N-difenilamino, condujo a los correspondientes BODIPYAZOS 34b, 34d y 34l con un 56, 75 y 87% de rendimiento respectivamente. El ácido

orto-fluorofenil borónico condujo al producto de acoplamiento con un 41% de rendimiento. La introducción de hidrocarburos aromáticos condensados de tipo antraceno, fenantreno y pireno también dió lugar a los correspondientes BODIPYs **34e-h**, con unos rendimientos de 26-80%. También se prepararon BODIPYAZOS portadores de restos heteroaromáticos, tales como el 2-benzotiofeno, el 2-tienil y 3-tienil, si bien en estos casos se obtuvieron rendimientos moderados del 34%, 48% y 34% respectivamente.

La reacción de acoplamiento entre el BODIPY-AZO **33** más rico en electrones y el ácido 4-N,N-difenilamino borónico también condujo al producto de acoplamiento **34m** con un 51% de rendimiento.

II) Reacciones de sustitución nucleófila

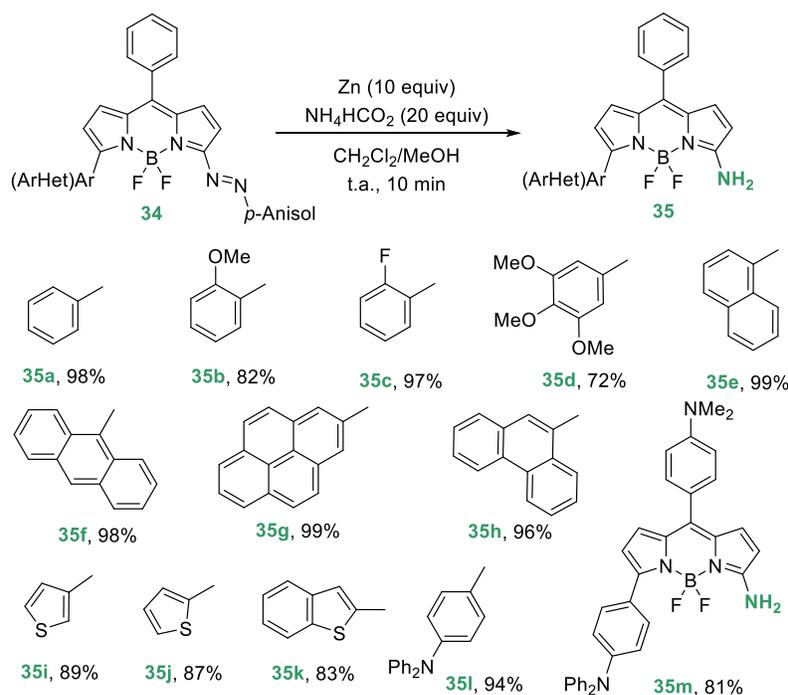
Las reacciones de sustitución nucleófila aromática se llevaron a cabo con distintas aminas, empleado MeCN como disolvente a temperatura ambiente y con distintos alcoholes aromáticos, empleando K_2CO_3 como base.^[128] La reacción del 3-cloro-BODIPY-AZO **29** con la anilina, *p*-toluidina, *p*-anisidina y la dietilamina condujo a los correspondientes 3-amilamino-5-(*p*-metoxifenil)diazeno-BODIPYs **34n** (80%), **34o** (81%), **34p** (83%) y **34q** (69%) con excelentes rendimientos. La reacción con el 2-bromo-4-metilfenol y el 2-bromonaftol condujo a los éteres correspondientes **34r** y **34s** con un 75 y 70% de rendimiento aislado respectivamente (Esquema 3. 4. 2. 3).



Esquema 3. 4. 2. 3

3. 4. 3. REACCIONES DE RUPTURA REDUCTORA DEL ENLACE AZO (N=N) DE LOS AZO-BODIPYS.

La ruptura reductora de los BODIPY-AZOs obtenidos anteriormente (34a-m) se realizó utilizando como sistema reductor Zn/NH₄HCO₂, ya que se este sistema había demostrado su eficiencia en este tipo de procesos.^[165] Empleando DCM como disolvente y la cantidad mínima de metanol necesaria para disolver el formiato amónico, tras 10 minutos bajo una agitación vigorosa, se observó como el color azul oscuro de las disoluciones se tornó en disoluciones transparentes en tonos que variaron desde naranja al rojo. A continuación, se filtraron las disoluciones y tras ser eliminado el disolvente se procedió a su purificación mediante columna cromatográfica. En el caso de los BODIPY-AZO portadores de restos aromáticos y heteroaromáticos, se obtuvieron los correspondientes 3-amino-5-aryl(heteroaryl)-BODIPYs puros con excelentes rendimientos, en donde se observó la recuperación completa de la fluorescencia característica del esqueleto del esqueleto de BODIPY (Esquema 3. 4. 3. 1).

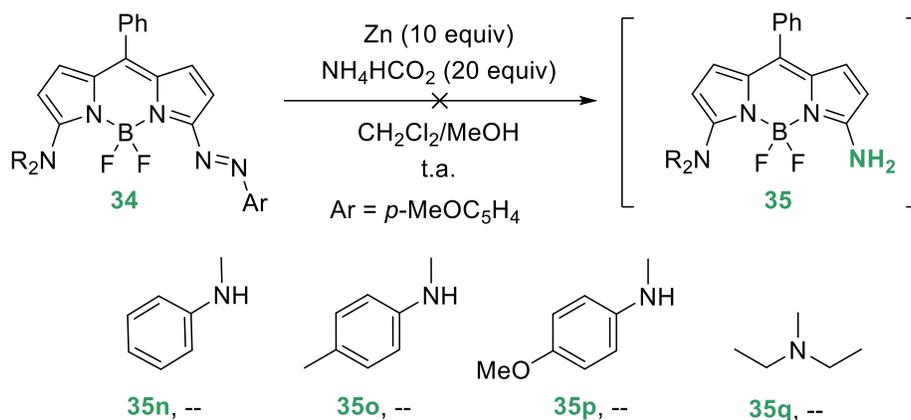


Esquema 3. 4. 3. 1

^[165] a) M. B. Sridhara, G. R. Srinivasa. D. C. Gowda. *Synthetic Communications*, **2004**, 34, 1441.; b) Bouillon, Marc E. and Meyer, Hartmut H. *Tetrahedron*, **2016**, 72, 3151.

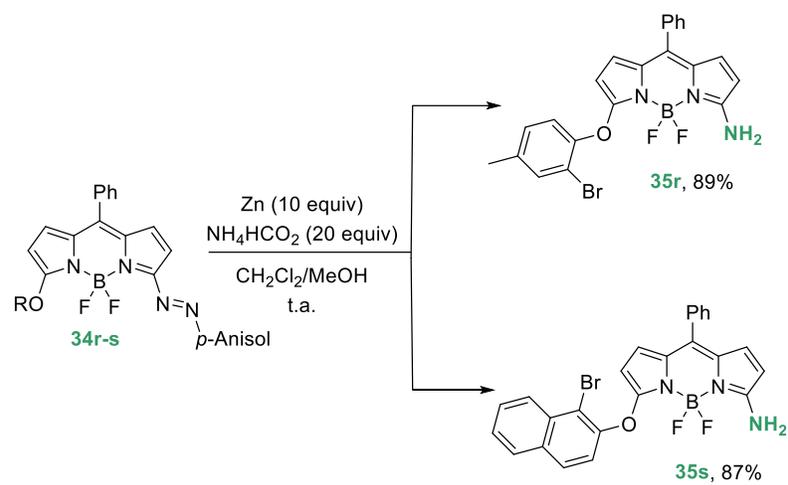
Sorprendentemente, al llevar al cabo la ruptura reductora con Zn/NH₄HCO₂ en los derivados obtenidos mediante la sustitución nucleófila del cloro por una amina (35a-d), se observó un cambio de color del medio de reacción, del azul oscuro característico de los BODIPY-AZO a un color fucsia. Este cambio iba asociado a la aparición de un nuevo compuesto (detectado por cromatografía en capa fina) del mismo color fucsia, que bajo el visor de 365 nm presentaba fluorescencia de color rojo. Sin embargo, cuando aplicamos el protocolo estándar de aislamiento el producto evolucionaba nuevamente a un compuesto de color azul oscuro sin fluorescencia alguna, cuyo espectro de resonancia de ¹H-RMN no se correspondía con el BODIPY-AZO inicial. Tiempos de reacción más largos condujeron al mismo resultado.

Una posible explicación a estos resultados podría deberse a que la reducción en estos sistemas más ricos en electrones podría generar una hidracina intermedia que fuese más sensible a reoxidarse de nuevo en el medio de reacción y recuperar la agrupación azo. Sin embargo, esta explicación no explicaba que no se detectaran señales del producto de partida en el espectro de ¹H-RMN del crudo de reacción. En la reacción de reducción del compuesto 35n, el análisis del crudo de reacción sí que se pudo detectar las señales de la anisidina (subproducto de la reacción) y el BODIPY-NH₂ 35n correspondientes. Sin embargo, tras 5 minutos, el BODIPY-NH₂ 35n evolucionaba a un compuesto azul oscuro no fluorescente, que hasta el momento se ha podido identificar (Esquema 3. 4. 3. 2).



Esquema 3. 4. 3. 2

Con los derivados obtenidos como resultado de la sustitución nucleófila con alcoholes, 34r y 34s, la reacción de reducción siguiendo la misma metodología empleada anteriormente condujo a los BODIPYS-NH₂ 35r y 35s con buenos rendimientos (89 y 87%) (Esquema 3. 4. 3. 3).



Esquema 3. 4. 3. 3

3. 4. 4 PROPIEDADES FOTOFÍSICAS

3. 4. 4. 1 ESPECTROS DE UV-VIS Y EMISIÓN DE LOS BODIPY-AZOS.

Una vez obtenidos todos los derivados de BODIPY-AZO (34a-s) y las correspondientes aminas libres BODIPY-NH₂ (35a-s) se estudiarán sus propiedades fotofísicas, incluyendo los espectros de absorción de UV-vis y luminiscencia. Se prepararon las correspondientes disoluciones de los BODIPY-AZO (~10⁻⁵ M), empleando como disolvente CH₂Cl₂. Los espectros de absorción de UV-vis de los compuestos 34 se recogen en la siguiente Figura 3. 4. 4. 1. 1. En todos los casos se observan claramente tres bandas de absorción principales, una en el rango de 230-240 nm, una segunda en torno a 325-430 nm, característica de transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los azobencenos y un máximo de absorción en el rango de 604-679 nm, característico de los esqueletos de BODIPY. La segunda banda de absorción por lo general tiene un mayor coeficiente de extinción (29122-82446 M⁻¹cm⁻¹) que la primera.

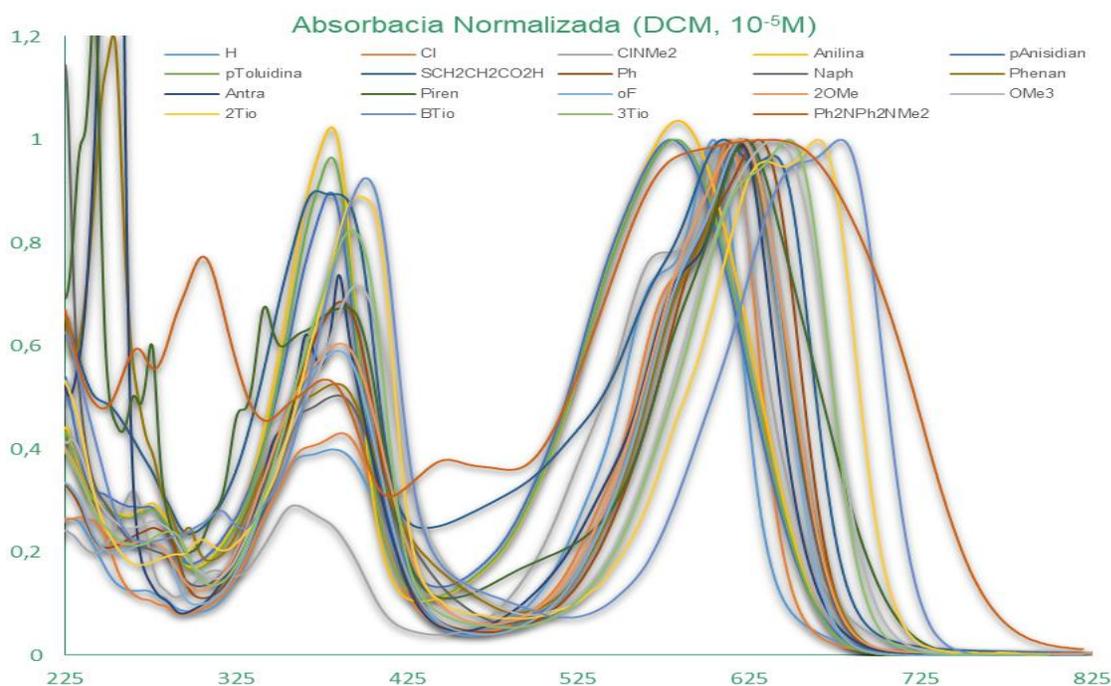


Figura 3. 4. 4. 1. 1

Entrada	Compuesto	R-	λ_{Abs}^{Max} (nm)	ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	Entrada	Compuesto	R-	λ_{Abs}^{Max} (nm)	ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)
1	30	H	604	82446	8	34b	2-OMePh	619	58367
2	34a	Ph	630	45047	9	34d	(OMe) ₃ Ph	640	58321

3	34e	Naftil	620	37064	10	34j	2-Tienil	665	20815
4	34h	Fenantrenil	620	31974	11	34i	3-Tienil	648	57968
5	34f	Antraceniil	620	63412	12	34k	2-BenzoTienil	679	29122
6	34g	Pirenil	623	44525	13	34l	Ph ₂ NPh	677	37558
7	34c	2-FPh	621	48326	14	34m	Ph ₂ NPh ^a	637	41865

^a Derivado con un *p*-N,N-dimetilaminofenilo en la posición C-8 del BODIPY-AZO

Para facilitar la visualización e interpretación de los datos espectroscópicos, se han recogido los espectros de UV-vis por grupos en función del patrón de sustitución, comparando cada familia con respecto al derivado 5-fenil-BODIPY-AZO **34a**, mostrado con una línea roja.

Los espectros de absorción de los derivados que poseen hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos en la posición C-5 (**34e-h**) junto con el BODIPY-AZO sin sustituyente en C-5 se indican en la **Figura 3. 4. 4. 1. 2**. Todos los derivados presentan un espectro muy similar. Comparando con el BODIPY-AZO **30** (R =H), el resto de derivados aril sustituidos presentan un claro desplazamiento batocrómico de su máximo de absorción (~ 20-30 nm), lo que es indicativo de un aumento de la conjugación del BODIPY-AZO con el sustituyente aromático en C-5. El 5-fenil derivado **34a** es el que presenta un máximo de absorción ligeramente más desplazado hacia el rojo. En el derivado pirenil sustituido **34g** se observan las mismas bandas que el resto de compuestos, a diferencia de la banda de absorción en torno a 230 nm que posee un mayor coeficiente de extinción.

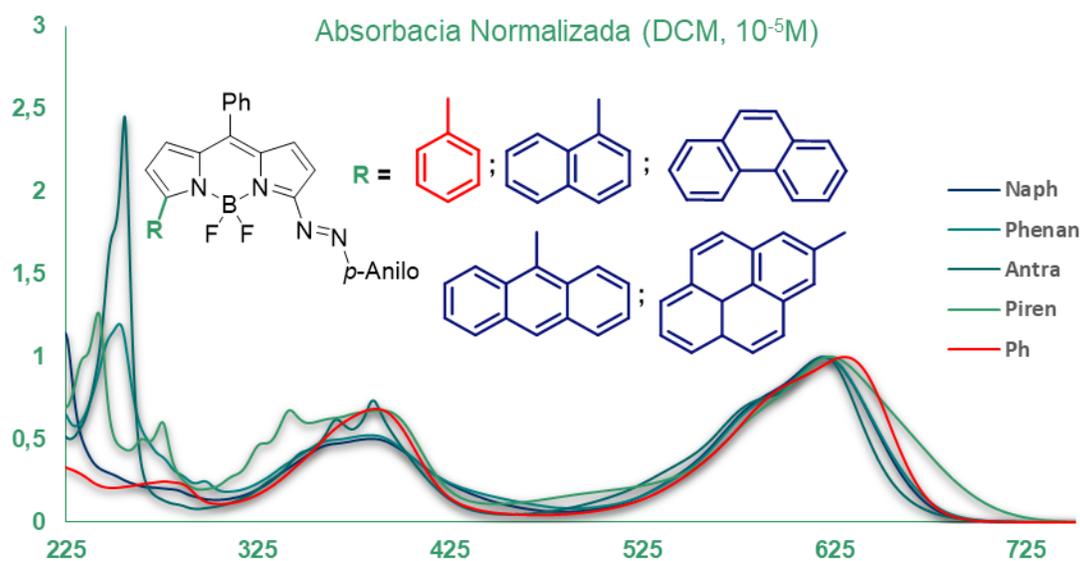


Figura 3. 4. 4. 1. 2

Entre los distintos derivados aril sustituidos (34b-d) no se observaron grandes diferencias siendo el derivado trimetoxi sustituido 34d el que presenta un mayor desplazamiento de su máximo de absorción hacia el rojo. En el caso de los otros dos derivados (34b-c), pese a ser de naturalezas electrónicas opuestas, ejercen la misma influencia en la absorbancia; es decir, un menor desplazamiento hacia el rojo que el fenilo sin sustituir. Esto podría deberse a la sustitución en la posición *orto* del anillo aromático que promueve una disposición angular entre el arilo y el BODIPY, rompiendo así toda conjugación e influencia de los sustituyentes presentes en el anillo aromático.

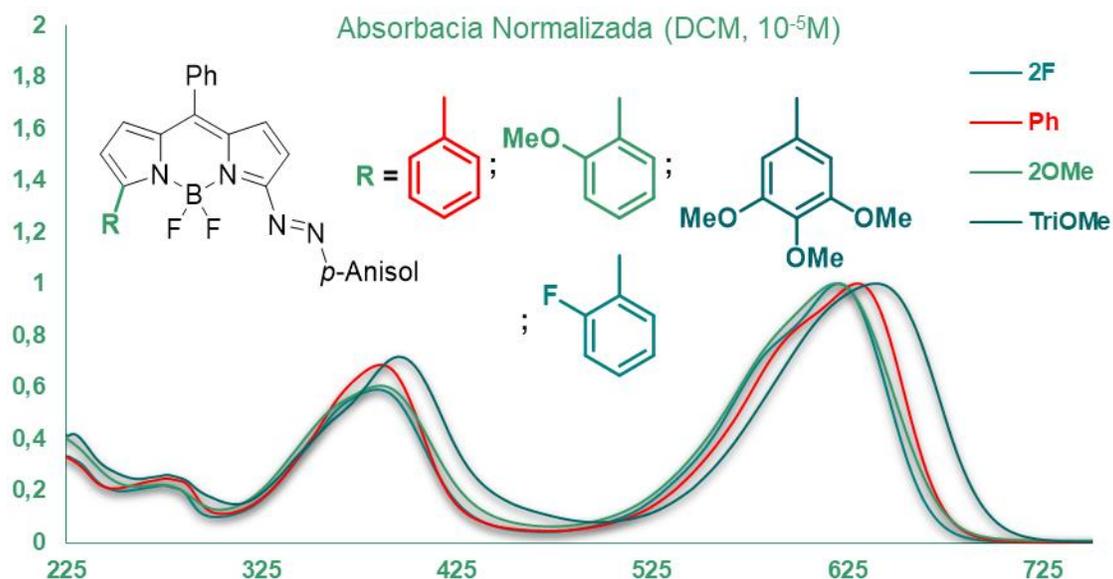


Figura 3. 4. 4. 1. 3

En el caso de los derivados sustituidos por tiofeno y benzotiofeno(34i-k) se puede observar como todos ellos presentan un mayor desplazamiento hacia el rojo, comparado con el fenil-Bodipy 34a. En concreto, el derivado de benzotiofeno 34k es el que presenta una banda de absorción más desplazada ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ de 679 nm), lo que podría atribuirse a una mayor conjugación, misma razón por la cual el 2-tienil sustituido aparece 17 nm más desplazado hacia el rojo que el 3-tienil sustituido.

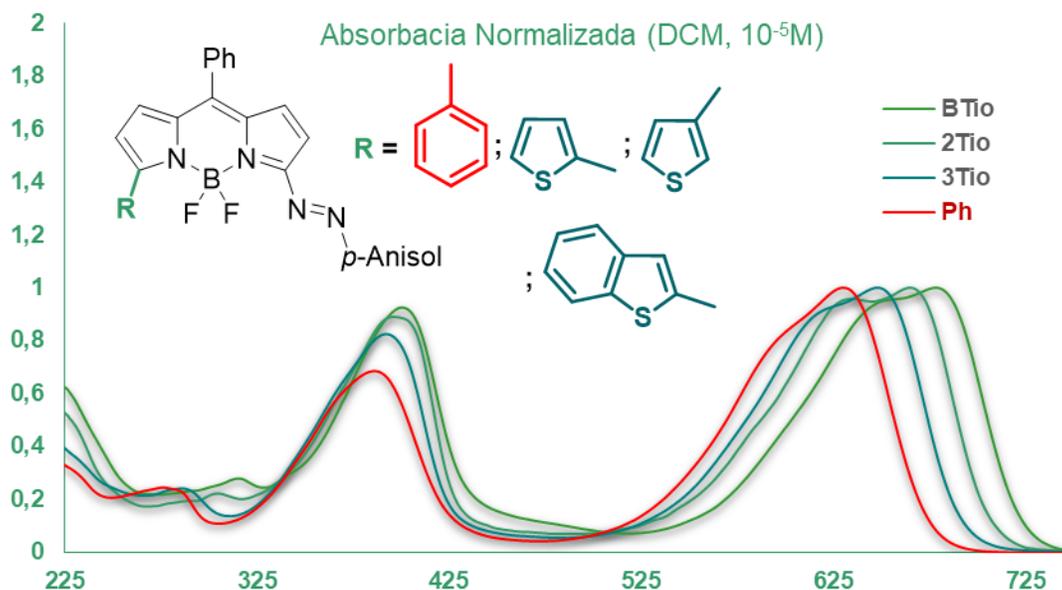


Figura 3. 4. 4. 1. 4

Los derivados de azo-BODIPYs sustituidos con restos de N,N-difenilaminofenil en las posición C-3 (34l y 34m) son los que presentan su máximo de absorción más desplazado hacia el rojo. Estos derivados presentan un máximo de absorción especialmente ancho que abarca gran parte del espectro visible. En el caso del derivado 34m, con un resto adicional de 8-N,N-dimetilaminofenilo, se puede observar como su máximo de absorción presenta una forma de meseta desde 580 nm hasta 660 nm.

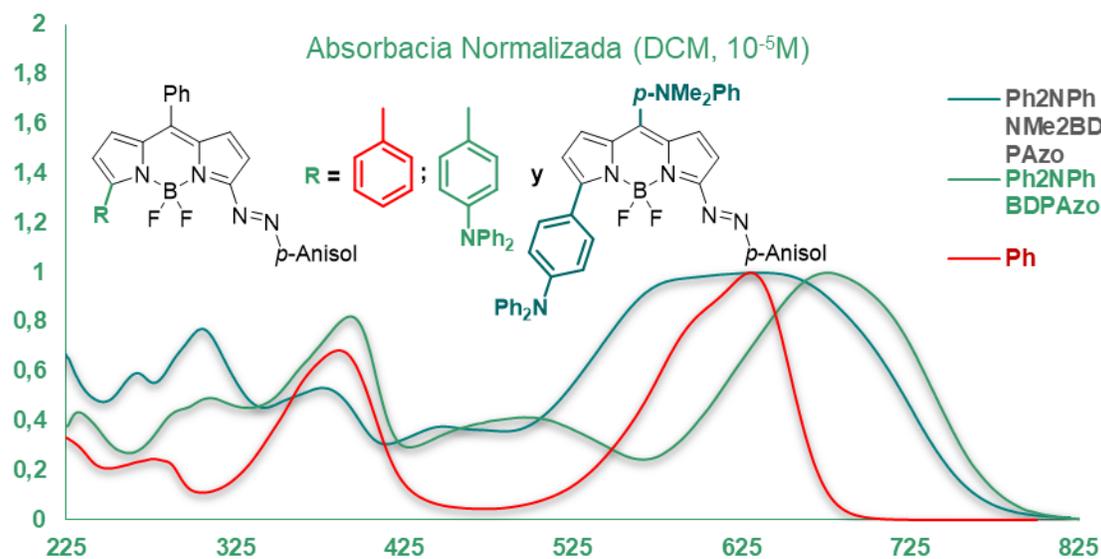


Figura 3. 4. 4. 1. 5

Los BODIPY 3-arilamino y 3-arilalcoxi sustituidos (**34n-s**), presentan absorbancias prácticamente idénticas, a longitudes de onda inferiores con respecto al derivado de fenilo **34a**.

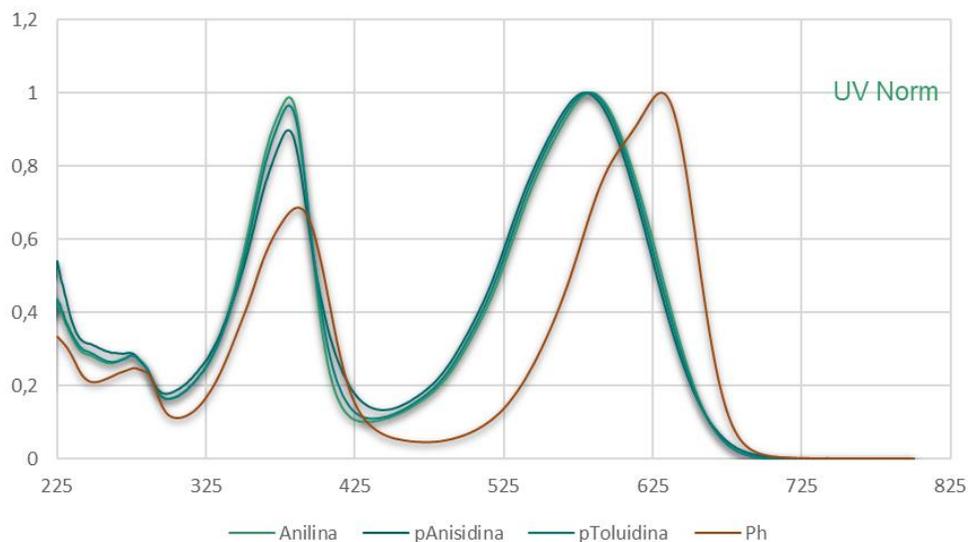


Figura 3. 4. 4. 1. 6

3. 4. 4. 2. ESPECTROS DE EMISIÓN DE LOS BODIPY-AZOS.

Para determinar la eficiencia con la que el grupo azo ($N=N$) estaba inhibiendo la fluorescencia del BODIPY, se llevó a cabo el estudio de la emisión de todos los derivados. Para ello se midió la fluorescencia excitando con la longitud de onda correspondiente a todas sus bandas de absorción, no observándose en ninguno de los casos fluorescencia alguna.

Con el fin de comprobar si se podían observar fenómenos de isomerización *E/Z* del doble enlace $N=N$, se estudió el proceso de fotoisomerización del grupo azo irradiando en la cubeta de UV-vis una disolución de BODIPY-AZO **34a** en CH_2Cl_2 (10^{-5} M) durante 1, 3, 5 y 10 minutos, con luz de $\lambda = 365$ nm. El proceso de fotoisomerización se siguió mediante sus espectros de absorción, así como mediante cromatografía de HPLC. Sin embargo, en ninguno de los casos se observó variación, desaparición o aparición de nuevas bandas o picos. También se irradiaron las muestras con luces de longitudes de onda menos energética, 430 nm (azul) y 530 nm (verde), pero al igual que con la luz UV no se observó ningún cambio. El hecho de no poder detectar nada del isómero Z en estos casos, podría indicar que ambos isómeros están involucrados en el proceso de inhibición de la fluorescencia. De forma que, aunque estemos irradiando selectivamente para formar el

isómero *Z*, internamente el sistema podría estar reisonerizando al isómero *E* como consecuencia de la transferencia de energía del BODIPY, reforzando el papel del azo como inhibidor de su fluorescencia.

3. 4. 4. 2. ESPECTROS DE UV-VIS Y EMISIÓN DE BODIPY-NH₂

Los espectros de absorción y emisión de los BODIPY-NH₂, derivados de la ruptura reductora (35a-m) se midieron empleando, nuevamente, DCM como disolvente ($\sim 10^{-5}$ M). En todos los casos se pudo observar que tras la ruptura del grupo azo, hay un desplazamiento hipsocrómico de las tres principales bandas de absorción. El máximo de absorción de los 3-amino-BODIPYS aparece en un rango de 480-530 nm, mientras que en sus homólogos azo esta ventana estaba situada en 600-680 nm. Este desplazamiento hipsocrómico se puede deber a la menor conjugación de estos BODIPY-amino derivados, comparados con los BODIPY-AZO. La banda de absorción característica de los azo derivados que aparecía en torno a los 325-425 nm desaparece, apareciendo una nueva banda en torno a los 300-325 nm que puede corresponder a transiciones de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ de los sistemas aromáticos presentes en la estructura. Todos los derivados con el grupo NH₂ libre estudiados presentaban luminiscencia. Los espectros de emisión se obtuvieron excitando cada compuesto a la longitud de onda de su máximo de absorción. Las emisiones recogidas abarcan un rango de 120 nm, pasando de fluorescencias de $\lambda_{em} = 520$ nm para el derivado *n* (R = H) hasta $\lambda_{em} = 642$ nm (R = 4-(N,N-difenilamino)fenilo).

En la [Figura 3. 4. 4. 2. 1](#) se recogen todos los espectros de absorción y emisión los BODIPY-NH₂ y en la [Tabla 3. 4. 4. 2. 1](#) se detallan los máximos de absorción y emisión, junto con los coeficientes de extinción y los desplazamientos de Stokes (diferencia relativa entre el máximo de absorbancia y el de fluorescencia). **Separar esquema, con todas las absorbancias y emisiones es demasiado y no se ve nada.**

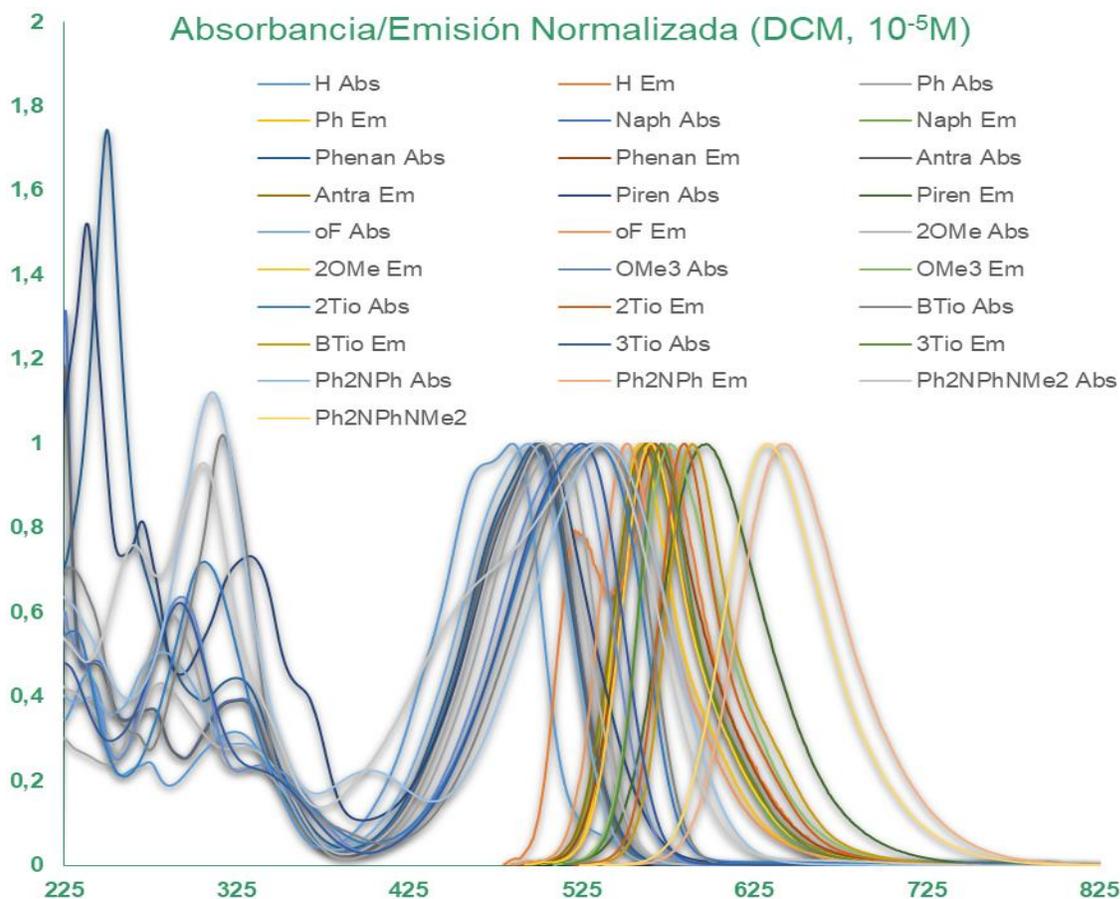


Figura 3. 4. 4. 2. 1

Tabla 3. 4. 4. 2. 1

Entrada	Compuesto	R-	λ_{Abs}^{Max} (nm)	ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	λ_{Em}^{Max} (nm)	Φ	Desplazamiento o Stokes (nm)	Desplazamiento o Stokes (cm ⁻¹)
1	-	H	487	48489	570	-	-	-
2	35a	Ph	511	35694	560	0.55	50	1751
3	35e	Naph	500	30676	562	0.33	63	2246
4	35h	Phenan	499	32008	567	0.47	68	2403
5	35f	Antra	500	37830	562	0.27	63	2246
6	35g	Piren	502	32864	597	0.55	95	3170
7	35c	oFPh	493	30833	552	0.27	59	2168
8	35b	oOMEPh	502	35854	565	0.24	63	2221
9	35d	(OMe) ₃ Ph	517	31106	576	0.7	59	1981
10	35j	2-Tienil	531	26645	585	0.95	54	1738
11	35i	3-Tienil	538	28391	571	0.85	33	1074
12	35k	2-BenzoTienil	525	32344	589	0.91	64	2070
13	35l	Ph ₂ NPh	538	28893	642	0.33	104	3011

14	35m	Ph ₂ NPh ^a	533	35059	633	0.42	100	2964
----	-----	----------------------------------	-----	-------	-----	------	-----	------

^aDerivado con un *p*-N,N-dimetilaminofenilo en la posición C-8 del BODIPY-AZO

Para facilitar la visualización e interpretación de los datos espectroscópicos, en los siguientes esquemas se muestran los derivados de BODIPY-NH₂ por grupos de familias en función del patrón de sustitución en C-5 y comparando cada grupo con el espectro del 5-fenil-BODIPY **35a** (línea azul).

Los espectros de absorción y de emisión de los BODIPY-NH₂ con hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos en C-5 (**35e-h**) y sin sustituir (**35x**, R = H) se recogen en la **Figura 3. 4. 4. 2. 2**. De forma análoga a los correspondientes BODIPY-AZO, el derivado de 5-fenil-BODIPY-NH₂ **35a** es el que presenta un máximo de absorción más desplazado hacia el rojo (508 nm). Cabe destacar que en el caso del derivado de pireno **35g**, su máximo de absorción se sitúa en 500 nm y el de emisión a 600 nm, lo que supone un aumentando considerable del desplazamiento de Stoke con respecto al resto de derivados de BODIPY-NH₂ de esta misma familia.

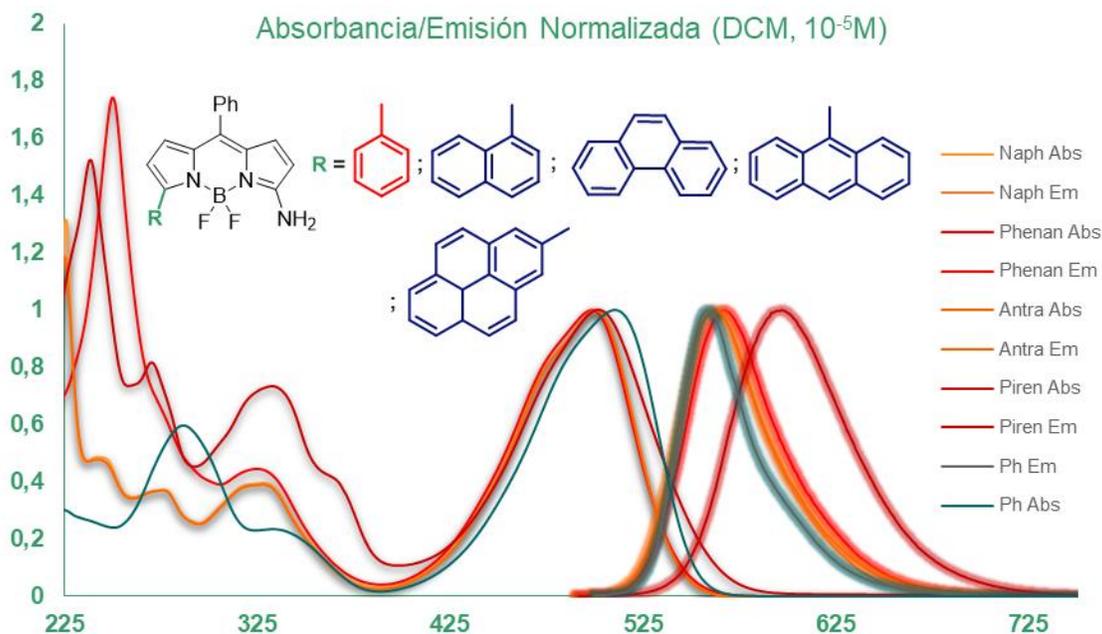
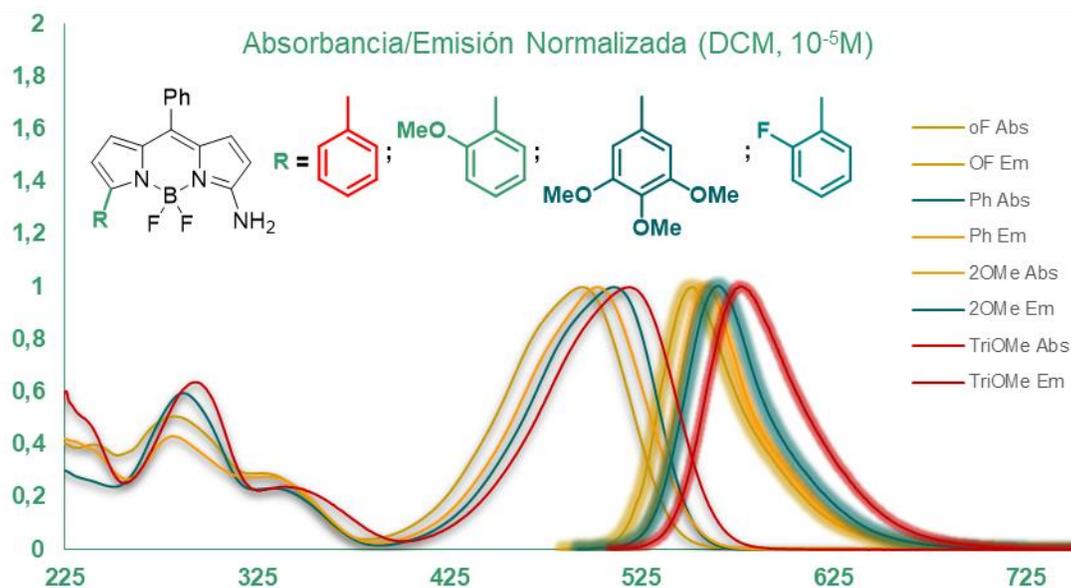
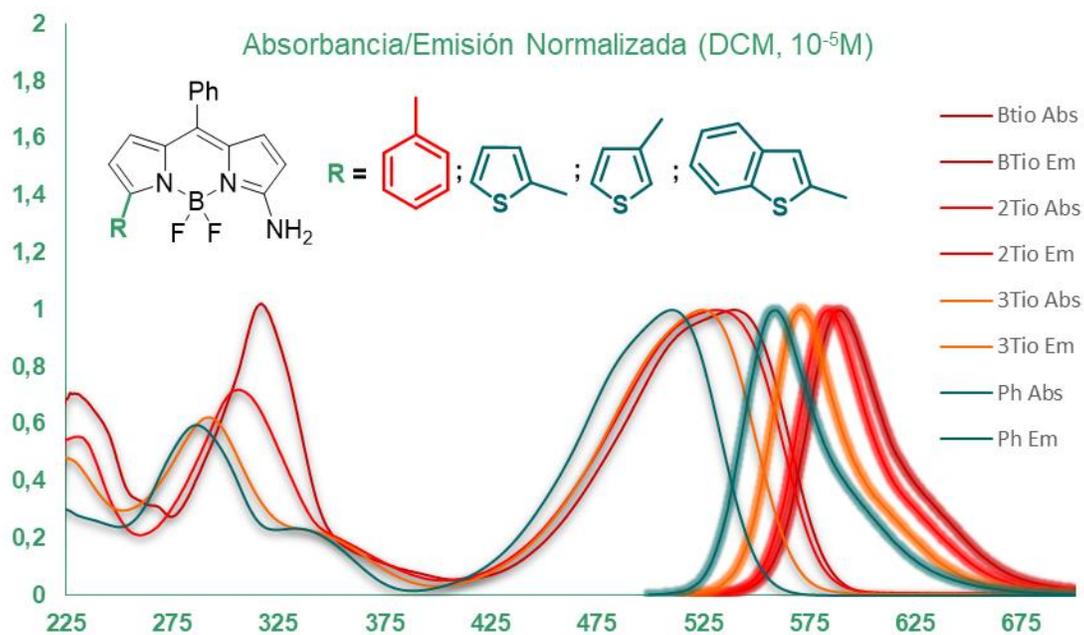


Figura 3. 4. 4. 2. 2

Los derivados 2-metoxi y el 2-fluorofenil sustituidos (**35b-d**) tienen su máximo de absorción ligeramente desplazado hacia longitudes de onda inferiores al fenilo, mientras que el 3,4,5-trimetoxi sustituido **35c** sufre un sutil desplazamiento batocrómico (**Figura 3. 4. 4. 2. 3**).



En el caso de los derivados sustituidos por tiofeno y benzotiofeno(35i-k) se sigue el mismo patrón marcado en los azo-BODIPYs, es decir, el orden en el desplazamiento hacia el rojo es benzotiofeno 35k, 2-tienil 35j y 3-tienil 35i. Sin embargo, en estos amino derivados la diferencia entre el benzotiofeno y el 2-tiofeno se ha recortado, tanto en la absorbancia como en la emisión.



Los 5-(N,N-difenilaminoefenil)-BODIPYs (**35l** y **35m**) presentan absorbancias prácticamente idénticas, a longitudes de onda superiores con respecto al derivado de fenilo (533 y 538 nm). En el caso de la fluorescencia, se observaba un desplazamiento de Stoke mayor (3011 cm^{-1} en el caso de **35l** y 2964 cm^{-1} para **35m**) que el que habitualmente poseen los BODIPYs, con fluorescencias de 642 nm para **35l** y 633 nm para **35m** respectivamente.

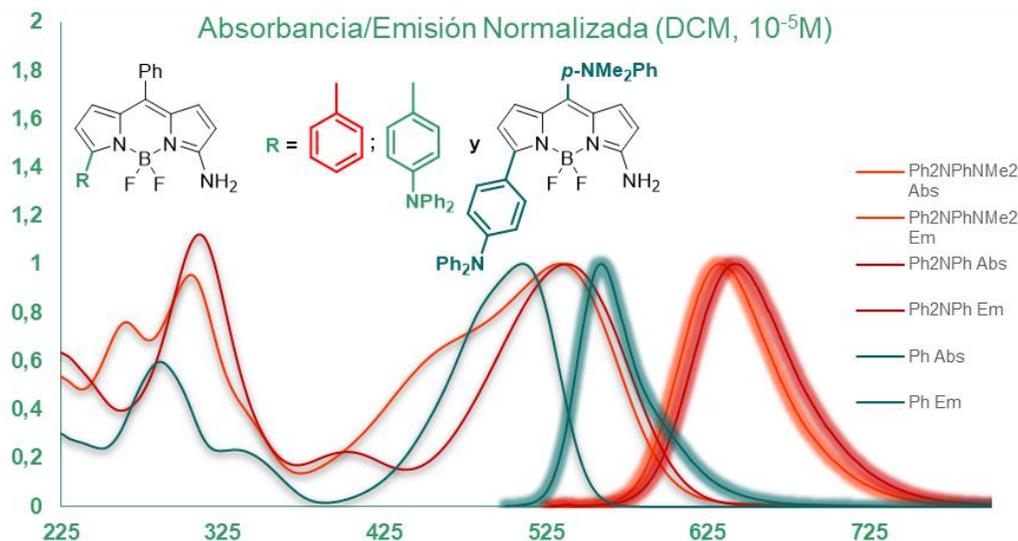


Figura 3. 4. 4. 2. 5

Desafortunadamente, los espectros de absorbancia y emisión de los 5-amilamino-BODIPY-NH₂ **35n-q** no se pudieron realizar, debido a la inestabilidad del producto resultante de la reducción.

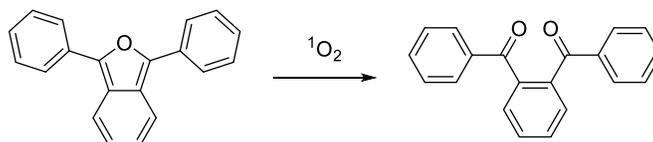
3. 4. 5. BODIPY-NH₂ COMO FOTOSENSIBILIZADORES.

Con el fin de evaluar el posible uso de estos nuevos BODIPYs como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica, se procedió a comprobar su capacidad generadora de oxígeno singlete.

Para ello se usó la 1,3-Difenilisobenzofurano (DFBF). Este compuesto reacciona con el oxígeno singlete, provocando la apertura del anillo de furano, dando lugar a la dicetona correspondiente [166]. Esta reacción puede seguirse de manera muy eficiente mediante espectroscopia de absorbancia, ya que el DBPF presenta una banda muy característica en

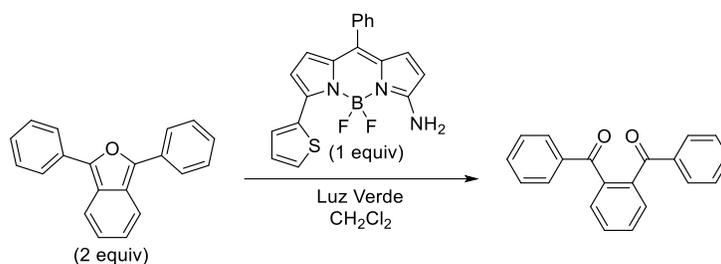
[166] M. Okamoto, F. Tanaka, H. Teranishi, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 669.

torno a 400 nm, la cual va disminuyendo en intensidad hasta su completa desaparición a medida que se va produciendo la apertura del anillo de furano.



Esquema 3. 4. 5. 1

Para ello se preparó una disolución del compuesto **35j** (1 equiv) y DFBF (2 equiv) en diclorometano (10^{-5} M). A continuación, la reacción se irradia con luz verde y se fueron recogiendo espectros de absorbancia a determinados tiempos de reacción. Tras únicamente 25 segundos se podía observar como la banda correspondiente al DPBF había desaparecido completamente mientras que las bandas del compuesto **35j** permanecían inalteradas.



Esquema 3. 4. 5. 2

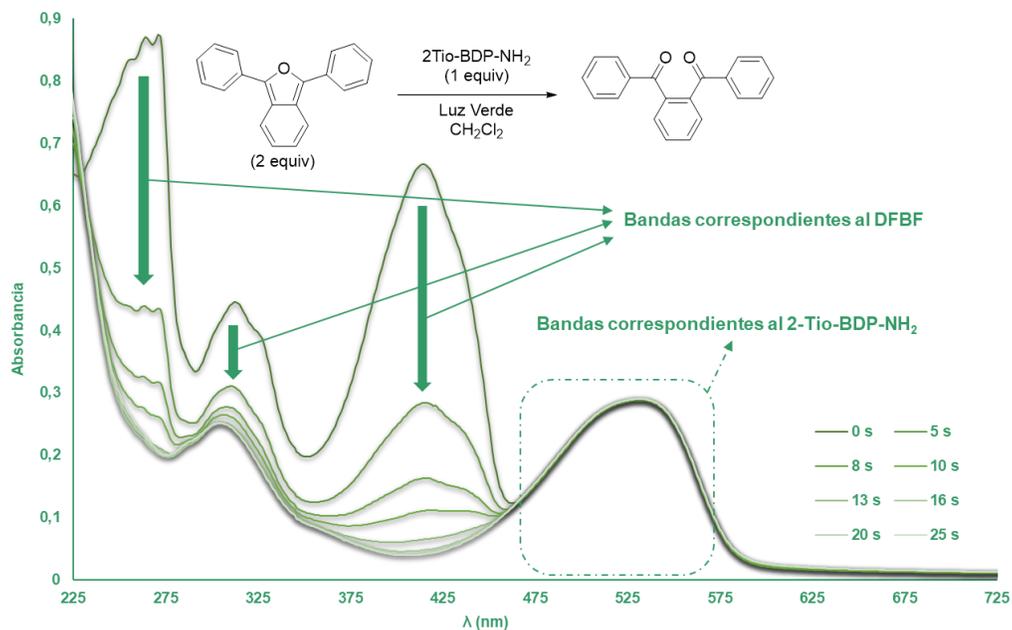
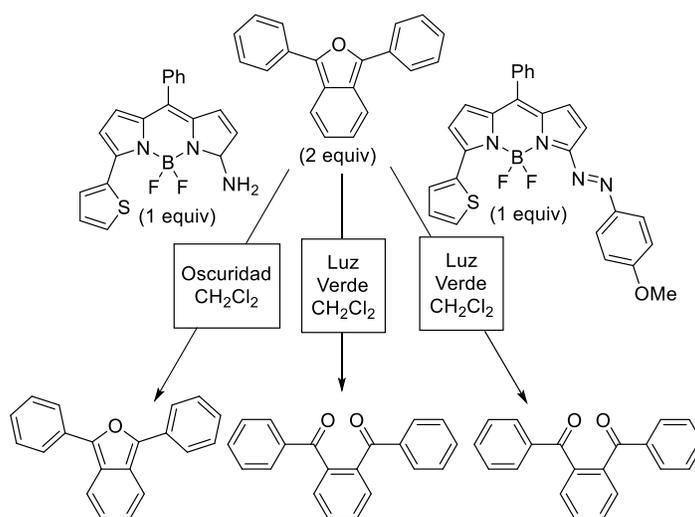


Figura 3. 4. 5. 1

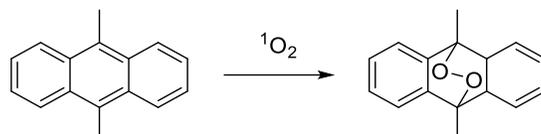
Para comprobar la influencia del compuesto **35j**, se pusieron al mismo tiempo una reacción control (únicamente el DFBF disuelto en diclorometano), una reacción usando como fotosensibilizador el BODIPAzó correspondiente **35j** y la misma reacción, pero en ausencia de luz. En los casos de la reacción control y en la que se usaba el BODIPAzó como fotosensibilizador, se observaba como las bandas correspondientes al DFBF disminuían su intensidad a un ritmo mucho más lento, mientras que en la reacción llevaba a cabo en la oscuridad no se observaba evolución alguna tras 1, 2, 6 y 24 horas.



Esquema 3. 4. 5. 3

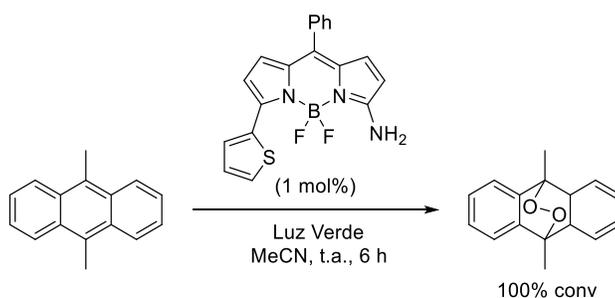
Todos estos datos apoyaban la formación de oxígeno singlete en presencia del compuesto **35j** al ser irradiado con luz verde.

Con el fin de confirmar la generación de oxígeno singlete, se llevó a cabo la oxidación del 9,10-dimetilantraceno. En este caso el oxígeno singlete produce una reacción de ciclo adición [4+2] con el sistema dieno del anillo central del antraceno dando lugar a un endoperoxido, el cual es perfectamente estable y se puede aislar y caracterizar.^[167]



Esquema 3. 4. 5. 4

Para ello se preparó una disolución 0.01 M del 9,10-dimetilantraceno en acetonitrilo. Posteriormente se añadió el 1 mol% de compuesto **35j** (1 mg) y la disolución resultante se dejó bajo agitación, a temperatura ambiente y bajo irradiación con luz verde (530 nm). La reacción se monitorizó mediante cromatografía en capa fina y tras 6 h de reacción se observó la desaparición completa del producto de partida. El disolvente se eliminó evaporándolo a presión reducida y se realizó un espectro de RMN de protón del crudo. Así se pudo establecer la formación del endoperoxido, así como las señales correspondientes a **35j** el cual permanecía inalterado. Esta prueba resultó concluyente y permite afirmar que el amino BODIPy derivado **35j** puede actuar como fotosensibilizador.

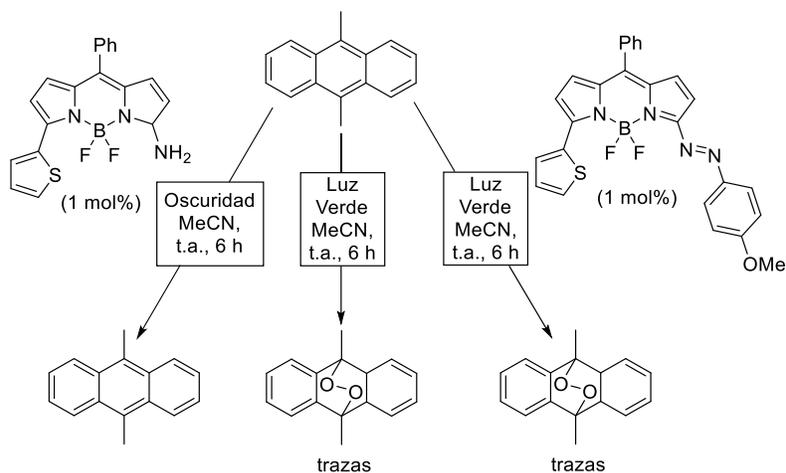


Esquema 3. 4. 5. 5

A pesar de este resultado se llevaron a cabo algunos ensayos en blanco para corroborar el efecto de **35j**. Así, una reacción control supuso irradiar el dimetilantraceno disuelto en

^[167] a) S. Alfaro, M. A. Valenzuela, E. Albitzer, *Photochem. Photobiomol. Sci.* **2015**, *14*, 597.; b) G. Günther, E. Lemp, A.-L. Zanocco, *Bol. Soc. Chil. Quim.* **2000**, *45*, 637.

acetonitrilo sin **35j**, una segunda reacción usando como fotosensibilizador el BODIPAZo correspondiente **35j** y la misma reacción, pero en la oscuridad. En los casos de la reacción control y en la que se usaba el BODIPAZo como fotosensibilizador, tras 6 horas de reacción, solo se observaron trazas del endoperóxido proveniente de la oxidación del 9,10-dimetilantraceno mientras que en la reacción llevada a cabo en la oscuridad se recuperaba el producto de partida inalterado.



Esquema 3. 4. 5. 6

Estos datos volvían a evidenciar como los BODIPYs-NH₂ eran capaces de generar oxígeno singlete mediante irradiación con luz verde, lo que les convertía en excelentes candidatos para ser usados como fotosensibilizadores.

3. 4. 6. ESTUDIOS BIOLÓGICOS

Los estudios biológicos llevados a cabo se dividen en dos partes. Por un lado, se realizaron los estudios de reducción enzimática de los BODIPY-AZOs, empleando azoreductasas con el fin de comprobar su comportamiento como futuras sondas fluorescentes de sistemas biológicos. Por otro lado, se estudió la toxicidad *in vitro* de esta nueva familia de BODIPY-AZOS y de sus derivados de BODIPY-NH₂, tanto en oscuridad, como en presencia de luz y se llevaron a cabo correspondientes estudios de localización subcelular de los BODIPY-NH₂ fluorescentes en condiciones de normoxia.

Los estudios de reducción enzimática se han realizado en colaboración con el grupo de Ingeniería Enzimática del Instituto de Catálisis del CSIC (Prof. Jose Manuel Guisán Seijas, Dpto de Biocatálisis, CSIC-UAM). Los estudios de toxicidad celular y localización han sido realizados por el Prof. Francisco Sanz-Rodríguez del Dpto. de Biología de la UAM.

3. 4. 6. 1 ESTUDIOS DE REDUCCIÓN ENZIMÁTICA

La aplicabilidad los BODIPAZos en el ámbito de la biomedicina, ya sea en marcaje celular o en terapia fotodinámica, está estrechamente relacionada con su ruptura en sistemas biológicos; es decir, es necesario comprobar que el grupo AZO de estas especies puede ser reducido de forma eficiente por acción de las enzimas.

Con el fin de comprobar la biocompatibilidad de los BODIPAZos sintetizados se llevaron a cabo dos estudios de reducción enzimática. En primer lugar, con una azoreductasa bacteriana y posteriormente con una azoreductasa humana que está presente en tumores sólidos, La elección de esta enzima se ha realizado en base a una futura aplicación de estos compuestos en células tumorales, en las que se podrían liberar los fluoróforos de BODIPY generados directamente en el interior de las células tumorales produciendo la fluorescencia deseada mediante excitación con una lámpara laser.

La reducción del enlace azo empleando sistemas de enzimas basadas en azoreductasa, constituye uno de los mecanismos de degradación y detoxificación más empleados en la industria ya que son biológicamente compatibles y respetuosos con el medio ambiente, además de mostrar una degradación completa de los colorantes azoicos.

Las azoreductasas son un grupo de enzimas ampliamente presentes en organismos bacterianos y eucariotas. Estas enzimas presentan pH variable, estabilidad térmica y una gran especificidad del sustrato. A pesar de ello, muchas son capaces de reducir, además de

colorantes azoicos, compuestos nitro-aromáticos (Liu y col., 2007a; Ryan y col., 2011; Prosser y col., 2013) y quinonas (Ryan y col., 2010b; Gonçalves y col., 2013; Ryan y col., 2014).

Las azoreductasas empleadas en el presente estudio son enzimas NADH-dependientes, ya que son capaces de dividir reductivamente los compuestos que contienen un enlace azo empleando como cofactor el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH). En la figura n se muestra la estructura de una azoreductasa bacteriana típica y un ejemplo del mecanismo de reducción de un medicamento azoico (olsalazina) mediante la acción de una azoreductasa flavin-dependiente (Figura n, A). La reducción de azos por parte de estas azoreductasas requiere del uso de NADH como donante de electrones en un mecanismo de cuatro electrones en el que un hidrógeno se transfiere del NADH al sustrato. La reducción de un sustrato azo requiere cuatro NADH por cada sustrato (Figura 2A). (Nakanishi y col., 2001; Binter y col., 2009; Wang y col., 2010).

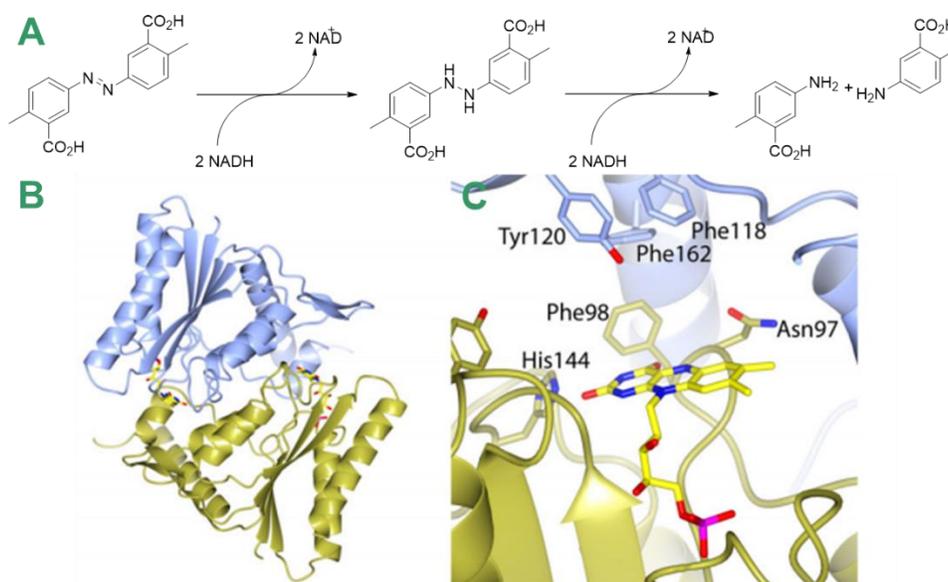


Figura 3. 4. 6. 1. 1: A) Mecanismo de reducción de un medicamento azoico (olsalazina) mediante una azoreductasa flavin-dependiente. B) Pliegue flavodin homodimérico característico de una clase 1 de azoreductasa bacteriana ecAzor. C) Vista detallada del centro activo de una ecAzor, los residuos que rodean el sitio activo se muestran con estructuras y están etiquetados. En B y C los monómeros están coloreados en azul y dorado. El FMN se encuentra representado con palos y los átomos de carbono en amarillo. En B y C se basan en la estructura de la ecAzor PDB 1V4B (Ito y col., 2006) y se generaron en CCP4MG (McNicholas y col., 2011).

3. 4. 6. 1. 2. AZOREDUCTASA BACTERIANA

Existen varias azoreductasas bacterianas descritas en la bibliografía y cuya secuencia se encuentra en la Base de Datos de Proteínas (Protein Data Bank). Para hacer una evaluación rápida y sencilla de la posible reducción de los azocompuestos preparados se utilizó una azoreductasa bacteriana con un amplio espectro de sustratos (de *Bacillus cereus*.) y los resultados más relevantes se compararán con los obtenidos con la azoreductasa humana.

La azoreductasa de *Bacillus cereus* (AzoRBC) es una enzima homodimérica de bajo peso molecular (21.5 kDa por cada subunidad). El pH óptimo es 6-7 y no es muy termoestable, siendo la temperatura óptima de 40 °C. La enzima es capaz de reducir una gran variedad de azocompuestos, algunos descritos en la bibliografía se encuentra representados en la siguiente figura. ^[168]

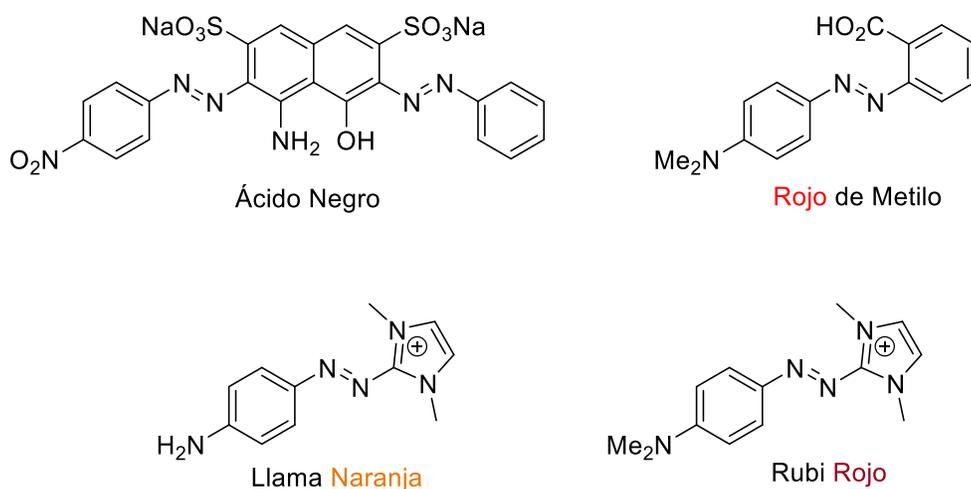


Figura 3. 4. 6. 1. 2. 1

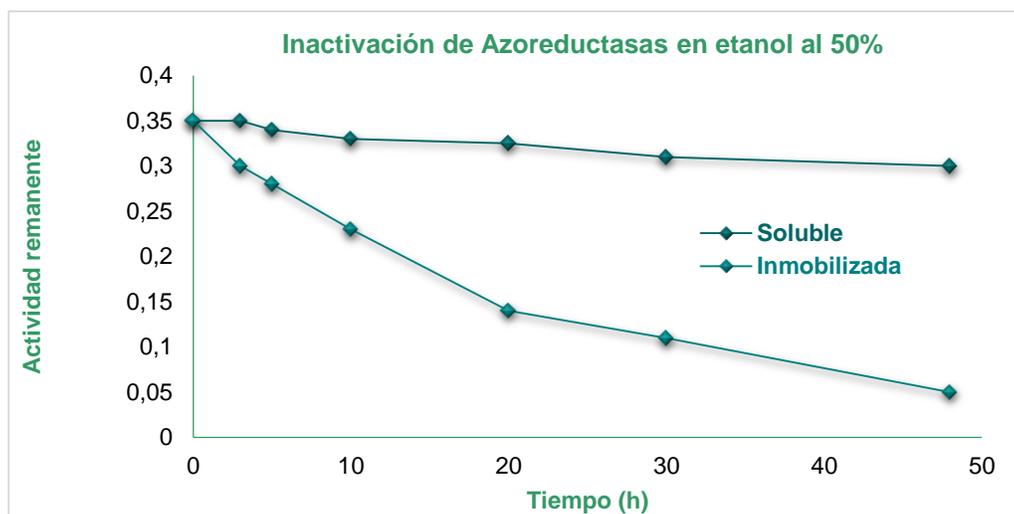
INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA

Para evaluar la reducción de los BODIPAZOS por parte de las enzimas, es necesario emplear concentraciones muy bajas $\approx 2.5 \mu\text{M}$) de los AZO compuestos debido a su baja solubilidad en el medio acuoso enzimático. Para aumentar la concentración de sustrato y determinar mejor las propiedades de fluorescencia de los productos en medios acuosos se emplearon mezclas agua-etanol que nos permiten aumentar 10 veces la concentración de sustrato y 10 veces más la concentración de producto reducido. Sin embargo, en estas mezclas agua-codisolvente las azoreductasas se agregan e inactivan, impidiendo la

[168]

reducción total de los substratos. Para evitar dicha inactivación, la enzima se inmoviliza sobre un soporte sólido (gel de agarosa) recubierto de polietilenimina (PEI).

La estabilidad comparativa entre la enzima soluble y la estabilizada incubada al 50% de etanol se encuentra representada en la [Figura 3. 4. 6. 1. 2. 2](#). Como se observa en la gráfica, la enzima soluble se inactiva rápidamente en etanol 50%, por lo que no sería viable para hacer ensayos de reducción largos (e.g 24 horas). Por el contrario, la enzima inmovilizada sobre agarosa-PEI es mucho más estable y conserva más del 90% de actividad después de 50 horas.



[Figura 3. 4. 6. 1. 2. 2](#)

La actividad de la azoreductasa se midió en función del cambio en el espectro de absorbancia del BODIPY-AZO inicial, en concreto en función de la disminución de la banda de absorción de 615 nm. La actividad de la enzima también se evaluó con el azocompuesto de referencia comercial rojo de metilo (430 nm). Como se puede observar en la [Figura 3. 4. 6. 1. 2. 3](#), la azoreductasa bacteriana es capaz de reducir completamente concentraciones moderadamente altas (25 μM) del BODIPY-AZO [34i](#) y del rojo de metilo disueltos en 50% de etanol.

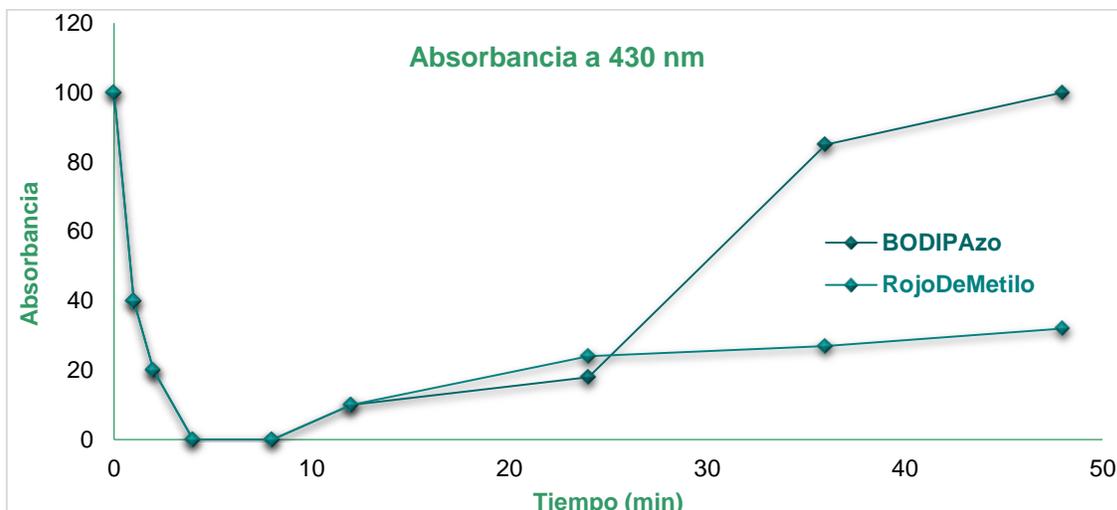


Figura 3. 4. 6. 1. 2. 3

Sorprendentemente, también se observa que la azoreductasa es capaz de re-oxidar los dos productos de la reacción para producir de nuevo el azocompuesto. Esto es posible porque el oxígeno disuelto en el medio de reacción es capaz de oxidar lentamente el NADH a NAD⁺ y este cofactor oxidado lo puede utilizar la enzima para revertir la reacción y catalizar la formación de azo-compuestos. Por ello, es necesario separar el biocatalizador y los productos de reacción inmediatamente después de acabar la reducción. Por otro lado, cabe destacar que hay escasa información en la bibliografía sobre la formación enzimática de enlaces nitrógeno-nitrógeno.

REDUCCIÓN DE DIFERENTES BODIPY-AZO.

En la [Tabla 3. 4. 6. 1. 2. 1](#) se recoge la velocidad de reducción a concentraciones moderadamente altas de diferentes azocompuestos catalizada por derivados inmovilizados de la azoreductasas bacteriana en presencia de 50% de etanol. La inmovilización de la enzima permite trabajar con concentraciones moderadamente altas de los azocompuestos. En la [Tabla 3. 4. 6. 1. 2. 1](#) se comparan la actividad de la enzima con los diferentes BODIPY-Azos, considerando como el 100% la actividad con rojo de metilo comercial (4). De esta forma, se puede evaluar que la enzima tiene una actividad superior para el caso de [29](#) (R = Cl, entrada 4), [34n](#) (R = anilina, entrada 12), [34p](#) (R = anisidina, entrada 13), [34a](#) (R = Ph, entrada 3), [34i](#) (R = 3-Tio, entrada 8), [34e](#) (R = 2-FluorPh, entrada 9). El valor más alto de actividad fue registrado para el compuesto [34p](#) con un 170%, mientras que con los derivados de [29](#) (R = Cl, entrada 4), [34d](#) (R = (OMe)₃Ph-, entrada 2), [34b](#) (R = 2-OMePh, entrada 5), [34k](#) (R = 2-BenzoTio, entrada 6), [34f](#) (R = Naph, entrada 10), [34o](#) (R = Toluidina, entrada

14) se obtuvieron actividades inferiores. En el caso de 34l (Ph_2NPh) y 34m ($\text{Ph}_2\text{NPhNMe}_2$) se observó la aparición de un precipitado por lo que no fue posible recoger ninguna medida (Tabla 3. 4. 6. 1. 2. 1, entradas 7 y 11).

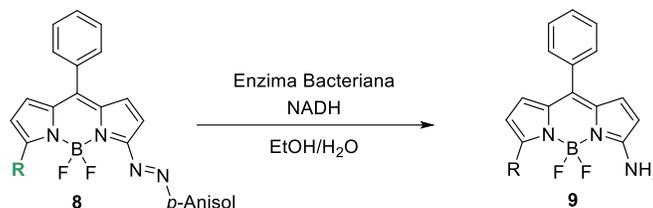


Tabla 3. 4. 6. 1. 2. 1

Entrada	Substrato	R-	$\lambda_{\text{Abs}}^{\text{Max}}$ (nm)	Actividad ^a	Porcentaje de actividad
1	Rojo Metilo	-	430	4	100
2	34d	(OMe) ₃ Ph-	630	2	51
3	34a	Ph	630	5	124
4	29	Cl-	608	3.2	80
5	34b	2-OMePh-	614	1.2	30
6	34k	2BenzoTio-	610	2.6	66
7	34l	Ph ₂ NPh-	-	-	-
8	34i	3-Tienil-	634	4.2	105
9	34c	2-FPh-	616	4.4	110
10	34f	Naph-	616	1.8	45
11	34m	Ph ₂ NPh- ^a	-	-	-
12	34n	Anilina-	572	4.8	120
13	34p	Anisidina-	578	6.8	170
14	34o	Toluidina-	580	1	23
15	34e	Antra-	610	5	125
16	34j	2Tio-	636	-	-
17	34h	Phenan-	614	-	--

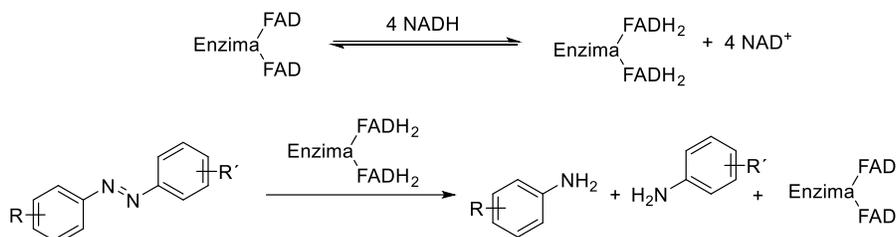
Disolución de sustrato al 25 μM usando como disolvente una mezcla al 50% etanol y agua. ^a μmoles de sustrato reducido por minuto por mg de enzima.

3. 4. 6. 1. 3. REDUCCIÓN CON AZOREDUCTASA HUMANA (NQO1).

Una vez comprobado que la azoreductasa de *Bacillus cereus* (AzoRBC) es capaz de reducir los BODIPAZOs sintetizados, liberando los BODIPY-NH₂, se continuo el estudio enzimático, esta vez, como una enzima de origen humano.

La NADH-quinona oxido-reductasa 1 (NQO1) es una enzima presente en todo tipo de organismos (bacterias, eucariotas, vertebrados, humanos). En los seres humanos está presente en un gran número de tumores sólidos. Es una enzima redox dependiente del

cofactor FAD (flavin-adenin-dinucleotido) cuyo mecanismo de acción para la reducción a partir de la transferencia de 4 electrones se encuentra representado en el siguiente esquema.



Esquema 3. 4. 6. 1. 3. 1

Esta enzima es capaz de catalizar la reducción (con cesión simultánea de 2 electrones) de quinonas, compuestos nitro-aromáticos y azo-derivados. La NQO1 humana es una enzima dimérica (con 30.000 kDa por subunidad) conteniendo 2 centros activos que son capaces de ceder 4 electrones para reducir los enlaces azo y convertirlos en dos aminas.

A diferencia con la AzoRBC, la reducción con la enzima humana NQO1 se llevó a cabo en medio completamente acuoso, por lo que la concentración de BODIPAzos con la que se realizó el estudio bajó de 25 a 2.5 μ M.

Los resultados recogidos en la [Tabla 3. 4. 6. 1. 3. 1](#) demuestran que la azo-reductasa humana es capaz de reducir una gran variedad de los derivados preparados. La actividad de la enzima bacteriana hacia el substrato rojo de metilo era de 4 μ moles de substrato reducido por minuto por mg de proteína, mientras que para la enzima humana era de 2 μ moles de substrato reducido por minuto por mg de proteína. Estos resultados se debían a las concentraciones muy bajas de substrato (2.5 μ molar) como consecuencia de la baja solubilidad de los azocompuestos en medio completamente acuoso.

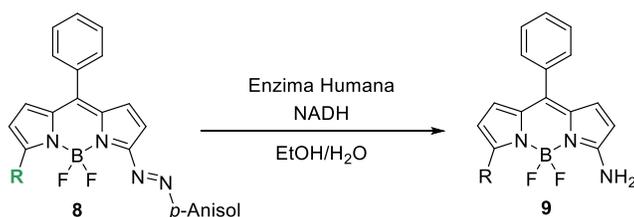


Tabla 3. 4. 6. 1. 3. 1

Entrada	Compuesto	R	λ_{Abs}^{Max} (nm)	Actividad ^a	Porcentaje de actividad
---------	-----------	---	----------------------------	------------------------	-------------------------

1	Rojo de Metilo	-	430	2	100
2	34d	(OMe) ₃ Ph-	630	1.4	70
3	34k	2-BenTio-	610	0.2	10
4	34i	3-Tio-	634	0.6	30
5	29	Cl-	608	1	50
6	34e	Antra-	610	3.4	170
7	34b	2-OMePh-	614	1	50
8	34c	2-FPh-	616	0.5	25

Disolución de sustrato al 2.5 μ M usando como disolvente agua. ^a μ moles de sustrato reducido por minuto por mg de enzima.

3. 4. 6. 1. 4. COMPARATIVA DE LA ACTIVIDAD DE LAS DOS AZOREDUCTASAS

Las actividades de ambas azoreductasas se compararon tomando como referencia del 100% la reducción del rojo de metilo (Tabla 3. 4. 6. 1. 4. 1, entrada 1). El estudio comparativo de la actividad de la enzima bacteriana y la humana, reveló que ambas enzimas exhiben una amplia especificidad, reduciendo varios azoderivados. Sin embargo, y como cabría esperar, las velocidades relativas de reducción de los diferentes azo-compuestos para las dos enzimas, son muy parecidas, pero no idénticas.

Tabla 3. 4. 6. 1. 4. 1

Entrada	Compuesto	R-	% Actividad ^a azoreductasa bacteriana	% Actividad ^a azoreductasa humana
1	Rojo de Metilo (430)	-	100	100
2	34d	(OMe) ₃ Ph-	51	70
3	34k	2-BenTio-	66	10
4	34i	3-Tio-	105	30
5	29	Cl-	80	50
6	34e	Antra-	125	170
7	34b	2-OMePh-	30	50
8	34c	2-FPh-	110	25

^a μ moles de sustrato reducido por minuto por mg de enzima.

Estos resultados son muy prometedores pues permitirían seleccionar los compuestos más idóneos (fluorescencia, solubilidad, mínima citotoxicidad cuando están sin reducir) sin muchas limitaciones debidas a la falta de actividad enzimática. La azoreductasa bacteriana se puede producir en grandes cantidades, con un bajo coste, y se puede purificar, inmovilizar y estabilizar con mucha facilidad. Por todo ello puede ser un buen modelo para estudiar la capacidad azo-reductora de la azoreductasa humana, presente en tumores sólidos.

3. 4. 6. 2 ESTUDIOS BIOLÓGICOS CELULARES

Los estudios biológicos se han realizado con la línea celular HeLa^[169] y los medios de cultivo se han preparado según se detalla en la parte experimental del presente capítulo, a partir de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 1% de antibióticos (Penicilina G [10.000 U/ml] y sulfato de estreptomicina [10.000 µg/ml] y 10% de SFB (Suero Fetal Bovino). Todo ello de *Thermo Fisher Scientific*®.

Para realizar estos estudios, se eligieron los 5-(2-tienil) derivado **34j** y **35j** como representantes de la familia de BODIPY-AZOS y de los BODIPY-NH₂. Esta elección se ha basado en las propiedades fotofísicas del BODIPY-NH₂ **35j**, ya que es uno de los derivados con mayor rendimiento cuántico (0.95) y con mejores emisiones en el rango del rojo (585 nm).

3. 4. 6. 2. 1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE BODIPY-NH₂

La localización subcelular del BODIPY-NH₂ **n** en células HeLa fue determinada mediante microscopía de fluorescencia considerando la emisión en rojo de este compuesto, que se obtuvo mediante su iluminación con luz verde ($\lambda = 545$ nm, filtro de excitación BP 545), luz azul ($\lambda = 450-490$ nm, filtro de excitación BP 490) y luz UV ($\lambda = 365$ nm, filtro de excitación UG-1).

La localización del BODIPY-NH₂ **35j** se realizó con distintas concentraciones (10 y 20 µg/ml) a partir de una disolución inicial del compuesto **35j** en DMSO. En todos los tratamientos además se realizaron dos controles: I) control sin droga (C) y II) control disolvente (C/DMSO), para ver el efecto de la cantidad de disolvente suministrada al cultivo celular junto con el compuesto a estudiar. Transcurridas 2 horas del tratamiento y retirado el medio de cultivo, se analizaron los distintos tratamientos en el microscopio de fluorescencia.

En las células tratadas con dos concentraciones del BODIPY-NH₂ **35j** (10 y 20 µg/ml) se pudo observar que cuando se iluminaban con luz UV, azul o verde se obtenía una señal roja a modo de punteado citoplásmático, semejantes a vesículas del sistema de endomembranas, En estos ensayos se observó una pequeña diferencia en cuanto a la

^[169] Linaje celular humano más antiguo y más utilizado en investigación. Procedentes de células epiteliales de cáncer cervicouterino obtenidas el 8 de febrero de 1951 de una paciente llamada Henrietta Lacks (de ahí el acrónimo He{nrietta} La{cks}) quien falleció el 4 de octubre de ese mismo año debido al cáncer. Obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC® CCL-2™), son inmortales (en cuanto a longevidad se refiere) y pueden cultivarse en el laboratorio de forma constante.

concentración del fotosensibilizador incorporado, de manera que, a concentraciones más bajas, la señal roja era menos intensa, y aparecía un número menor de punteados citoplasmáticos.

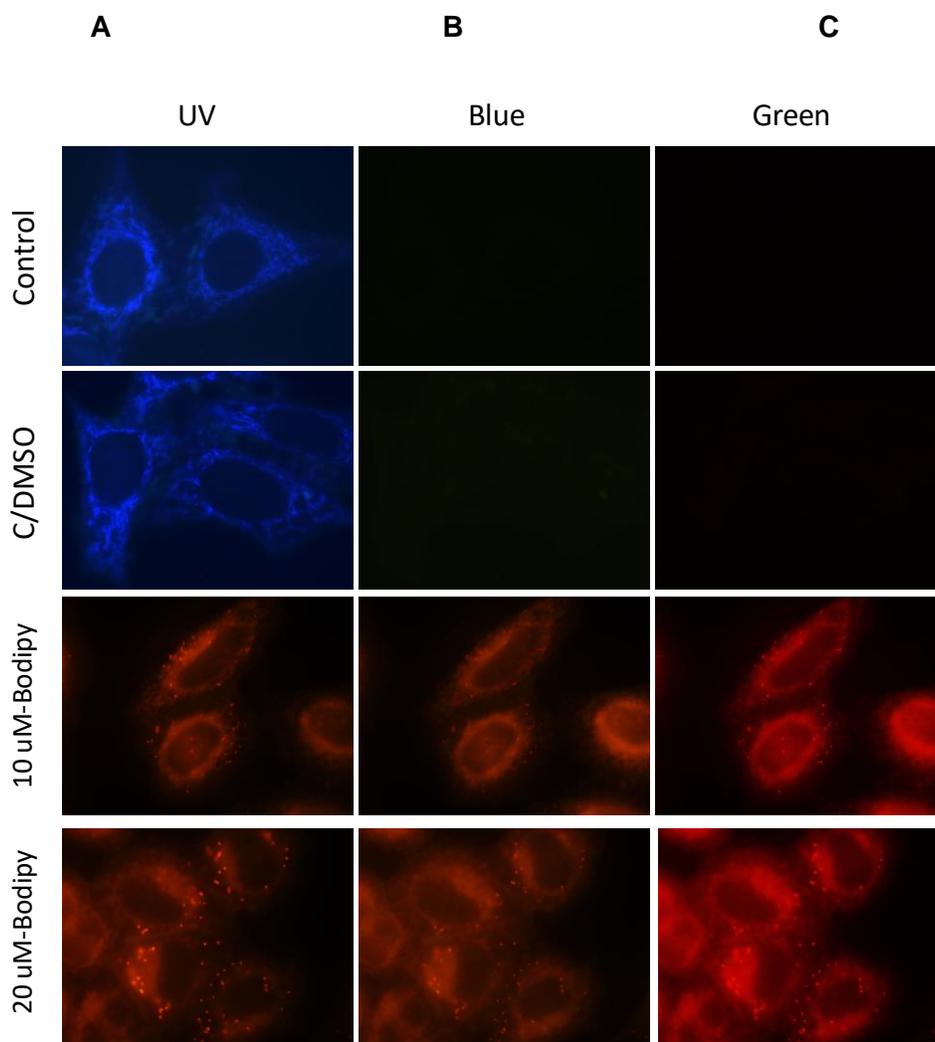


Figura 3. 4. 6. 2. 1. 1

Figura n. Localización subcelular de 35j en HeLa. Microfotografías de fluorescencia en células HeLa observadas bajo excitación con luz UV, azul y verde (A, C y E respectivamente) a dos concentraciones (10 μ M y 20 μ M.). Control: células sin BODIPy 34j. C/DMSO: control células sólo con la cantidad equivalente de DMSO.

3. 4. 6. 2. 2. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD PER SE SOBRE HELA (“DARK TOXICITY”)

Inicialmente se evaluó la toxicidad del BODIPY-AZO 34j y del BODIPY-NH₂ 35j en ausencia de luz. La toxicidad *per se* del BODIPY-AZO 34j y BODIPY-NH₂ 35j fue analizada con

distintas concentraciones (2, 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a partir de una disolución inicial de ambos compuestos en DMSO, incubados durante 2 h. En todos los tratamientos además se realizaron dos controles: a) control sin droga (CT) y b) control disolvente (DMSO), para ver el efecto sólo del disolvente en el cultivo celular. Transcurridas 24 horas del tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por una disolución MTT en DMEM completo. El ensayo de viabilidad celular MTT está basado en la reducción metabólica del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en sal de formazán, que es un compuesto liposoluble que nos permite ver la actividad mitocondrial de las células y por lo tanto medir la supervivencia celular. Tras la incubación de dos horas con las diferentes concentraciones del compuesto a analizar, se lavan las células y se añade medio completo y se mantienen en el incubador durante 24 h. Una vez transcurrido ese tiempo, las células se incuban con una disolución de MTT 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 3 h, y se solubiliza el formazán con DMSO. La viabilidad se realiza a través de la lectura de la placa con un lector SpectraFluor (Tecan) a 542 nm.

Como se muestra en la Figura n, no se observa toxicidad en ningún caso. La supervivencia de las células HeLa es prácticamente independiente de la concentración de 34j o 35j empleada.

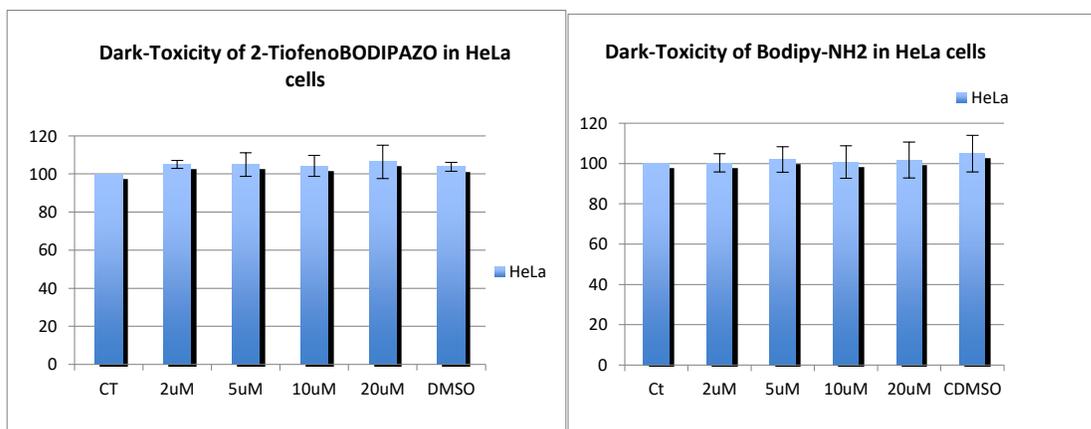


Figura 3. 4. 6. 2. 2. 1

Figura n. Evaluación de la toxicidad en oscuridad en células HeLa tratadas con diferentes concentraciones de BODIPY-AZO y BODIPY-NH₂ 5-(2-tiopheno) sustituidos.

3. 4. 6. 2. 3. EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTODINÁMICO: TERAPIA FOTODINÁMICA (PDT).

La terapia fotodinámica (PDT) es una modalidad terapéutica, mínimamente invasiva y que ha sido aprobada para tratamientos paliativos o curativos de algunas formas de cáncer, lesiones precancerosas y también para degeneraciones maculares relacionadas con la edad.^[170] Como ya se ha indicado, a PDT consiste en la administración de un compuesto con propiedades fotosensibilizadoras que se acumula preferentemente en tejidos tumorales. Este compuesto, denominado fotosensibilizador (PS), idealmente se activa mediante su exposición a luz de una longitud de onda del espectro visible cercana o superior a los 650 nm, donde los tejidos son más permeables a la luz. De esta manera, el PS transfiere la energía al oxígeno molecular, generando oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) que son responsables en último término de la destrucción selectiva del tumor.

La PDT se basa en la combinación de tres elementos no tóxicos *per se*: una molécula sensible a la luz que recibe el nombre de **fotosensibilizador** (PS) y que idealmente tiene la capacidad de acumularse selectivamente en células tumorales, **luz** y **oxígeno**. El PS es excitado mediante la irradiación del tejido dañado con luz visible de una determinada longitud de onda y, como consecuencia, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), que son las responsables de la muerte de las células tumorales, manteniendo intacto el tejido sano^[171].

Las principales ventajas de la PDT sobre otros tratamientos anticancerígenos convencionales son (I) su baja toxicidad sistémica (debida al hecho de que los PSs solo son activados en presencia de luz de una determinada longitud de onda), (II) su capacidad de destruir tumores accesibles a la luz de forma selectiva y (III) que la PDT puede ser aplicada tanto independientemente, como combinada con otras modalidades terapéuticas como la quimioterapia, radioterapia, cirugía, o inmunoterapia. Además, el PS puede administrarse tanto localmente como sistémicamente, dependiendo del tipo de tumor y/o su localización. Con el uso de sistemas de fibra óptica, la luz puede enfocarse con precisión en muchas partes del cuerpo para el tratamiento de tumores y la muerte de las células tumorales ocurre sin generar trauma al tejido circundante.^[172]

^[170] a) D. Dolmans, E. Fukumura, R. K. Jain, *Nature reviews cancer*, **2003**, 3, 380.; b) A. Juzeniene, A. Q. Peng, J. Moan, *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2007**, 6, 1234.

^[171] a) A. Juzeniene, Q. Peng, J. Moan, *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2007**, 6, 1234.; b) J. Moan, K. Berg, *Photochemistry and photobiology*, **1991**, 53, 549.

^[172] S. Pervaiz, M. Olivo, *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, **2006**, 33, 551.

En líneas generales, el PS administrado al inicio del tratamiento se encuentra en un estado basal no excitado (S_0), al absorber luz visible (fotones), se excita y sufre un cambio de estado, pasando a un estado singlete excitado (S_1) de vida media corta y muy inestable. Desde el estado S_1 , el PS puede volver al estado basal (por emisión de fluorescencia y/o calor) o promocionar un estado de excitación triplete (T_1) de vida media más larga. Desde T_1 , el PS puede transferir su energía a través de dos tipos de reacciones fotoquímicas, tipo I o tipo II. En la reacción de tipo I, el PS en estado T_1 puede interaccionar con biomoléculas del entorno celular para generar radicales por transferencia de electrones. Estos radicales reaccionan con el O_2 para producir ROS. En el caso de la reacción tipo II, el PS en estado T_1 transfiere su energía directamente sobre el oxígeno molecular (O_2), generándose oxígeno singlete (1O_2) (Figura n). Ambos tipos de reacciones ocurren de forma simultánea, siendo la reacción de tipo II la que se produce en mayor proporción.^[173]

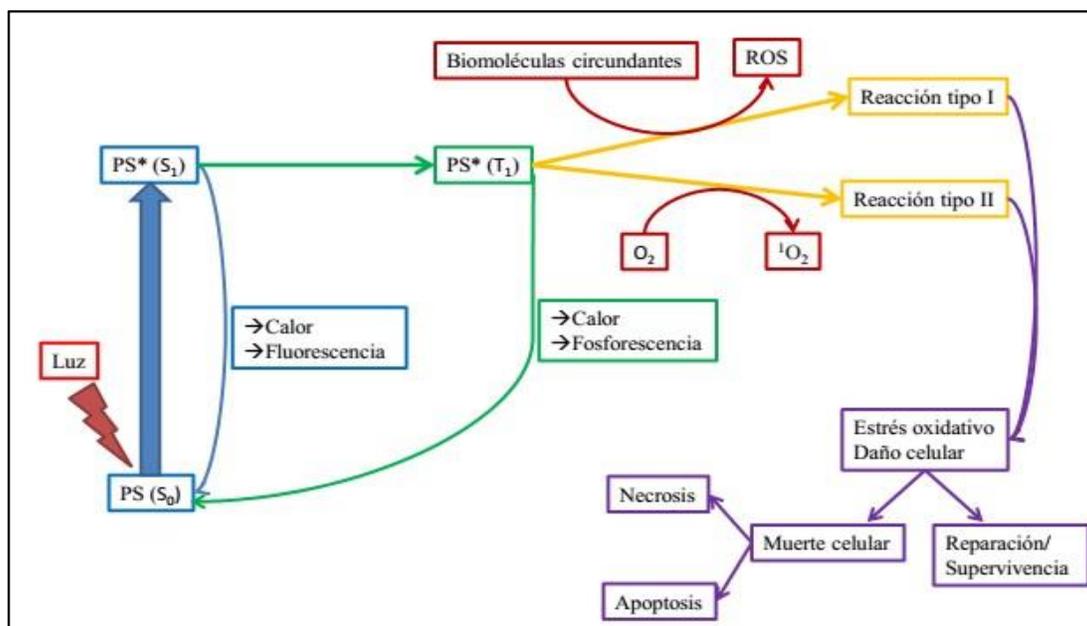


Figura 3. 4. 6. 2. 3. 1: Mecanismo de acción de la PDT

Los requisitos deseables para que un PS pueda ser utilizado en PDT son: (I) ser químicamente puro, con composición conocida y estable, (II) ser preferentemente acumulado en el tejido tumoral, (III) tener una toxicidad mínima en ausencia de luz y ser citotóxico únicamente cuando se de la fotoactivación, (IV) tener un campo cuántico elevado

^[173] a) T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, *Journal of the National Cancer Institute*, **1998**, *90*, 889.; b) E. Buytaert, M. Dewaele, P. Agostinis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, **2007**, *86*, 1776.

de oxígeno singlete y (V) tener elevado coeficiente de excitación molar y elevada absorbancia, particularmente en las regiones del rojo y rojo lejano del espectro (600-800 nm).

Los estudios de terapia fotodinámica (PDT) se han realizado utilizando dos concentraciones de ambos compuestos **34j** y **35j** (1 y 2 $\mu\text{g/ml}$). Los cultivos celulares tratados se han incubado durante dos horas, se ha eliminado el medio con el producto y a continuación se han sometido a diferentes tiempos de irradiación (1, 3, 5 y 10 minutos), empleando una lámpara de irradiación de luz verde ($\lambda = 545 \text{ nm}$, Figura n). Después, los cultivos se mantuvieron en el incubador y en oscuridad 24 horas antes de su evaluación.

En todos los tratamientos se establecieron los siguientes controles: a) control luz, para comprobar el efecto de la irradiación sobre células no tratadas con los compuestos (CT), b) Control disolvente (DMSO) y c) control Total, células sin droga. Transcurridas 24 horas del tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por MTT en DMEM completo. Para ello previamente se preparó una solución madre de MTT-PBS (a una concentración de 1 mg/ml) y tras esto se puso 1 ml de esta solución por cada 10 ml de medio DMEM completo.

En este caso se pudo observar una respuesta celular diferente para los cultivos tratados con BODIPY-AZO y con BODIPY-NH₂. En el caso del BODIPY-AZO **34j** el tratamiento con luz, no alteró la supervivencia celular, mientras que en el caso de BODIPY-NH₂ **35j**, la supervivencia era dependiente tanto de la concentración del compuesto como del tiempo de irradiación. Concentraciones de BODIPY-NH₂ **35j** de 2 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3. 4. 6. 2. 3. 2.: Supervivencia celular de HeLa con distintas concentraciones de BODIPY-NH₂ y diferentes tiempos de irradiación. A) 2 $\mu\text{g/ml}$ de 5-(2-tienil)BODIPY-AZO; B) 1 $\mu\text{g/ml}$ de 5-(2-tienil)BODIPY-AZO; C) 2 $\mu\text{g/ml}$ de 5-(2-tiofeno)BODIPY-NH₂; D) 1 $\mu\text{g/ml}$ de 5-(2-tienil) BODIPY-NH₂. C) produjeron una supervivencia celular de alrededor del 45% tras 1 min de irradiación, alcanzando un mínimo de un 18% tras 5 minutos de irradiación. Por otro lado, concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$ de BODIPY-NH₂ **35j** (Figura 3. 4. 6. 2. 3. 2.: Supervivencia celular de HeLa con distintas concentraciones de BODIPY-NH₂ y diferentes tiempos de irradiación. A) 2 $\mu\text{g/ml}$ de 5-(2-tienil)BODIPY-AZO; B) 1 $\mu\text{g/ml}$ de 5-(2-tienil)BODIPY-AZO; C) 2 $\mu\text{g/ml}$ de 5-(2-tiofeno)BODIPY-NH₂; D) 1 $\mu\text{g/ml}$ de 5-(2-tienil) BODIPY-NH₂. D) generaron un efecto sobre la toxicidad celular proporcional al incremento del tiempo de irradiación, alcanzando valores de más de un 80% de toxicidad celular tras 10 minutos de irradiación con luz verde.

A)

B)

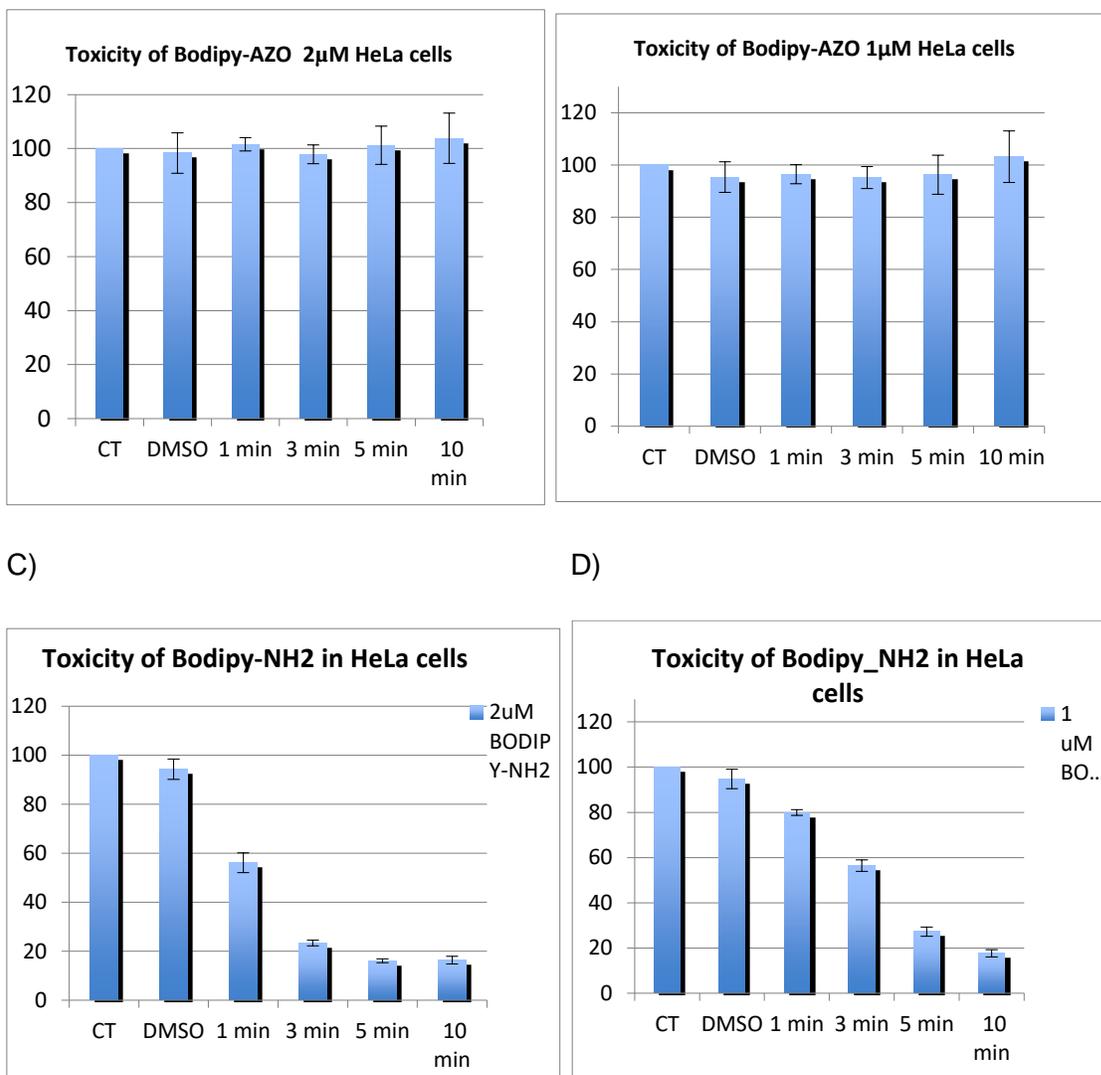


Figura 3. 4. 6. 2. 3. 2.: Supervivencia celular de HeLa con distintas concentraciones de BODIPY-NH₂ y diferentes tiempos de irradiación. A) 2 μ g/ml de 5-(2-tienil)BODIPY-AZO; B) 1 μ g/ml de 5-(2-tienil)BODIPY-AZO; C) 2 μ g/ml de 5-(2-tiofeno)BODIPY-NH₂; D) 1 μ g/ml de 5-(2-tienil) BODIPY-NH₂.

La toxicidad de la fuente de irradiación *per se* también fue evaluada. En este caso, transcurridas 24 h después de la irradiación con luz verde, se retiró el medio de cultivo y se substituyó por MTT en DMEM completo, siguiendo el protocolo habitual. Los resultados obtenidos indicaban que la luz verde empleada para la irradiación no presentaba fototoxicidad celular del cultivo irradiado, en todos los tiempos de irradiación (1, 3, 5 y 10 min) analizados.

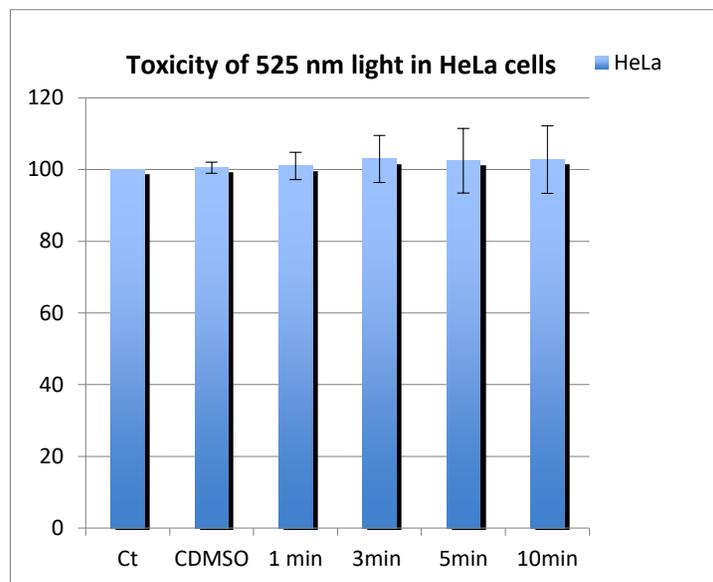


Figura 3. 4. 6. 2. 3. 3

3. 4. 6. 2. 3. CONCLUSIONES ESTUDIOS BIOLÓGICOS

En base a todos estos resultados, se puede concluir que tanto la azoreductasa bacteriana como la humana probada son capaces de reducir los BODIPY-AZOS ensayados, aunque con distintas velocidades. En general se observa un cambio de color de la disolución, indicativo de la ruptura reductora del doble enlace N=N. Estos resultados son muy prometedores para futuros ensayos biológicos en tejidos bajo hipoxia, ya que hay una sobreexpresión de azoreductasas.

Por otro lado, los estudios de viabilidad de los BODIPY-AZO [34j](#) y del BOBIPY-NH₂ [35j](#) han demostrado que ambos compuestos en oscuridad no son tóxicos, utilizando como modelo celular *in vitro* las células HeLa y a concentraciones de hasta 20 µg/ml.

De los tratamientos fotodinámicos se puede concluir que la acción fotosensibilizadora del BODIPY-NH₂ es completamente diferente a la del BODIPY-AZO. En el caso de los cultivos tratados con el BODIPY-NH₂ la irradiación con luz verde, conduce a la muerte celular tras 5 min de irradiación, mientras que en el caso del BODIPY-AZO [34j](#) no se observa efecto fototóxico.

La nula toxicidad del BOPIDPY-AZO [34j](#) en presencia y en ausencia de luz es vital para su futura aplicación como sensor de sistemas reductores biológicos. Por otro lado, es muy interesante la acción fotosensibilizadora del BODIPY-NH₂, para su futura aplicación como fotosensibilizador en terapia fotodinámica, especialmente atractivo para el caso del tratamiento de células con hipoxia. Este compuesto se podría formar de manera selectiva por tratamiento del correspondiente BODIPY-AZO derivado, que en caso de ruptura reductora generaría el fotosensibilizador deseado (BODIPY-NH₂) para el tratamiento. Estos resultados permiten concluir que el BODIPY-NH₂ parece reunir las características apropiadas para su posible aplicación en terapia fotodinámica.

3. 5. PARTE EXPERIMENTAL

3. 5. 1. TÉCNICAS Y APARATOS.

Procedimientos cromatográficos.

Cromatografía en capa fina.

El seguimiento de las reacciones se ha efectuado por cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios de gel de sílice (*Merck*-60 230-400 mesh) de 0.2 mm de espesor. El análisis de las placas se ha llevado a cabo en una lámpara de luz ultravioleta de 254/365 nm y/o utilizando un revelador químico adecuado como el ácido fosfomolibdico, 2,4-dinitrofenilhidracina o permanganato potásico.

Cromatografía en columna.

Las cromatografías en columna (cromatografía flash)²⁰⁵ se realizaron con gel de sílice (*Merck*, 230-400 mesh ASTM). El eluyente se indica en cada caso, así como las proporciones relativas de disolventes en volumen/volumen.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los excesos enantioméricos (e.e.) se han determinado por experimentos llevados a cabo a temperatura ambiente, empleando un aparato *Agilent 1100* equipado con un detector de UV-Visible de longitud de onda variable. La columna cromatográfica, el flujo (mL/min) y el eluyente se indica en cada caso, y en todos los casos se ha evaluado previamente en compuesto racémico.

Espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN).

Los espectros de ¹H-RMN ¹³C-RMN y ¹⁹F-RMN fueron realizados a temperatura ambiente en los equipos *Bruker AC-300* (300,75 y 282.4 MHz, respectivamente) del Departamento de Química Orgánica de la Universidad Autónoma de Madrid ó *AC-500* (500, 125 y 470.6 MHz, respectivamente) del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm, tomando como referencia el disolvente empleado: CDCl₃ (7.26 y 77.0 ppm). Para los espectros realizados en otros disolventes se indica el disolvente deuterado entre paréntesis en cada caso.

Espectrometría de masas.

Los espectros de masas (EM) y los espectros de masas de alta resolución (EMAR) se han registrado en un espectrómetro *Hewlett-Packard HP-5985* usando técnicas de impacto electrónico a 70 eV, BAR+, Electrospray o APCI+ como modo de ionización. Los resultados se expresan en función de la relación masa/carga (m/z) para los picos más importantes y los valores entre paréntesis (%) corresponden a las intensidades relativas respecto al pico base (100%).

Puntos de fusión (P.f.).

Los puntos de fusión se han determinado en un aparato *GallempKamp* en tubos capilares abiertos.

Rotaciones específicas.

Los valores de rotación óptica ($[\alpha]_D^{20}$) se han medido a temperatura ambiente en un polarímetro *Perkin Elmer 241C*. En cada caso se indica el disolvente y la concentración c (g/mL) utilizados.

Espectroscopía de UV-Visible y Dicroísmo Circular (DC).

Los espectros de UV-Visible fueron registrados en un espectrómetro *Hewlett Packard 8453 JASCO* Tipo *U-best 560*. Los espectros de dicroísmo circular fueron recogidos en un espectropolarímetro *JASCO* Tipo *J-710*. Las muestras fueron disueltas en THF o CHCl_3 .

Fotoisomerización de los azocompuestos

Para los experimentos de DC y de UV/Vis, la fotoisomerización de los azocompuestos fue llevada a cabo a 20 °C irradiando las disoluciones de azocompuesto contenidas en una cubeta de cuarzo termostática de 0.1 cm, con una lámpara de Xe de 150 W del dicrógrafo.

Para los experimentos de HPLC y RMN la fotoisomerización se llevó a cabo irradiando con una lámpara de Hg de 400 W de alta presión. Para seleccionar las longitudes de onda se utilizaron filtros de interferencia (*Oriel*) de 365 nm, 436 nm y 546 nm. Los estados fotoestacionarios se determinaron monitorizando los cambios de composición con el tiempo, realizando espectros UV a diferentes intervalos hasta que no se observaron cambios en la

proporción relativa de isómeros. La proporción *trans/cis* de los isómeros medida en HPLC se realizó utilizando como punto isobéptico 210 nm.

3. 5. 2. DISOLVENTES, REACTIVOS Y CONDICIONES DE REACCIÓN.

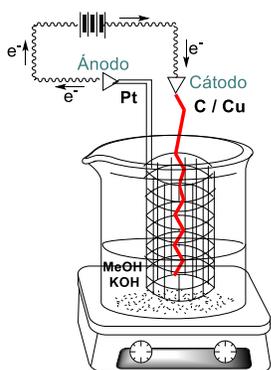
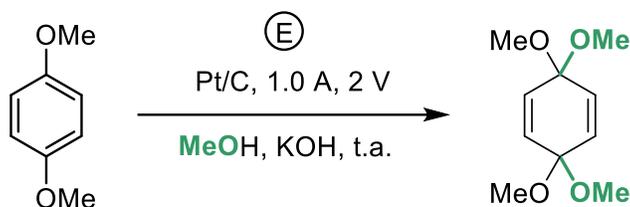
Disolventes

Los disolventes anhidros utilizados (CH₃CN, THF, MeOH y Et₂O) se secaron y almacenaron sobre tamiz molecular de 3 ó 4 Å. Previamente el tamiz molecular se activó en un horno de microondas (500 W, 2 min) y se secó a presión reducida, repitiendo este proceso dos veces. Dichos disolventes se dejaron reposar en presencia del tamiz activado durante dos semanas antes de su utilización.

Reactivos

Los reactivos comerciales utilizados provienen de la marca *Aldrich*, *Fluka*, *Acros* o *Fluorochem*.

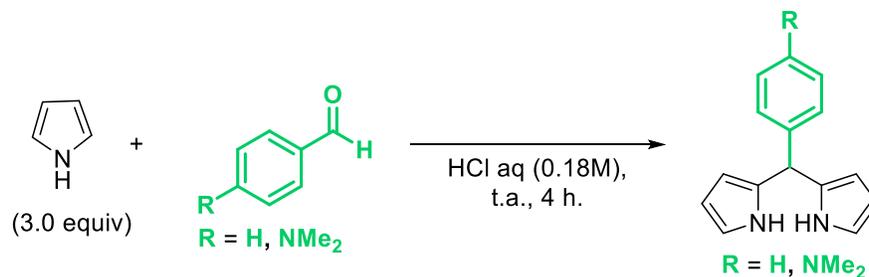
3. 5. 3. METODOS DE SINTESIS

Síntesis del 1,1,4,4-tetrametoxicicloheza-2,5-dieno (X)^{s1}.

El 1,1,4,4-tetrametoxicicloheza-2,5-dieno **28** se obtiene a partir del 1,4-dimetoxibenceno **27** a través de una oxidación anódica, la cual se lleva a cabo en una celda electrolítica sencilla utilizando como ánodo una malla cilíndrica de platino (diámetro 5 cm x 5cm), como cátodo una barra de grafito, con un potencióstato AMEL modelo 549, manteniendo la diferencia de potencial en 2 V a temperatura ambiente. El compuesto **27** (17 g, 123 mmol) se disuelve en metanol (200 ml) y sobre la disolución resultante se va añadiendo hidróxido sódico sólido hasta que se observa que el amperímetro indica una intensidad de corriente de 1 A. El paso de corriente se mantiene constante hasta que se observa la desaparición total del sustrato de partida. Una vez acabada la reacción, el disolvente se elimina *a vacío*. El residuo que se obtiene se disuelve en pentano caliente y se filtra despreciando un residuo insoluble que queda en el fondo. La disolución de pentano se enfría en un baño de hielo y se filtra el sólido resultante. Este proceso se repite con las aguas madre. La totalidad del sólido obtenido se recrystaliza en éter de petróleo, obteniéndose así el bisacetal **28** como un sólido cristalino blanco con un 76% de rendimiento (18.6 g, 93 mmol).

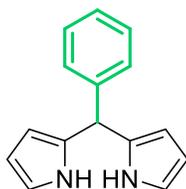
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.10 (s, 4H), 3.30 (s, 12H)

Procedimiento general A para la síntesis de 5-aryl-dipirrometano (**23**)^{s1}.



Los dipirrometanos **23a** y **23b** se prepararon siguiendo la metodología descrita en la bibliografía (S2) con pequeñas modificaciones. El pirrol (3.0 equiv) se añade sobre una disolución acuosa de HCl al 0.6 % (0.18 M). Sobre la mezcla de reacción se añade el correspondiente aldehído (1.0 equiv) y se deja agitando vigorosamente 4 h. Tras ese periodo de tiempo, se filtra el precipitado obtenido, se lava con agua y con éter de petróleo. Finalmente, el 5-aryl-dipirrometano se obtiene como un sólido tras purificación en columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla de Heptano/Acetato de-Etilo 7/1.

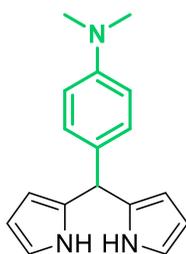
5-Fenil-dipirrometano (**23**).^[S2]



Siguiendo el **procedimiento general A**, usando pirrol (4.0 g, 4.1 mL 59. mmol) y benzaldehído (2.1 g, 2.0 mL 19.9 mmol), se obtiene el compuesto **23** como un sólido verde claro con un rendimiento del 70% (3.1 g).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.89 (s, 1H), 7.40 – 7.27 (m, 3H), 7.25 – 7.20 (m, 2H), 6.69 (dd, *J* = 4.2, 2.6 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.48 (s, 1H).

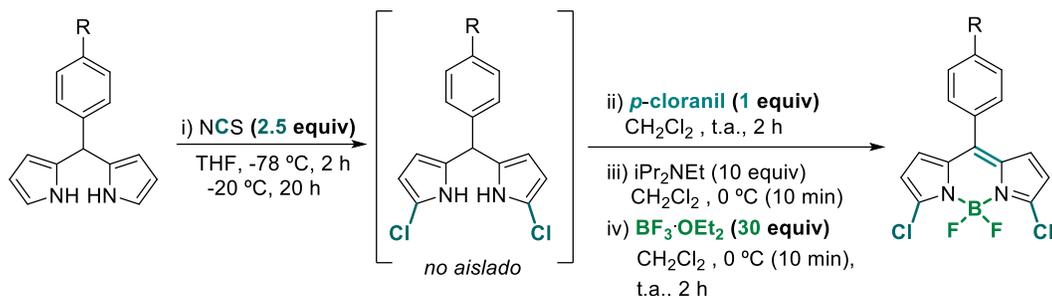
5-(4-Dimetilaminobenceno)-dipirrometano (**31**).^[S2]



Siguiendo el **procedimiento general A**, usando pirrol (1.9 g, 2 mL, 28.3 mmol) y 4-(dimetilamino)benzaldehído (1.4 g, 9.4 mmol). En este caso, al no observarse precipitación alguna del producto deseado, se extrajo la mezcla con DCM y el crudo resultante se purificó mediante columna cromatográfica, se obtiene el compuesto **23** como un sólido cristalino morado oscuro con un rendimiento del 63% (1.6 g).

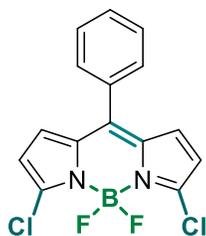
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.91 (sa, 2H), 7.10 (d, J = 8.7 Hz, 5H), 6.73 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 6.68 (dd, J = 4.2, 2.6 Hz, 2H), 6.16 (dd, J = 5.8, 2.8 Hz, 2H), 5.94 (s, 1H), 2.94 (s, 6H).

Procedimiento general B para la síntesis de los 3,3'-dicloro-8-aril-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (1)^{s1}.



En un matraz de 2 bocas equipado con un imán, se añade el 5-aril-dipirrometano correspondiente (1.0 equiv). El matraz se deja en atmósfera inerte haciendo ciclos de vacío-argón 3 veces antes de añadir el THF anhidro (0.03 M). La disolución se enfría a -78 °C y se añade *N*-clorosuccinimida (2,5 equiv) de una sola vez. La mezcla se deja agitando 2 h a -78 °C, tras la cuales se deja en el congelador, a -20 °C, durante la noche. Sobre la disolución fría se añade agua, la disolución resultante se extrae con diclorometano y se separan las fases, la fase orgánica se seca sobre MgSO_4 anhidro y se elimina el exceso de disolvente a vacío. El residuo resultante se añade en un matraz de 250 ml junto con *p*-cloranil (1.0 equiv). El matraz se deja en atmosfera inerte haciendo ciclos de vacío-argón 3 veces antes de añadir el CH_2Cl_2 anhidro (0.03 M). La disolución resultante se deja agitando 2 h a temperatura ambiente antes de enfriarla a 0 °C y añadir la DIPEA (10 equiv). Tras 10 minutos, se añade el $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (30 equiv) y se deja agitando otros 10 minutos a 0 °C y 2 horas temperatura ambiente. Finalmente, se añaden cuidadosa y lentamente 30 ml de NaHCO_3 sobre la mezcla de reacción previamente enfriada a 0 °C. La mezcla de reacción se pasa a un embudo de decantación, se separan las fases, la fase acuosa se extrae con diclorometano, el combinado de las fases orgánicas se seca sobre MgSO_4 anhidro y se elimina el exceso de disolvente a vacío. El compuesto deseado se obtiene como un sólido cristalino rojo, tras purificación en columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla de Heptano/diclorometano-1.5/1.

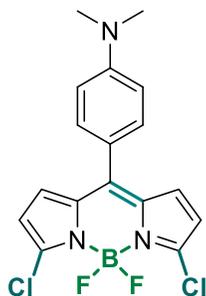
3,3'-Dicloro-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (1)^{s1}.



Siguiendo el [procedimiento general B](#), usando el compuesto X (1.0 g, 4.5 mmol), NCS (1.5 g, 11.25 mmol), *p*-cloranil (1.1 g, 4.5 mmol), DIPEA (5.8 g, 7.9 ml, 45 mmol) y $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (19.2 g, 16.6 ml, 135 mmol), se obtiene el compuesto **Xa** como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 67% (1 g, 3 mmol).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.70- 7.43 (m, 5H), 6.95 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 4.3 Hz, 2H).

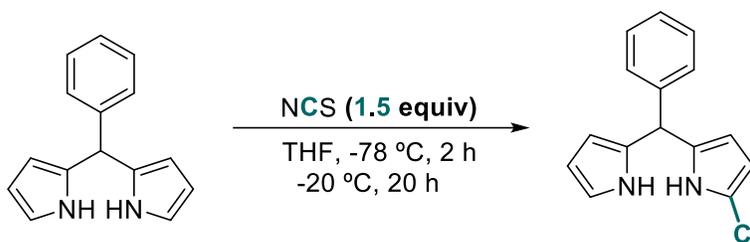
3,3'-dicloro-8-((4-*N,N*-dimetil)fenil)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (**32**)^{s1}.



Siguiendo el [procedimiento general B](#), usando el compuesto **31** (1.0 g, 3.8 mmol), NCS (1.2 g, 9.4 mmol), *p*-cloranil (927 mg, 3.8 mmol), DIPEA (4.9 g, 6.6 ml, 37.7 mmol) y $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (16.1 g, 14 ml, 113 mmol), se obtiene el compuesto **32** como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 50% (722 mg, 1.9 mmol).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.45 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.95 (d, J = 4.1 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.43 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 3.11 (s, 6H).

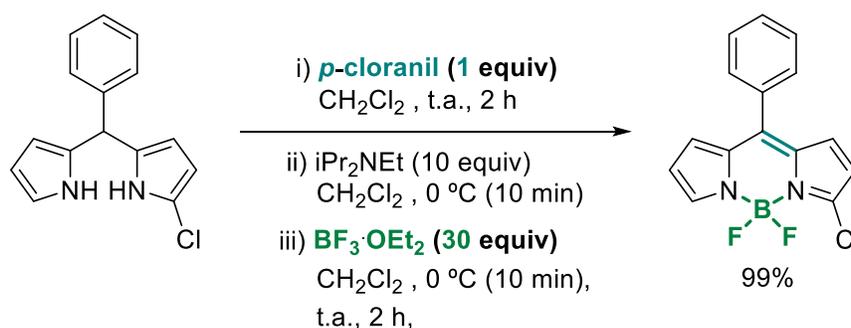
Síntesis del 1-dicloro-5-fenil-dipirrometano **24**^{s1}.



En un matraz de 2 bocas de 250 ml equipado con un imán, se añade el 5-fenil-dipirrometano **23a** (1.0 g, 4,5 mmol, 1.0 equiv). El matraz se deja en atmosfera inerte haciendo ciclos de vacío-argón 3 veces antes de añadir 150 ml (0.03M) de THF anhidro. La disolución se enfría a $-78\ ^\circ\text{C}$ y se añade *N*-clorosuccinimida (630 mg, 4,73 mmol, 1.05 equiv) de una sola vez. La reacción se dejó agitando 2 h a $-78\ ^\circ\text{C}$, tras la cuales se dejó en el congelador, a $-20\ ^\circ\text{C}$, durante la noche. Sobre la disolución fría se añadió agua (150 ml) y la disolución resultante se extrae con diclorometano, se separan las fases, la fase orgánica se seca sobre MgSO_4 anhidro y se elimina el exceso de disolvente a vacío. Finalmente, el 1-cloro-5-fenil-dipirrometano se obtuvo como un polvo verde claro, con un 73 % (XX g, xx mmol) tras purificación en columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla de Heptano/Acetato de-Etilo 7/1.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.91$ (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.44 – 7.27 (m, 4H), 7.25 – 7.17 (m, $J = 5.2, 3.0$ Hz, 2H), 6.72 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.17 (dd, $J = 5.8, 2.9$ Hz, 1H), 5.96 (dd, $J = 5.8, 2.4$ Hz, 2H), 5.82 (t, $J = 3.2$ Hz, 1H), 5.40 (s, 1H).

Síntesis del 3-cloro-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (**25**)^[s1].



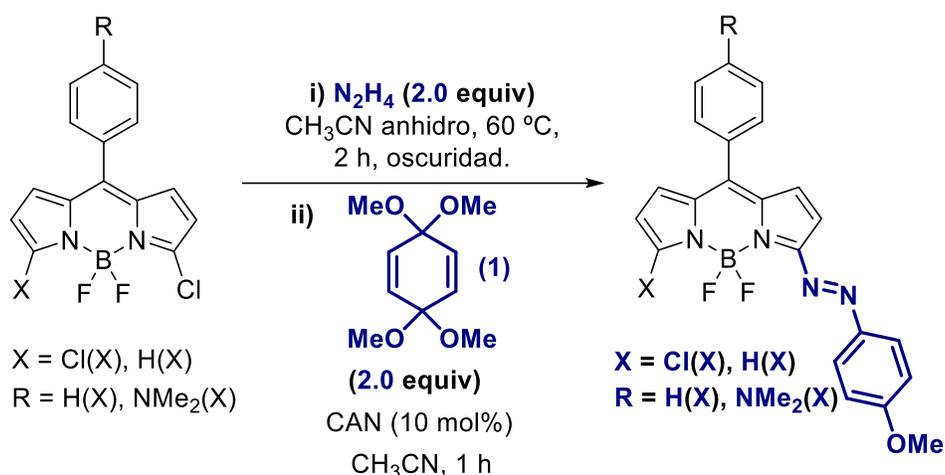
El 1-dicloro-5-fenil-dipirrometano X (1.0 g, 3.9 mmol, 1.0 equiv) se añade en un matraz de 250 ml junto con el *p*-cloranil (432 mg, 3.9 mmol, 1.0 equiv). El matraz se deja en atmosfera inerte haciendo ciclos de vacío-argón 3 veces antes de añadir 150 ml (0.03M) de CH_2Cl_2 anhidro. La disolución resultante se deja agitando 2 h a temperatura ambiente antes de

enfriarla a 0 °C y añadir 6.8 ml de DIPEA (39 mmol, 10 equiv). Tras 10 minutos, se añaden 14.4 ml de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (117 mmol, 30 equiv) y la mezcla se deja agitando otros 10 minutos a 0 °C y 2 horas temperatura ambiente. Finalmente, 30 ml de NaHCO_3 se añaden cuidadosa y lentamente sobre la mezcla de reacción previamente enfriada a 0 °C. La mezcla de reacción se pasa a un embudo de decantación, se separan las fases, la fase acuosa se extrae con diclorometano (30 ml X 3), el combinado de las fases orgánicas se seca sobre MgSO_4 anhidro y se elimina el exceso de disolvente a vacío. El compuesto **24** se obtiene como un sólido cristalino rojo, con un 99 % (1.2 mg, 3.86 mmol) tras purificación en columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla de Heptano/diclorometano-1.5/1.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.94 (s, 1H), 7.54 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 6.90 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 6.57 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 6.43 (d, J = 3.9 Hz, 1H).

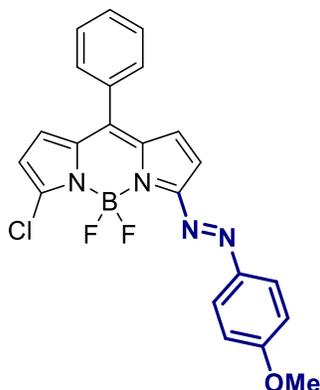
3. 5. 3. 1. PROCEDIMIENTOS GENERALES

Procedimiento general C para la síntesis de 3-cloro-5-(4-metoxifenil)diazenil-8-ariil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno.



El correspondiente cloro-BODIPY derivado se añade en un tubo de microondas previamente secado en el horno. El tubo se sella y se deja bajo atmósfera inerte haciendo ciclos de vacío-argon 3 veces antes de añadir el acetonitrilo anhidro (0.03 M) y la hidracina monohidratada (2.0 equiv). La disolución resultante se deja agitando 2 h a 80 °C tapada de la luz. Después de ese periodo de tiempo, se deja enfriar la reacción a temperatura ambiente antes de abrir el tubo y añadir 1,1,4,4-tetrametoxiciclohexa-2,5-dieno (2.0 equiv) y CAN (10 mol%). La reacción se deja agitar a temperatura ambiente hasta que se observa la completa desaparición del producto de partida. Finalmente, el disolvente se elimina a vacío y el residuo resultante se purifica en columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla de heptano/diclorometano-1/1, obteniéndose así el producto deseado como un sólido cristalino oscuro.

3-Cloro-5-(4-metoxifenil)diazenil)-8-difenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (CIBODIPAZo, 29).



Seguendo el [procedimiento general C](#), usando el compuesto **1** (1 g, 3.0 mmol), $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (300 mg, 0.3 mL, 6 mmol), 1,1,4,4-tetrametoxiciclohexa-2,5-dieno (1.2 g, 6.0 mmol) y CAN (165 mg, 0.3 mmol), se obtiene el compuesto **29** como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 73% (956 mg).

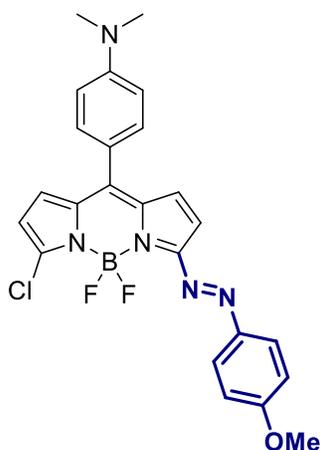
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.09 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.72 – 7.43 (m, 5H), 7.02 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 6.91 (s, 2H), 6.88 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 6.47 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 163.97 (s), 162.52 (s), 148.73 (s), 144.78 (s), 143.81 (s), 135.91 (s), 134.35 (s), 131.30 (s), 131.12 (s), 130.64 (s), 130.53 (s), 128.51 (s), 126.61 (s), 118.93 (s), 114.58 (s), 108.28 (s), 55.72 (s).

$^{19}\text{F NMR}$ (282 MHz, CDCl_3): δ = -143.35 (d, J = 27.0 Hz), -143.44 (dd, J = 54.2, 27.0 Hz), -143.54 (d, J = 27.0 Hz).

EMAR (): Calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{BClF}_2\text{N}_4\text{O}$ (M^+): 436.1074 encontrada: 436.1099

3-Cloro-5-(4-metoxifenil)diazenil)-8-(4-(*N,N*-dimetil)fenil)--4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (33 o CIPh₂NPhBODIPAZo).



Siguiendo el [procedimiento general C](#), usando el compuesto [32](#) 1.0 g, 2.6 mmol), N₂H₄·H₂O (260 mg, 0.25 mL, 5.2 mmol), 1,1,4,4-tetrametoxiciclohexa-2,5-dieno (1.1 g, 5.2 mmol) y CAN (142 mg, 0.26 mmol), se obtiene el compuesto [33](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 66% (818 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.06 (d, *J* = 9.0, 5.6 Hz, 3H), 7.71 – 7.49 (m, 5H), 7.03 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.96 (s, *J* = 3.9 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 6.60 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H).

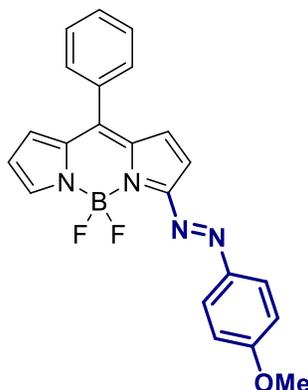
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 163.41 (s), 161.67 (s), 159.28 (s), 148.51 (s), 144.18 (s), 138.42 (s), 136.54 (s), 135.87 (s), 133.89 (s), 133.50 (s), 133.45 (s), 132.82 (s), 132.00 (s), 130.92 (d, *J* = 2.3 Hz), 130.62 (s), 130.37 (s), 130.15 (s), 130.03 (d, *J* = 2.7 Hz), 129.86 (s), 128.77 – 128.55 (m), 128.43 (s), 128.12 (s), 127.86 (s), 127.80 (s), 126.52 (s), 126.45 (s), 126.25 (s), 126.03 (s), 125.95 (d, *J* = 2.0 Hz), 125.77 (s), 125.34 (s), 125.02 (s), 123.47 (dd, *J* = 4.3, 3.5 Hz), 123.47 (dd, *J* = 4.3, 3.5 Hz), 114.36 (s), 107.40 (s), 55.60 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = 139.80 (d, *J* = 27.9 Hz), -139.86 (dd, *J* = 55.8, 27.8 Hz), -139.92 (d, *J* = 27.8 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.45 (t, *J* = 29.1 Hz).

EMAR (): Calculada para C₂₄H₂₁BClF₂N₅O (M⁺): 479.1496; encontrada: 479.1469

3-(4-Metoxifenil)diazenil)-8-difenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno
(HBODIPAzO, 30).



Siguiendo el [procedimiento general C](#), usando el compuesto [25](#) (500 mg, 1.7 mmol), $\text{N}_2\text{H}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (175 mg, 0.17 mL, 3.4 mmol), 1,1,4,4-tetrametoxiciclohexa-2,5-dieno (681 mg, 3.4 mmol) y CAN (93 mg, 0.17 mmol), se obtiene el compuesto [30](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 80% (547 mg).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.06 (d, J = 9.0, 5.6 Hz, 3H), 7.71 – 7.49 (m, 5H), 7.03 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 6.96 (s, J = 3.9 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 6.60 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H).

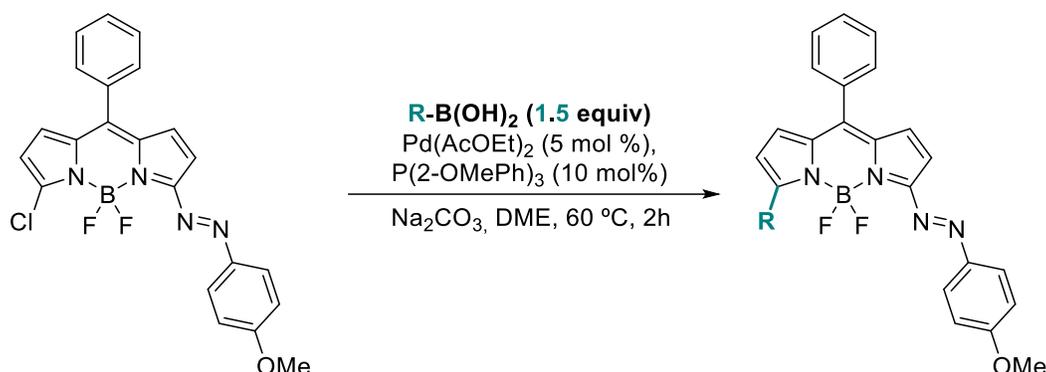
^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ = 163.43 (s), 148.55 (s), 133.95 (s), 130.93 (s), 130.92 (s), 130.90 (s), 130.67 (s), 130.44 (s), 130.42 (s), 130.13 (dd, J = 3.3, 2.5 Hz), 128.89 (s), 128.48 (s), 127.57 (s), 126.96 (s), 126.85 (s), 126.75 (s), 126.71 (s), 126.28 (s), 122.96 (s), 122.57 (s), 114.38 (s), 55.59 (s).

^{19}F -RMN (282 MHz, CDCl_3): δ = 135.21 (d, J = 29.1 Hz), -135.27 (dd, J = 58.1, 29.1 Hz), -135.33 (d, J = 29.1 Hz).

^{11}B -RMN (96 MHz, CDCl_3): δ = 1.49 (t, J = 29.1 Hz).

EMAR (IE): Calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}$ (M⁺): 402.1463; encontrada: 402.1475

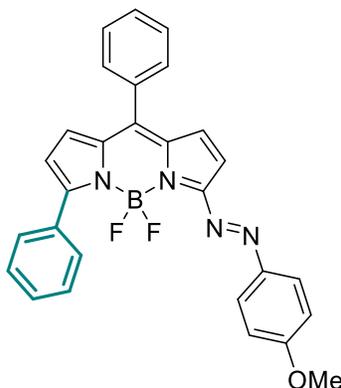
Procedimiento general D para la síntesis de 3-aryl-5-(4-metoxifenil)diazenil-8-fenil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno.



El correspondiente 3-cloro-5-(4-metoxifenil)diazenil-8-aryl-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno (**29** o **33**) (1.0 equiv), el correspondiente ácido borónico (2.0 equiv), Pd(OAc) $_2$ (5 mol%), P(2-OMe-Ph) $_3$ (10 mol%) y Na $_2$ CO $_3$ (3.0 equiv) se añaden en un tubo de microondas previamente secado en el horno. El tubo se sella y se deja en atmosfera inerte haciendo ciclos de vacío-argón 3 veces antes de añadir el dimetoxietano anhidro (0.1 M). La disolución resultante se deja agitando 2 h a 60 °C. Tras de ese periodo de tiempo, la reacción se deja enfriar a temperatura ambiente, se diluye con diclorometano y se filtra por una columna pequeña de celita. Después, el disolvente se elimina a vacío y el residuo resultante se purifica en columna cromatográfica usando un gradiente de eluyente de [Heptano/diclorometano]-[2/1] a [1/1], obteniéndose así el producto deseado como un sólido cristalino azul oscuro.

5-(4-Metoxifenil)diazenil-3,8-difenil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno
o PhBODIPAZo).

(34a)



Seguendo el [procedimiento general D](#), usando el compuesto [29](#) (xx mg, xx mmol), el ácido fenil borónico (56 mg, 0.46 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0.012 mmol), P(2-OMe-Ph)₃ (8 mg, 0.023 mmol) y Na₂CO₃ (74 mg, 0.69 mmol), se obtiene el compuesto [34a](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 80% (818 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.11 - 7.97 (m, 4H), 7.69 – 7.45 (m, 8H), 7.08 – 6.97 (m, 3H), 6.88 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H).

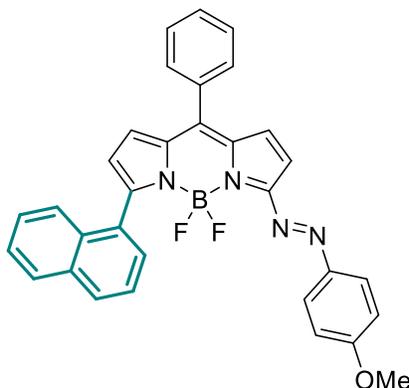
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 163.40 (s), 148.77 – 148.43 (m), 134.01 – 133.88 (m), 132.37 (d, *J* = 0.8 Hz), 132.22 (d, *J* = 2.2 Hz), 130.62 (s), 130.29 – 130.24 (m), 130.09 (s), 129.73 (s), 129.67 (s), 128.42 (s), 128.40 (s), 126.24 (s), 114.47 (s), 55.68 (s).

¹⁹F-RMN (471 MHz, CDCl₃): δ = 135.21 (d, *J* = 29.1 Hz), -135.27 (dd, *J* = 58.1, 29.1 Hz), -135.33 (d, *J* = 29.1 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.47 (t, *J* = 29.1 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₂₈H₂₁BF₂N₄O (M⁺): 478.1886; encontrada: 478.1871

3-(4-Metoxifenil)diazenil-5-(1-naftalenil)-8-fenil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno (34e o NaphBODIPAZo).



Siguiendo el [procedimiento general D](#), usando el compuesto [29](#) (100 mg, 0.23 mmol), el ácido naftaleno-1-borónico (79 mg, 0.46 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0.012 mmol), P(2-OMe-Ph)₃ (8 mg, 0.023 mmol) y Na₂CO₃ (74 mg, 0.69 mmol), se obtiene el compuesto [34e](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 55% (67 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.06 – 7.96 (m, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.73 – 7.54 (m, 2H), 7.55 – 7.41 (m, 1H), 7.07 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 6.96 – 6.84 (m, 1H), 6.70 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.85 (s, 1H).

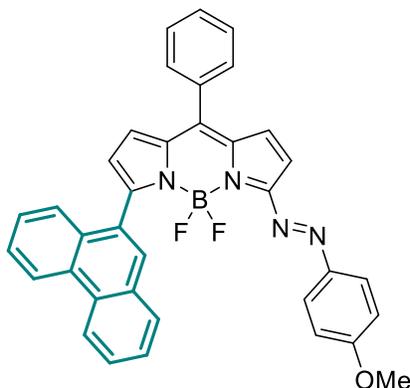
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 163.41 (s), 161.67 (s), 159.28 (s), 148.51 (s), 144.18 (s), 138.42 (s), 136.54 (s), 135.87 (s), 133.89 (s), 133.50 (s), 133.45 (s), 132.82 (s), 132.00 (s), 130.92 (d, *J* = 2.3 Hz), 130.62 (s), 130.37 (s), 130.15 (s), 130.03 (d, *J* = 2.7 Hz), 129.86 (s), 128.77 – 128.55 (m), 128.43 (s), 128.12 (s), 127.86 (s), 127.80 (s), 126.52 (s), 126.45 (s), 126.25 (s), 126.03 (s), 125.95 (d, *J* = 2.0 Hz), 125.77 (s), 125.34 (s), 125.02 (s), 123.47 (dd, *J* = 4.3, 3.5 Hz), 123.47 (dd, *J* = 4.3, 3.5 Hz), 114.36 (s), 107.40 (s), 55.60 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = δ -141.60 (d, *J* = 27.4 Hz), -141.70 (dt, *J* = 74.6, 37.3 Hz), -141.65 – -141.85 (m), -143.31 (d, *J* = 27.0 Hz), -143.36 (dd, *J* = 54.1, 27.0 Hz), -143.33 – -143.52 (m).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.28 (t, *J* = 28.1 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₂₈H₂₁BF₂N₄O (M⁺): 528.2042; encontrada: 528.2047.

3-(4-Metoxifenil)diazenil-5-(9-fenantrenil)-8-fenil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno (34h o FenanBODIPAZo).



Siguiendo el [procedimiento general D](#), usando el compuesto [29](#) (100 mg, 0.23 mmol), el ácido 9-fenantraceniilborónico (102 mg, 0.46 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0.012 mmol), P(2-OMe-Ph)₃ (8 mg, 0.023 mmol) y Na₂CO₃ (74 mg, 0.69 mmol), se obtiene el compuesto [34h](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 44% (58 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.77 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.80 – 7.49 (m, 5H), 7.10 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.91 – 6.83 (m, 1H), 6.72 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 3.81 (s, 1H).

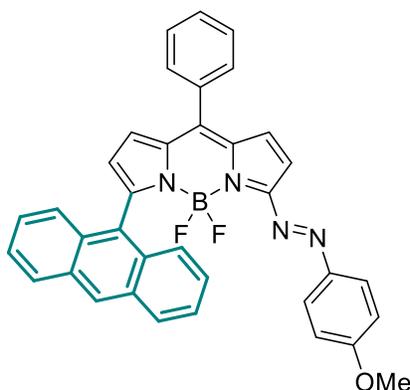
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 163.43 (s), 148.55 (s), 133.95 (s), 130.93 (s), 130.92 (s), 130.90 (s), 130.67 (s), 130.44 (s), 130.42 (s), 130.13 (dd, *J* = 3.3, 2.5 Hz), 128.89 (s), 128.48 (s), 127.57 (s), 126.96 (s), 126.85 (s), 126.75 (s), 126.71 (s), 126.28 (s), 122.96 (s), 122.57 (s), 114.38 (s), 55.59 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = 139.80 (d, *J* = 27.9 Hz), -139.86 (dd, *J* = 55.8, 27.8 Hz), -139.92 (d, *J* = 27.8 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.31 (t, *J* = 28.1 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₃₆H₂₆BF₂N₄O (M⁺): 578.2199; encontrada: 578.2216.

3-(4-Metoxifenil)diazenil-5-(1-antraceni)-8-fenil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno (34f o AntraBODIPAzo).



Siguiendo el [procedimiento general D](#), usando el compuesto [29](#) (100 mg, 0.23 mmol), el ácido 9-antraceniilborónico (102 mg, 0.46 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0.012 mmol), P(2-OMe-Ph)₃ (8 mg, 0.023 mmol) y Na₂CO₃ (74 mg, 0.69 mmol), se obtiene el compuesto [34f](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 26% (34 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.62 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.75 (dd, *J* = 11.1, 3.8 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.46 (td, *J* = 12.6, 5.8 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.95 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.67 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 3.79 (s, 1H).

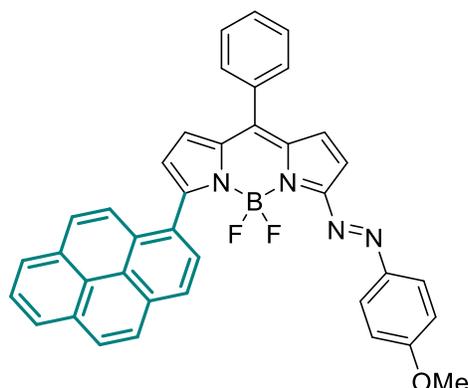
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 163.49 (s), 148.39 (s), 133.92 (s), 131.05 (s), 131.00 (s), 130.72 (s), 130.49 (s), 128.74 (s), 128.50 (s), 128.31 (s), 127.13 (s), 126.84 (s), 126.37 (s), 125.81 (s), 125.30 (s), 114.30 (s), 55.58 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -139.80 (d, *J* = 27.9 Hz), -139.86 (dd, *J* = 55.8, 27.8 Hz), -139.92 (d, *J* = 27.8 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.07 (t, *J* = 27.7 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₃₆H₂₅BF₂N₄O (M⁺): 578.2199; encontrada: 578.2207.

3-(4-Metoxifenil)diazenil-5-(1-pirenil)-8-fenil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno
(34g o PirenBODIPAZo).



Siguiendo el [procedimiento general D](#), usando el compuesto [29](#) (100 mg, 0.23 mmol), el ácido pireno-1-borónico (113 mg, mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0.012 mmol), P(2-OMe-Ph)₃ (8 mg, 0.023 mmol) y Na₂CO₃ (74 mg, 0.69 mmol), se obtiene el compuesto [34g](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 39% (54 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.52 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.20 (dt, *J* = 19.7, 5.2 Hz, 2H), 8.04 (dd, *J* = 18.0, 9.2 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.91 – 6.77 (m, 1H), 3.80 (s, 1H).

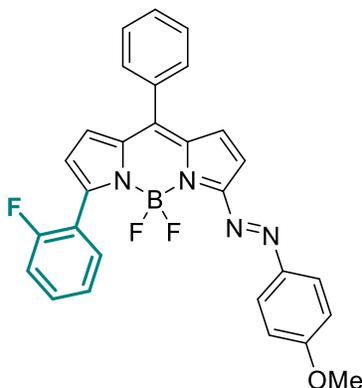
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 163.42 (s), 148.55 (s), 133.98 (s), 132.23 (s), 131.29 (s), 130.89 (s), 130.70 (s), 130.55 (s), 130.42 – 130.39 (m), 129.90 (s), 128.54 (s), 128.50 (s), 128.35 (s), 128.04 (s), 127.63 (s), 127.49 (s), 126.28 (s), 126.08 (s), 125.65 (s), 125.49 (s), 125.40 (s), 124.71 (s), 124.66 (s), 124.25 (s), 114.34 (s), 55.58 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = 143.35 (d, *J* = 27.0 Hz), -143.40 (dd, *J* = 54.2, 26.9 Hz), -143.46 (d, *J* = 26.9 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.35 (t, *J* = 28.4 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₃₈H₂₅BF₂N₄O (M⁺): 602.2199; encontrada: 602.2212.

3-(4-Metoxifenil)diazenil-5-(2-fluorofenil)-8-fenil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno (34c o 2FPhBODIPAZo).



Siguiendo el [procedimiento general D](#), usando el compuesto [29](#) (100 mg, 0.23 mmol), el ácido 2-fluorofenilborónico (64 mg, 0.46 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0.012 mmol), P(2-OMe-Ph)₃ (8 mg, 0.023 mmol) y Na₂CO₃ (74 mg, 0.69 mmol), se obtiene el compuesto [34c](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 56% (64 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.11 - 7.97 (m, 4H), 7.69 – 7.45 (m, 8H), 7.08 – 6.97 (m, 3H), 6.88 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H).

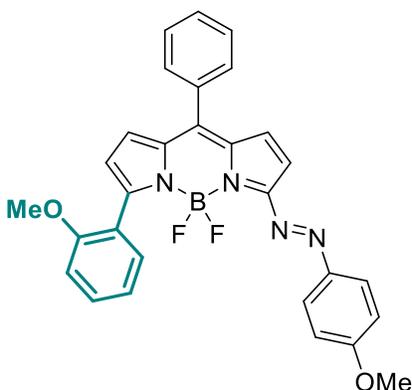
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 163.90 (d, *J* = 46.0 Hz), 162.05 (s), 148.64 (s), 133.83 (s), 131.57 (s), 131.46 (s), 130.63 (s), 130.42 (s), 130.30 (d, *J* = 1.3 Hz), 128.44 (s), 126.38 (s), 124.01 (d, *J* = 3.5 Hz), 123.04 – 122.69 (m), 115.83 (s), 115.69 (d, *J* = 22.2 Hz), 115.54 (s), 114.48 (s), 107.73 (s), 55.69 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -111.90 (s), -112.48 (s), -136.01 (d, *J* = 28.6 Hz), -136.07 (dd, *J* = 57.4, 28.6 Hz), -136.13 (d, *J* = 28.5 Hz), -136.58 (d, *J* = 28.6 Hz), -136.65 (dd, *J* = 57.4, 28.6 Hz), -136.71 (d, *J* = 28.6 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.29 (t, *J* = 28.7 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₂₈H₂₀BF₃N₄O (M⁺): 496.1791; encontrada: 496.1812.

3-(4-Metoxifenil)diazenil-5-(2-metoxifenil)-8-fenil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno (34b o 2OMePhBODIPAZo).



Siguiendo el [procedimiento general D](#), usando el compuesto [29](#) (100 mg, 0.23 mmol), el ácido 2-metoxifenilborónico (69 mg, 0.46 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0.012 mmol), P(2-OMe-Ph)₃ (8 mg, 0.023 mmol) y Na₂CO₃ (74 mg, 0.69 mmol), se obtiene el compuesto [Xx](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 41% (48 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.11 - 7.97 (m, 4H), 7.69 – 7.45 (m, 8H), 7.08 – 6.97 (m, 3H), 6.88 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H).

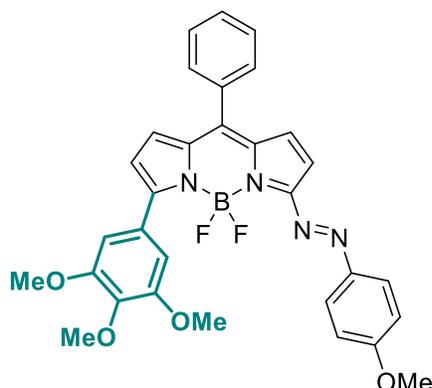
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 167.76 (s), 163.25 (s), 148.75 (s), 134.01 (s), 132.47 (s), 132.26 (s), 130.88 (s), 130.58 (s), 130.16 (s), 128.81 (s), 128.38 (s), 126.08 (s), 125.62 (s), 114.50 (s), 55.69 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = 135.21 (d, *J* = 29.1 Hz), -135.27 (dd, *J* = 58.1, 29.1 Hz), -135.33 (d, *J* = 29.1 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.33 (t, *J* = 28.7 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₂₉H₂₃BF₂N₄O₂ (M⁺): 508;1882 encontrada: 508.1879

3-(4-Metoxifenil)diazenil-5-(3,4,5-trimetoxifenil)-8-fenil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno (34d o OMe₃BODIPAz).



Siguiendo el **procedimiento general D**, usando el compuesto **29** (100 mg, 0.23 mmol), el ácido 3,4,5-trimetoxifenilborónico (98 mg, 0.46 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0.012 mmol), P(2-OMe-Ph)₃ (8 mg, 0.023 mmol) y Na₂CO₃ (74 mg, 0.69 mmol), se obtiene el compuesto **34d** como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 75% (98 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.02 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.71 – 7.48 (m, 3H), 7.37 (s, 1H), 7.10 – 6.94 (m, 2H), 6.89 (q, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.76 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.97 (dd, *J* = 2.4, 0.9 Hz, 4H), 3.91 (d, *J* = 0.7 Hz, 1H).

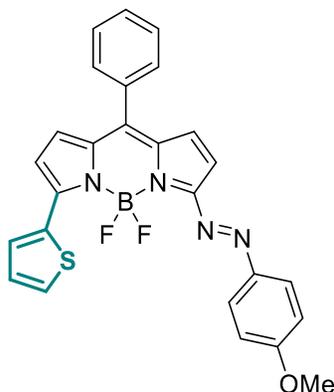
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 163.39 (s), 161.14 (s), 160.89 (s), 152.97 (s), 148.73 (s), 143.26 (s), 143.13 (s), 140.04 (s), 137.88 (s), 133.95 (s), 132.20 (s), 130.63 (s), 130.30 (s), 129.20 (s), 128.43 (s), 127.42 (s), 126.14 (s), 114.48 (s), 107.39 (s), 61.00 (s), 56.31 (s), 55.70 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -134.81 (d, *J* = 29.3 Hz), -134.87 (dd, *J* = 58.5, 29.3 Hz), -134.93 (d, *J* = 29.2 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.52 (t, *J* = 29.3 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₃₁H₂₇BF₂N₄O₄ (M⁺): 568.220.; encontrada: 568.2229.

3-(4-Metoxifenil)diazenil-5-(2-tienil)-8-fenil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno (34i o 2TioBODIPAZo).



Siguiendo el [procedimiento general D](#), usando el compuesto [29](#) (100 mg, 0.23 mmol), el ácido 2-tienilborónico (59 mg, 0.46 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0.012 mmol), P(2-OMe-Ph)₃ (8 mg, 0.023 mmol) y Na₂CO₃ (74 mg, 0.69 mmol), se obtiene el compuesto [34i](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 27% (30 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.45 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.56 (s, 2H), 7.28 (m, 1H), 7.04 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 6.86 (dd, *J* = 24.3, 4.5 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H).

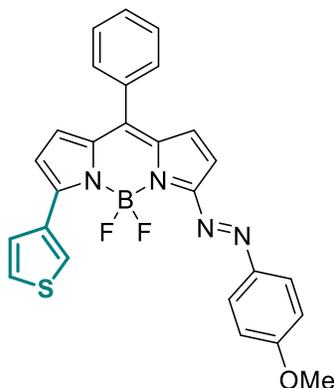
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 167.76 (s), 163.25 (s), 148.75 (s), 134.01 (s), 132.47 (s), 132.26 (s), 130.88 (s), 130.58 (s), 130.16 (s), 128.81 (s), 128.38 (s), 126.08 (s), 125.62 (s), 114.50 (s), 55.69 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -140.15 (d, *J* = 29.6 Hz), -140.22 (dd, *J* = 59.1, 29.6 Hz), -140.28 (d, *J* = 29.6 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.61 (t, *J* = 29.3 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₂₆H₁₉BF₂N₄OS (M⁺): 484.1450, encontrada: 484.1437.

3-(4-Metoxifenil)diazenil-5-(3-tienil)-8-fenil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno (34j o 3TioBODIPAZo).



Siguiendo el [procedimiento general D](#), usando el compuesto [29](#) (100 mg, 0.23 mmol), el ácido 3-tienilborónico (59 mg, 0.46 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0.012 mmol), P(2-OMe-Ph)₃ (8 mg, 0.023 mmol) y Na₂CO₃ (74 mg, 0.69 mmol), se obtiene el compuesto [34j](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 48% (53 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.57 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.57 (s, 2H), 7.42 (s, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.82 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 3.92 (s, 1H).

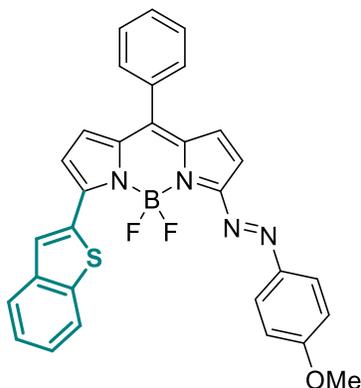
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 167.76 (s), 163.25 (s), 148.75 (s), 134.01 (s), 132.47 (s), 132.26 (s), 130.88 (s), 130.58 (s), 130.16 (s), 128.81 (s), 128.38 (s), 126.08 (s), 125.62 (s), 114.50 (s), 55.69 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -138.81 (d, *J* = 29.8 Hz), -138.88 (dd, *J* = 59.4, 29.7 Hz), -138.94 (d, *J* = 29.7 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.61 (t, *J* = 29.5 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₂₆H₁₉BF₂N₄OS (M⁺): 484.1450; encontrada: 484.1478.

3-(4-Metoxifenil)diazenil-5-(2-benzo[*b*]tienil)-8-fenil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno (34k o BTioBODIPAZo).



Siguiendo el [procedimiento general D](#), usando el compuesto [29](#) (xx mg, xx mmol), el ácido benzo[*b*]tien-2-ilborónico (82 mg, 0.46 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0.012 mmol), P(2-OMe-Ph)₃ (8 mg, 0.023 mmol) y Na₂CO₃ (74 mg, 0.69 mmol), se obtiene el compuesto [34k](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 34% (42 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.66 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.05 – 7.94 (m, *J* = 9.4 Hz, 1H), 7.88 – 7.81 (m, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.65 – 7.49 (m, 5H), 7.46 – 7.36 (m, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.97 (s, 2H), 6.91 (dd, *J* = 16.9, 4.5 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H).

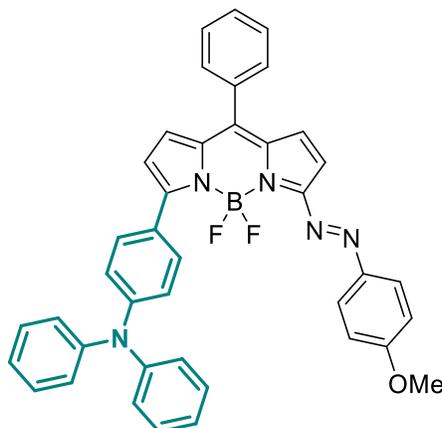
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 163.58 (s), 148.83 (s), 141.21 (s), 140.86 (s), 133.88 (s), 133.88 (s), 133.23 (s), 133.23 (s), 131.72 (s), 131.72 (s), 130.61 (s), 130.30 (s), 129.55 (s), 128.45 (s), 126.34 (s), 126.21 (s), 125.65 (s), 124.85 (s), 122.37 (s), 121.91 (s), 114.59 (s), 107.86 (s), 55.73 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = 139.50 (d, *J* = 29.5 Hz), -139.56 (dd, *J* = 58.9, 29.5 Hz), -139.62 (d, *J* = 29.5 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.67 (t, *J* = 29.5 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₃₀H₂₁BF₂N₄OS (M⁺): 534.1606; encontrada: 534.1609.

3-(4-Metoxifenil)diazenil-5-(4-(*N,N*-difenilamino)fenil)-8-fenil-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno (34I o Ph₂NPhBODIPAzo).



Siguiendo el [procedimiento general D](#), usando el compuesto [29](#) (100 mg, 0.23 mmol), el ácido 4-(difenilamino)fenilborónico (133 mg, 0.46 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0.012 mmol), P(2-OMe-Ph)₃ (8 mg, 0.023 mmol) y Na₂CO₃ (74 mg, 0.69 mmol), se obtiene el compuesto [34I](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 87% (130 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.04 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.70 – 7.47 (m, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 6.8, 5.6 Hz, 2H), 7.20 – 7.06 (m, 1H), 7.00 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 6.85 (dd, *J* = 9.4, 4.5 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.90 (s, 1H).

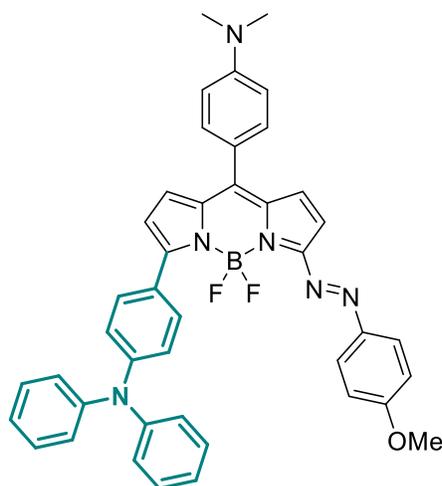
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 162.94 (s), 150.02 (s), 148.69 (s), 146.65 (s), 134.21 (s), 132.54 (t, *J* = 4.9 Hz), 131.39 (d, *J* = 6.3 Hz), 130.63 (s), 129.97 (s), 129.55 (s), 128.34 (s), 127.48 (d, *J* = 5.7 Hz), 126.02 (s), 125.90 (s), 124.43 (s), 124.01 (s), 123.28 – 121.76 (m), 120.31 (s), 114.42 (s), 55.66 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -136.18 (d, *J* = 29.7 Hz), -136.24 (dd, *J* = 59.5, 29.8 Hz), -136.30 (d, *J* = 29.8 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.64 (t, *J* = 29.8 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₄₀H₃₀BF₂N₅O (M⁺): 645.2621; encontrada: 645.2635.

3-(4-Metoxifenil)diazenil-5-(4-(*N,N*-difenilamino)fenil)-8-(4-(*N,N*-dimetilamino)fenil)-4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indaceno (34m o Ph₂NPhNMe₂BODIPAZo).



Seguendo el [procedimiento general D](#), usando el compuesto [33](#) (110 mg, 0.23 mmol), el ácido 4-(difenilamino)fenilborónico (133 mg, 0.46 mmol), Pd(OAc)₂ (3 mg, 0.012 mmol), P(2-OMe-Ph)₃ (8 mg, 0.023 mmol) y Na₂CO₃ (74 mg, 0.69 mmol), se obtiene el compuesto [34m](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 51% (81 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.04 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.70 – 7.47 (m, 2H), 7.34 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 6.8, 5.6 Hz, 2H), 7.20 – 7.06 (m, 1H), 7.00 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 6.85 (dd, *J* = 9.4, 4.5 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.90 (s, 1H).

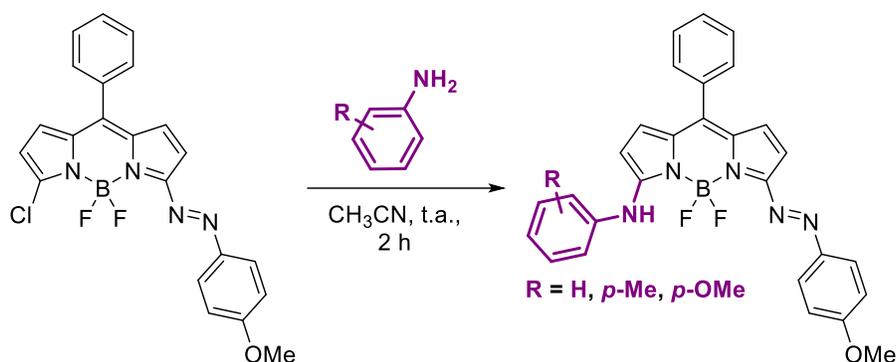
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 162.94 (s), 150.02 (s), 148.69 (s), 146.65 (s), 134.21 (s), 132.54 (t, *J* = 4.9 Hz), 131.39 (d, *J* = 6.3 Hz), 130.63 (s), 129.97 (s), 129.55 (s), 128.34 (s), 127.48 (d, *J* = 5.7 Hz), 126.02 (s), 125.90 (s), 124.43 (s), 124.01 (s), 123.28 – 121.76 (m), 120.31 (s), 114.42 (s), 55.66 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = 138.81 (d, *J* = 29.8 Hz), -138.88 (dd, *J* = 59.4, 29.7 Hz), -138.94 (d, *J* = 29.7 Hz)

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.67 (t, *J* = 29.5 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₄₂H₃₅BF₂N₆O (M⁺): 688.3043; encontrada: 688.3050.

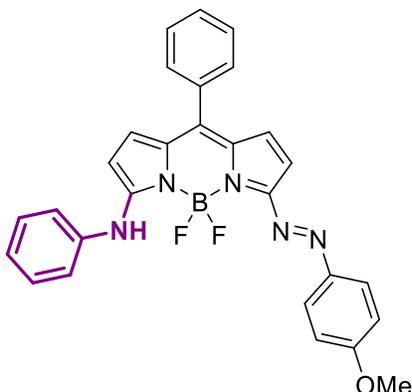
Procedimiento general E para la síntesis de 3-*aril*amino-5-(4-metoxifenil)diazenil-8-fenil-4,4-difluoro-3*a*,4*a*-diazas-indaceno.



El 3-Cloro-5-(4-metoxifenil)diazenil-8-fenil-4,4-difluoro-3*a*,4*a*-diazas-indaceno [29](#) y la correspondiente *aril*amina (2.0 equiv) se añaden en un tubo de microondas previamente secado en el horno. El tubo se sella y se deja en atmosfera inerte haciendo ciclos de vacío-argón 3 veces antes de añadir el acetonitrilo anhidro (0.03 M). La disolución resultante se deja agitando 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, el disolvente se elimina a vacío y el residuo resultante se purifica en columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla de heptano/diclorometano-1/1 obteniéndose así el producto deseado como un sólido cristalino oscuro.

3-Anilil-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno
o AniBODIPAZo).

(34n)



Seguendo el [procedimiento general E](#), usando el compuesto [29](#) (100 mg, 0.23 mmol) y anilina (43 mg, 0.46 mmol), se obtiene el compuesto [34n](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 87% (99 mg).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.35 (s, 1H), 8.00 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.45 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.58 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 6.50 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 3.89 (s, 1H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 8.11 - 7.97 (m, 4H), 7.69 - 7.45 (m, 8H), 7.08 - 6.97 (m, 3H), 6.88 (d, J = 4.9 Hz, 2H), 6.75 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H).

$^{19}\text{F-RMN}$ (282 MHz, CDCl_3): δ = 135.21 (d, J = 29.1 Hz), -135.27 (dd, J = 58.1, 29.1 Hz), -135.33 (d, J = 29.1 Hz).

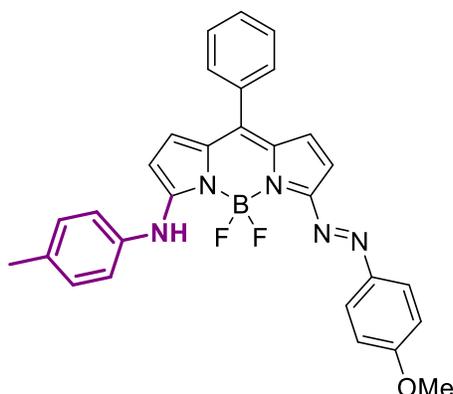
$^{11}\text{B-RMN}$ (96 MHz, CDCl_3): δ = 1.47 (t, J = 29.1 Hz).

EMAR (IES): Calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}$ (M⁺): 493.1885; encontrada: 493.1872

3-Toluidinil-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno

(34o)

o TolHBODIPAZo).



Seguendo el procedimiento general E, usando el compuesto 29 (xx mg, xx mmol) y toluidina (49 mg, 0.46 mmol), se obtiene el compuesto 34o como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 90% (105 mg).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.33 (s, 1H), 8.04 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.50 (s, 5H), 7.21 (t, J = 8.0 Hz, 4H), 6.99 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 6.57 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H).

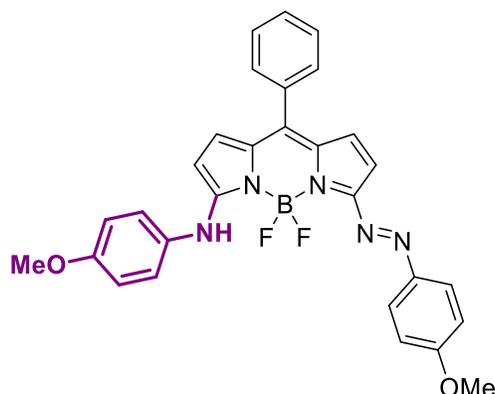
$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 163.90 (d, J = 46.0 Hz), 162.05 (s), 148.64 (s), 133.83 (s), 131.57 (s), 131.46 (s), 130.63 (s), 130.42 (s), 130.30 (d, J = 1.3 Hz), 128.44 (s), 126.38 (s), 124.01 (d, J = 3.5 Hz), 123.04 – 122.69 (m), 115.83 (s), 115.69 (d, J = 22.2 Hz), 115.54 (s), 114.48 (s), 107.73 (s), 55.69 (s).

$^{19}\text{F-RMN}$ (282 MHz, CDCl_3): δ = 135.21 (d, J = 29.1 Hz), -135.27 (dd, J = 58.1, 29.1 Hz), -135.33 (d, J = 29.1 Hz).

$^{11}\text{B-RMN}$ (96 MHz, CDCl_3): δ = 1.64 (t, J = 29.8 Hz)

EMAR (IES): Calculada para $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}$ (M⁺): 507.2042; encontrada: 507.2061

3-Anisidinil-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno
(34p o AnisiBODIPAzo).



Siguiendo el [procedimiento general E](#), usando el compuesto [29](#) (100 mg, 0.23 mmol) y anisidina (57 mg, 0.46 mmol), se obtiene el compuesto [34p](#) como un sólido cristalino azul oscuro con un rendimiento del 89% (107 mg).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.25 (s, 1H), 8.01 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.50 (s, 5H), 7.23 (s, 4H), 6.98 (t, J = 8.6 Hz, 4H), 6.56 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 6.36 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.85 (s, 3H).

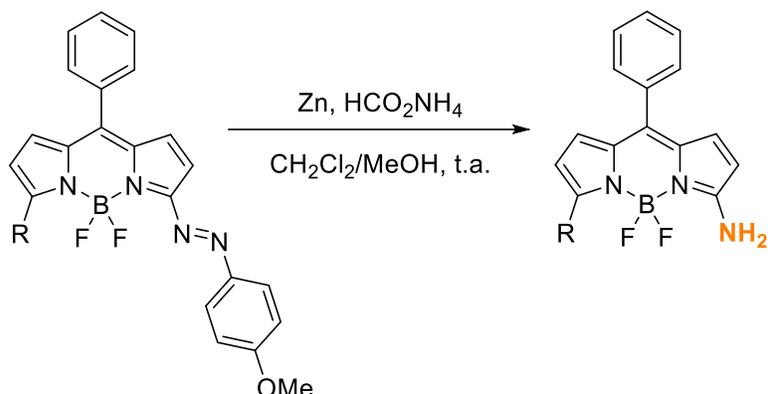
$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 167.76 (s), 163.25 (s), 148.75 (s), 134.01 (s), 132.47 (s), 132.26 (s), 130.88 (s), 130.58 (s), 130.16 (s), 128.81 (s), 128.38 (s), 126.08 (s), 125.62 (s), 114.50 (s), 55.69 (s).

$^{19}\text{F-RMN}$ (282 MHz, CDCl_3): δ = 135.21 (d, J = 29.1 Hz), -135.27 (dd, J = 58.1, 29.1 Hz), -135.33 (d, J = 29.1 Hz).

$^{11}\text{B-RMN}$ (96 MHz, CDCl_3): δ = 1.33 (t, J = 28.7 Hz).

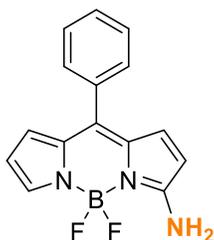
EMAR (IES): Calculada para $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_2$ (M⁺): 523.1991; encontrada: 523.1983.

Procedimiento general F para la síntesis de 3-amino-5-aryl-8-fenil-4,4-difluore-3a,4a-diaza-s-indaceno.



El correspondiente 3-aryl-5-(4-metoxifenil)diazenil-8-aryl-4,4-difluore-3a,4a-diaza-s-indaceno **34**, y Zinc (10 equiv) se añaden en un matraz y sobre ellos se añade el diclorometano y se dejan en agitación vigorosa. Sobre la suspensión resultante se añade el formiato amónico (20 mmol) disuelto en la mínima cantidad de metanol y la reacción se deja agitando a temperatura ambiente hasta que se observa la completa desaparición del producto de partida. Finalmente se filtra la suspensión por una columna pequeña de celita, el disolvente se elimina a vacío y el residuo resultante se purifica en columna cromatográfica usando como eluyente una mezcla de heptano/Acetato de etilo, obteniéndose así el producto deseado como un sólido cristalino rojo oscuro.

3-Amino-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (Xx o HBODIPNH₂).



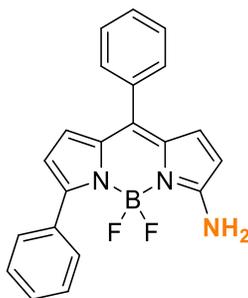
Siguiendo el **procedimiento general F**, usando el compuesto **Xx** (50 mg, 0.12 mmol), Zinc (78 mg, 1.2 mmol) y HCO₂NH₄ (151 mg, 2.4 mmol), se obtiene el compuesto **Xx** como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del XX% (xx mg).

p.f.: XX-XX °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.48 (s, 6H), 6.91 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.09 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.81 (s, 2H).

EMAR (IES): Calculada para C₁₅H₁₂BF₂N₃ (M⁺): 283.1092; encontrada: 283.1107

3-Amino-5,8-difenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (35a o PhBODIPNH₂).



Siguiendo el **procedimiento general F**, usando el compuesto **34a** (100 mg, 0.21 mmol), Zinc (137 mg, 2.1 mmol) y HCO₂NH₄ (265 mg, 4.2 mmol), se obtiene el compuesto **35a** como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del 98% (70 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.83 (d, *J* = 6.97 Hz, 2H), 7.56 – 7.31 (m, 8H), 6.86 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.50 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 6.41 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 6.03 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.71 (s, 2H).

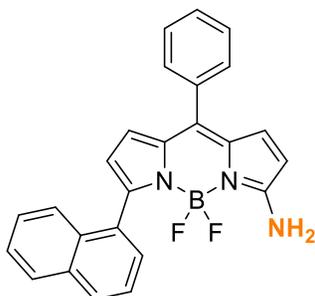
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.69 (s), 148.38 (s), 134.94 (s), 134.57 (s), 134.41 (s), 134.26 (s), 132.61 (s), 130.39 (s), 129.17 (s), 129.12 (s), 129.08 (s), 128.17 (s), 127.91 (s), 127.83 (s), 122.27 (s), 115.60 (s), 112.48 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -142.08 (d, *J* = 33.8 Hz), -142.15 (dd, *J* = 68.7, 33.9 Hz), -142.22 (d, *J* = 33.9 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.41 (t, *J* = 34.5 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₂₁H₁₆BF₂N₃ (M⁺): 357.1514; encontrada: 357.1462.

3-Amino-5-(1-naftalenil)-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (35e o NaphBODIPNH₂).



Siguiendo el **procedimiento general F**, usando el compuesto **34e** (62 mg, 0.12 mmol), Zinc (78 mg, 1.2 mmol) y HCO₂NH₄ (151 mg, 2.4 mmol), se obtiene el compuesto **35e** como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del 99% (151 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 7.79 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.65 – 7.36 (m, 8H), 6.83 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.57 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.38 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.88 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 5.31 (s, 2H).

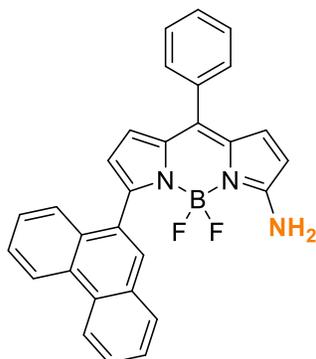
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.85 (s), 144.68 (s), 135.11 (s), 134.64 (s), 133.45 (s), 133.32 (s), 133.19 (s), 133.00 (s), 132.52 (s), 130.41 (s), 129.15 (s), 128.67 (d, *J* = 2.2 Hz), 128.32 (s), 128.21 (s), 127.90 (s), 126.91 (s), 124.96 (s), 120.68 (s), 116.83 (s), 112.93 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = 149.10 (d, *J* = 32.4 Hz), -149.17 (dd, *J* = 65.7, 32.0 Hz), -149.24 (d, *J* = 31.7 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.14 (t, *J* = 33.6 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₁₄H₁₀BrF₃N₂O (M⁺): 410.1635; encontrada: 410.1643.

3-Amino-5-(9-fenantraceni)-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno
(35h o PhenanBODIPNH₂).



Siguiendo el **procedimiento general F**, usando el compuesto **34h** (27 mg, 0.05 mmol), Zinc (33 mg, 0.5 mmol) y HCO₂NH₄ (63 mg, 1.0 mmol), se obtiene el compuesto **35h** como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del 96% (22 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.73 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 8.05 (s, 1H), 7.94 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.76 – 7.37 (m, 9H), 6.85 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.60 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.41 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.86 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 5.40 (s, 2H).

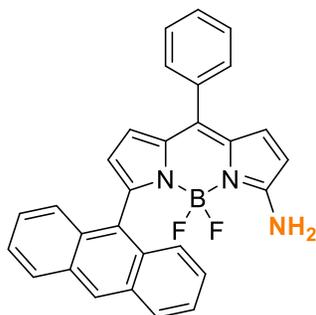
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.45 (s), 148.59 (s), 147.51 (s), 147.43 (s), 134.67 (s), 134.45 (s), 133.93 (s), 132.34 (s), 130.42 (s), 129.79 (t, *J* = 3.5 Hz), 129.31 (s), 129.12 (s), 128.15 (s), 127.75 (s), 124.98 (s), 123.20 (s), 122.70 (s), 122.01 (s), 116.48 (s), 115.62 (s), 114.87 (s), 112.11 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = 139.80 (d, *J* = 27.9 Hz), -139.86 (dd, *J* = 55.8, 27.8 Hz), -139.92 (d, *J* = 27.8 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.49 (t, *J* = 34.5 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₂₉H₂₀BF₂N₃ (M⁺): 459.1827; encontrada: 459.1772.

3-Amino-5-(9-antracencil)-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno
(35f o AntraBODIPN_H₂).



Siguiendo el **procedimiento general F**, usando el compuesto **34f** (27 mg, 0.05 mmol), Zinc (33 mg, 0.5 mmol) y HCO₂NH₄ (63 mg, 1.0 mmol), se obtiene el compuesto **35f** como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del 98% (22 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.54 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.69 – 7.34 (m, 10H), 6.89 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.42 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.97 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 5.36 (s, 2H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.83 (s), 144.75 (s), 135.12 (s), 134.63 (s), 133.52 (s), 133.32 (s), 133.19 (s), 132.99 (s), 132.49 (s), 130.41 (s), 129.15 (s), 128.67 (s), 128.33 (s), 128.21 (s), 127.91 (s), 126.90 (s), 125.95 (s), 125.79 (s), 124.95 (s), 120.73 (s), 116.85 (s), 112.88 (s).

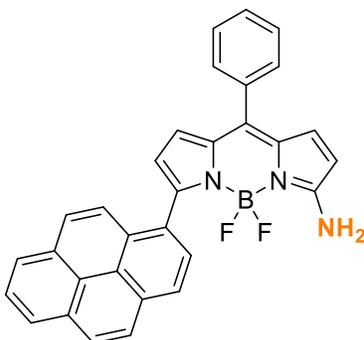
¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = 139.80 (d, *J* = 27.9 Hz), -139.86 (dd, *J* = 55.8, 27.8 Hz), -139.92 (d, *J* = 27.8 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.14 (t, *J* = 33.9 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₂₉H₂₀BF₂N₃ (M⁺): 459.1671; encontrada: 459.1591.

3-Amino-5-(1-pirenil)-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno
o PirenBODIPNH₂).

(35g)



Seguendo el **procedimiento general F**, usando el compuesto **34f** (28 mg, 0.05 mmol), Zinc (33 mg, 0.5 mmol) y HCO₂NH₄ (63 mg, 1.0 mmol), se obtiene el compuesto **35g** como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del 24% (99 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = δ 8.34 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.60 (dd, *J* = 6.6, 2.7 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 4.9, 1.8 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.50 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 5.82 (s, 1H), 5.39 (s, 1H).

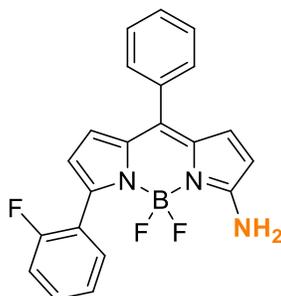
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 163.42 (s), 148.55 (s), 133.98 (s), 132.23 (s), 131.29 (s), 130.89 (s), 130.70 (s), 130.55 (s), 130.42 – 130.39 (m), 129.90 (s), 128.54 (s), 128.50 (s), 128.35 (s), 128.04 (s), 127.63 (s), 127.49 (s), 126.28 (s), 126.08 (s), 125.65 (s), 125.49 (s), 125.40 (s), 124.71 (s), 124.66 (s), 124.25 (s), 114.34 (s), 55.58 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -148.89 (d, *J* = 32.5 Hz), -148.96 (dd, *J* = 65.4, 32.6 Hz), -149.03 (d, *J* = 32.6 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.22 (t, *J* = 34.1 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₃₁H₂₀BF₂N₃ (M⁺): 483.1827; encontrada: 483.1770.

3-Amino-5-(2-fluorofenil)-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (35c)
o 2FPhBODIPNH₂).



Siguiendo el **procedimiento general F**, usando el compuesto **34c** (46 mg, 0.09 mmol), Zinc (59 mg, 0.9 mmol) y HCO₂NH₄ (114 mg, 1.8 mmol), se obtiene el compuesto **35c** como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del 97% (33 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.84 (td, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 1H), 7.84 (td, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 1H), 7.57 – 7.42 (m, 5H), 7.59 – 7.42 (m, 5H), 7.42 – 7.29 (m, 1H), 7.42 – 7.31 (m, 1H), 7.23 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 7.23 (td, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 7.19 – 7.10 (m, 1H), 7.19 – 7.10 (m, 1H), 6.88 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.52 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 6.52 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.05 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 6.05 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 5.72 (s, 2H), 5.72 (s, 2H).

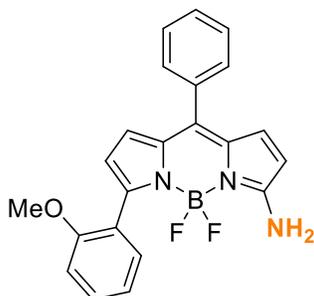
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 162.06 (s), 161.09 (s), 158.78 (s), 139.80 (s), 135.39 (s), 134.44 (s), 133.90 (s), 133.84 (s), 133.08 (s), 132.37 (s), 130.37 (s), 129.77 (s), 129.67 (s), 129.21 (s), 128.21 (s), 123.34 (s), 123.29 (s), 122.48 (s), 122.28 (s), 121.22 (s), 116.66 (s), 115.54 (s), 115.24 (s), 113.19 (s), 113.19 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -113.27 (dd, *J* = 10.2, 6.8 Hz), -143.06 – -144.22 (m).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.23 (t, *J* = 34.2 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₂₁H₁₅BF₃N₃ (M⁺): 377.1420; encontrada: 377.1380.

3-Amino-5-(2-metoxifenil)-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (35b)
o 2OMePhBODIPNH₂).



Siguiendo el **procedimiento general F**, usando el compuesto **34b** (25 mg, 0.05 mmol), Zinc (33 mg, 0.5 mmol) y HCO₂NH₄ (63.09 mg, 1.0 mmol), se obtiene el compuesto **35b** como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del 82% (16 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = -8.11 - 7.97 (m, 4H), 7.69 – 7.45 (m, 8H), 7.08 – 6.97 (m, 3H), 6.88 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H).

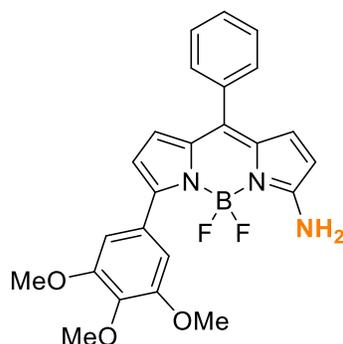
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.64 (s), 157.88 (s), 143.77 (s), 134.84 (s), 134.68 (s), 134.03 (s), 133.31 (s), 132.68 (s), 132.22 (s), 130.40 (s), 129.55 (s), 129.06 (s), 128.11 (s), 123.65 (s), 121.53 (s), 119.80 (s), 116.63 (s), 112.27 (s), 111.00 (s), 55.88 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -144.24 (d, *J* = 32.5 Hz), -144.31 (dd, *J* = 67.3, 32.5 Hz), -144.38 (d, *J* = 32.6 Hz), -149.11 (d, *J* = 13.7 Hz), -149.15 (s).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.19 (t, *J* = 34.0 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₂₂H₁₈BF₂N₃O (M⁺):389.1511; encontrada: 389.1536.

3-Amino-5-(3,4,5-trimetoxifenil)-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (35d o OMe₃PhBODIPNH₂).



Seguendo el procedimiento general F, usando el compuesto 34d (25 mg, 0.04 mmol), Zinc (26 mg, 0.4 mmol) y HCO₂NH₄ (50 mg, 0.8 mmol), se obtiene el compuesto 35d como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del 72% (13 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.48 (d, *J* = 2.5 Hz, 5H), 7.11 (s, 2H), 6.85 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 6.05 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.81 (s, 2H), 3.91 (d, *J* = 1.1 Hz, 9H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.9, 152.6 (2C), 147.8, 137.7, 134.9, 134.5, 134.4, 133.6, 132.7, 130.4 (2C), 130.0, 129.1, 128.2 (2C), 121.8, 115.3, 113.0, 106.5, 60.9, 56.1 (2C).

160.97 (s), 152.64 (s), 147.84 (s), 137.74 (s), 134.95 (s), 134.57 (s), 134.39 (s), 133.64 (s), 132.76 (s), 130.39 (s), 129.99 (s), 129.16 (s), 128.19 (s), 121.82 (s), 115.30 (s), 113.01 (s), 106.56 (s), 60.93 (s), 56.14 (s).

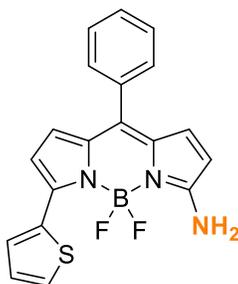
¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -141.65 (d, *J* = 32.8 Hz), -141.77 (dd, *J* = 68.0, 33.3 Hz), -141.89 (d, *J* = 33.8 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.42 (t, *J* = 33.9 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₂₄H₂₂BF₂N₃O₃ (M⁺): 449.1831; encontrada: 449.1836.

3-Amino-5-(2-tienil)-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno
2ThioBODIPNH₂).

(35j o



Siguiendo el **procedimiento general F**, usando el compuesto **34j** (28 mg, 0.06 mmol), Zinc (39 mg, 0.6 mmol) y HCO₂NH₄ (76 mg, 1.2 mmol), se obtiene el compuesto **35j** como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del 87% (19 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.81 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.47 (s, 6H), 7.30 (dd, *J* = 5.1, 1.1 Hz, 1H), 7.11 (dd, *J* = 5.1, 3.7 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 6.06 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.76 (s, 2H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.58 (s), 140.89 (s), 135.78 (s), 134.75 (s), 134.58 (s), 134.45 (s), 133.73 (s), 132.75 (s), 130.36 (s), 129.19 (s), 128.07 (d, *J* = 17.6 Hz), 127.36 (s), 127.27 (s), 127.18 (s), 125.59 (s), 122.44 (s), 116.08 (s), 112.44 (s).

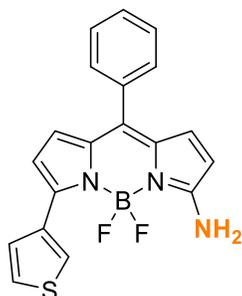
¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -144.18 (t, *J* = 26.1 Hz), -144.22 (dd, *J* = 60.6, 42.7 Hz), -144.34 (s).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.43 (t, *J* = 34.7 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₁₉H₁₄BF₂N₃S (M⁺): 365.1079; encontrada: 365.1008.

3-Amino-5-(3-tienil)-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno
o 3-ThioBODIPN NH_2).

(35i)



Siguiendo el **procedimiento general F**, usando el compuesto **34i** (21 mg, 0.043 mmol), Zinc (28 mg, 0.43 mmol) y HCO_2NH_4 (54 mg, 0.86 mmol), se obtiene el compuesto **35i** como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del 89% (14 mg).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.95 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.57 (dd, J = 5.0, 1.1 Hz, 1H), 7.51 – 7.43 (m, 5H), 7.33 (dd, J = 5.0, 3.0 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 6.50 (dd, J = 11.1, 3.9 Hz, 2H), 6.05 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.74 (s, 2H).

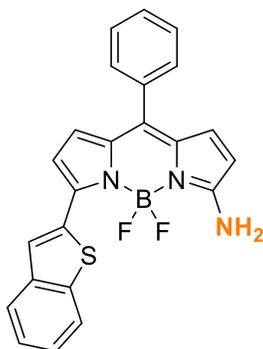
$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 160.52 (s), 143.23 (s), 134.66 (s), 134.55 (s), 134.18 (s), 134.00 (s), 132.55 (s), 130.37 (s), 129.16 (s), 128.74 (t, J = 2.8 Hz), 128.16 (s), 124.56 (s), 123.93 (t, J = 6.6 Hz), 122.52 (s), 115.42 (s), 112.23 (s).

$^{19}\text{F-RMN}$ (282 MHz, CDCl_3): δ = -143.70 (d, J = 34.4 Hz), -143.77 (dd, J = 69.6, 34.4 Hz), -143.85 (d, J = 34.5 Hz).

$^{11}\text{B-RMN}$ (96 MHz, CDCl_3): δ = 1.48 (t, J = 34.9 Hz).

EMAR (IES): Calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{BF}_2\text{N}_3\text{S}$ (M^+): 365.1079; encontrada: 365.1014.

3-Amino-5-(2-benzo[b]tienyl)-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (35k o 2BThioBODIPNH₂).



Seguindo el **procedimiento general F**, usando el compuesto **34k** (50 mg, 0.094 mmol), Zinc (61 mg, 0.94 mmol) y HCO₂NH₄ (114 mg, 1.8 mmol), se obtiene el compuesto **35k** como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del 83% (32.5 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.09 (s, 1H), 7.80 (dd, *J* = 16.7, 1.5 Hz, 2H), 7.48 (s, 5H), 7.32 (dt, *J* = 6.2, 5.6 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.07 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.85 (s, 2H).

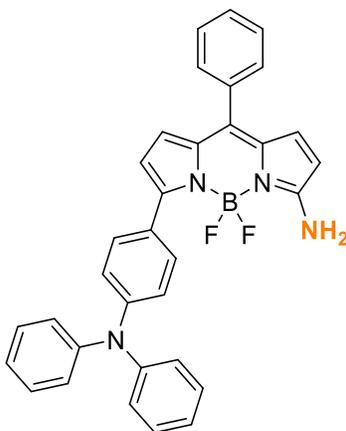
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.92 (s), 141.03 (s), 140.28 (s), 139.66 (s), 135.39 (s), 135.06 (s), 134.37 (s), 133.53 (s), 133.22 (s), 130.36 (s), 129.25 (s), 128.23 (s), 116.98 (s), 113.07 (s), 29.70 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -144.18 (d, *J* = 34.0 Hz), -144.25 (dd, *J* = 69.0, 34.1 Hz), -144.33 (d, *J* = 34.2 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.50 (t, *J* = 34.3 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₂₃H₁₆BF₂N₃S (M⁺): 415.1235; encontrada: 415.1170.

3-Amino-5-(4-N,N-difenilamino)fenil)-8-fenil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (35I o Ph₂NPhBODIPNH₂).



Siguiendo el **procedimiento general F**, usando el compuesto **34I** (52 mg, 0.081 mmol), Zinc (53 mg, 0.81 mmol) y HCO₂NH₄ (102 mg, 1.6 mmol), se obtiene el compuesto **35I** como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del 84% (44 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.58 – 7.42 (m, 3H), 7.22 – 7.13 (m, 2H), 7.13 – 7.00 (m, 2H), 6.83 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 6.50 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 6.01 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 5.71 (s, 1H).

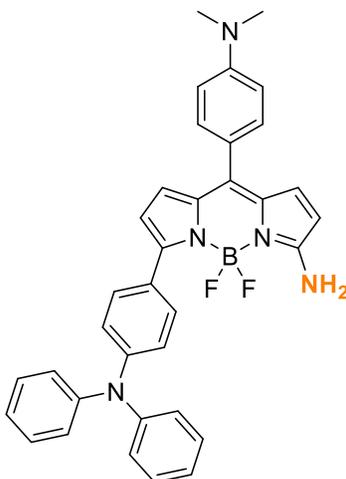
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 160.45 (s), 147.51 (s), 147.43 (s), 139.92 (s), 134.67 (s), 134.45 (s), 133.93 (s), 132.34 (s), 130.42 (s), 129.79 (t, *J* = 3.5 Hz), 129.31 (s), 129.12 (s), 128.15 (s), 127.75 (s), 124.98 (s), 123.20 (s), 122.70 (s), 122.01 (s), 116.48 (s), 115.62 (s), 114.87 (s), 112.11 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -141.82 (d, *J* = 32.7 Hz), -141.90 (dd, *J* = 68.8, 32.8 Hz), -141.97 (d, *J* = 32.9 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.49 (t, *J* = 34.5 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₃₃H₂₅BF₃N₃ (M⁺): 526.2141; encontrada: 526.2135.

3-Amino-5-(4-N,N-difenilamino)fenil)-8-(4-N,N-dimetil)fenil)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**35m** o Ph₂NPhNMe₂BODIPNH₂).



Siguiendo el **procedimiento general F**, usando el compuesto **34m** (40 mg, 0.06 mmol), Zinc (39 mg, 0.6 mmol) y HCO₂NH₄ (76 mg, 1.2 mmol), se obtiene el compuesto **35m** como un sólido cristalino rojo oscuro con un rendimiento del 81% (25 mg).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.35 – 7.22 (m, 1H), 7.16 (dd, *J* = 8.5, 1.1 Hz, 1H), 7.13 – 6.99 (m, 1H), 6.93 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 5.98 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 5.61 (s, 1H), 3.05 (s, 1H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 162.94 (s), 150.02 (s), 148.69 (s), 146.65 (s), 134.21 (s), 132.54 (t, *J* = 4.9 Hz), 131.39 (d, *J* = 6.3 Hz), 130.63 (s), 129.97 (s), 129.55 (s), 128.34 (s), 127.48 (d, *J* = 5.7 Hz), 126.02 (s), 125.90 (s), 124.43 (s), 124.01 (s), 123.28 – 121.76 (m), 120.31 (s), 114.42 (s), 55.66 (s).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ = -142.36 (d, *J* = 33.5 Hz), -142.43 (dd, *J* = 69.3, 33.6 Hz), -142.51 (d, *J* = 33.7 Hz).

¹¹B-RMN (96 MHz, CDCl₃): δ = 1.46 (t, *J* = 35.0 Hz).

EMAR (IES): Calculada para C₃₅H₃₀BF₂N₃ (M⁺): 569.2671; encontrada: 569.2598.

3. ENSAYOS ENZIMÁTICOS.

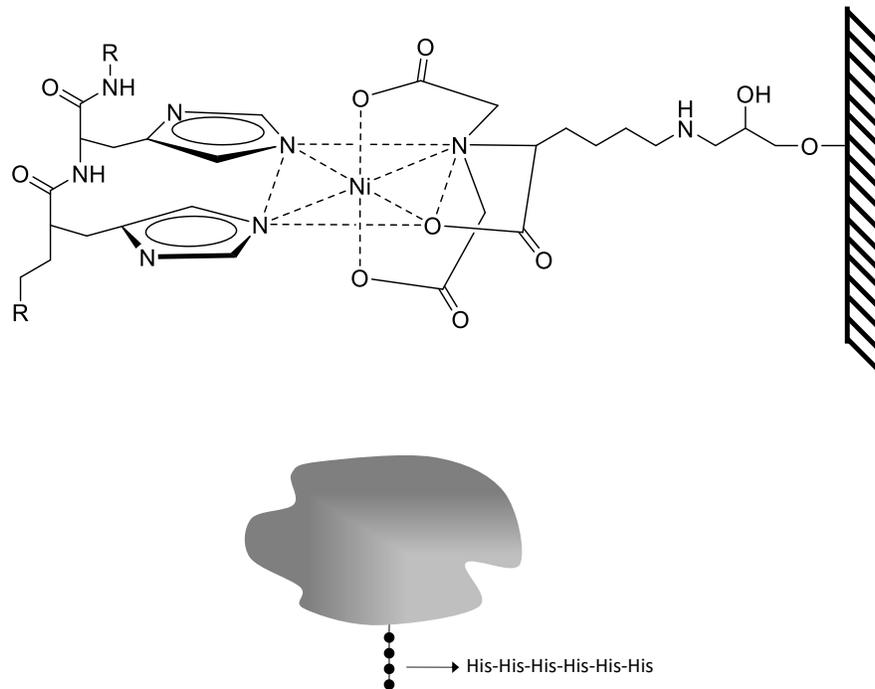
Expresión, producción y purificación de la Azoreductasa del microorganismo *Bacillus cereus*.

El gen codificante para la enzima AzoRBc se clonó en un plásmido pET28b para ser expresado de manera recombinante en el organismo *E. coli* BL21(DE3). La expresión se realizó en un medio de autoinducción ZY suplementado con 30 µg/mL de kanamicina a 37 °C durante 16 horas. El pellet de células se recolectó mediante centrifugación a 4000 rpm durante 30 minutos.

El pellet de células se re-suspendió en tampón 50 mM fosfato sódico, 150 mM NaCl, 5 mM Imidazol y 3 mM benzamidina de pH 7.4 y se lisó mediante ciclos de sonicación de 10 segundos ON/OFF a una amplitud del 20% en un baño de agua-hielo. Posteriormente, se centrifugó el lisado durante 30 minutos a 14000 rpm. Se descarta el pellet, y la proteína se purificó por gradiente de imidazol empleando una columna de agarosa IDA-Ni²⁺ (gracias al dominio de poli-histidina presente en el N-terminal de la enzima), empleando para su elución un tampón 50 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl y 250 mM Imidazol. Finalmente, la enzima pura se dializó frente a 25 mM de fosfato de sodio pH 7 y se guardó a 4 °C. Finalmente, se determina la concentración de proteína mediante el kit BCA de Pierce® y su pureza mediante SDS-PAGE (Figura 1)(6).

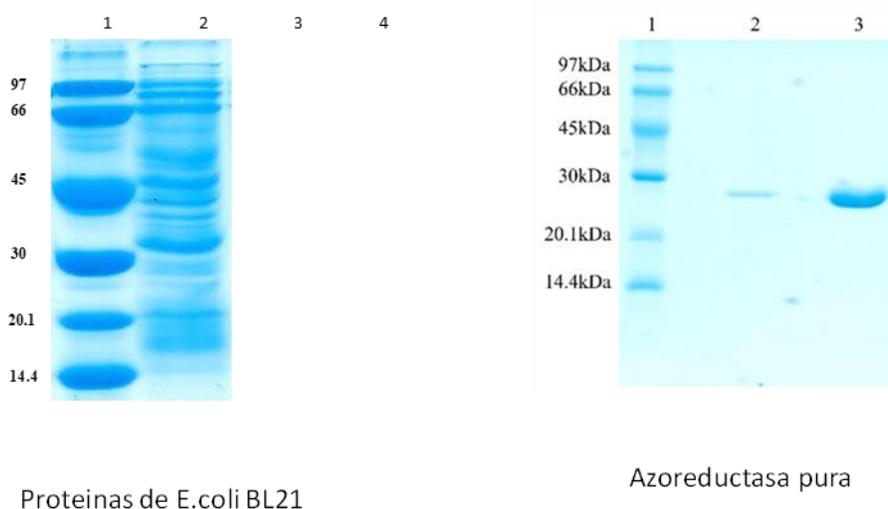
Purificación de la azoreductasa.

El plásmido conteniendo el gen que codifica la enzima se expresó en *Escherichia coli* BL21. Aunque no hay descrita ninguna enzima con actividad azoreductasa de este microorganismo se prefirió purificar completamente la enzima de *Bacillus cereus* para no tener ninguna otra actividad enzimática que pudiera generar artefactos. Para purificar fácilmente la enzima se adquirió un plásmido con su gen al que se le habían añadido 6 residuos Histidina en el amino terminal. De este modo la enzima se podía purificar fácilmente por adsorción selectiva sobre soportes activados con quelatos metálicos.



SDS-PAGE ELECTROFORESIS

Las proteínas desnaturalizadas (hervidas durante 5 minutos en presencia de SDS) se despliegan completamente. Los bolsillos hidrofóbicos se cargan en el surfactante aniónico SDS (dodecilsulfato sódico) y adquieren una gran carga negativa similar para todas las proteínas. Estas proteínas se hacen correr entre un polo negativo y un polo positivo a través de gel de poliacrilamida porosa: Las proteínas se mueven a través del gel según su tamaño (las más pequeñas se mueven más rápidamente y las más grandes más lentamente). La presencia en el gel de una única banda indica que la proteína se encuentra completamente pura.



Proteínas de E.coli BL21

Azoreductasa pura

Inmovilización de la azoreductasa.

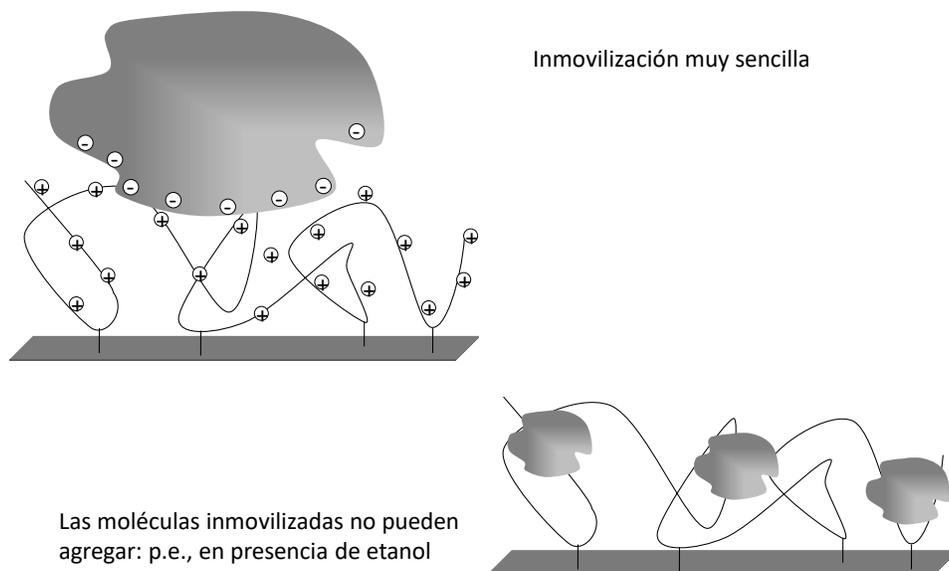
Las azoreductasas son también capaces de re-oxidar los dos productos de la reacción para producir de nuevo el azocompuesto. Esto es posible debido a que el oxígeno disuelto en el medio de reacción es capaz de oxidar lentamente el NADH a NAD⁺ y este cofactor oxidado puede ser utilizado por la enzima para revertir la reacción y formar de nuevo los azocompuestos. Por ello, es necesario separar el biocatalizador y los productos de reacción inmediatamente después de acabar la reducción.

El método más sencillo es utilizar la enzima inmovilizada sobre un soporte sólido y filtrar el medio de reacción reteniendo el biocatalizador en un filtro poroso nada más acabar la reacción.

Otras ventajas de inmovilizar la enzima sobre un soporte es que las moléculas adsorbidas están perfectamente dispersas sobre la superficie interna del soporte y ya no se pueden agregar entre ellas e inactivarse completamente, lo cual si puede hacer la enzima soluble cuando tiene que trabajar en presencia de codisolventes (pe., 50 % de etanol necesario para solubilizar los azocompuestos e incluso los productos análogos del "bodipy").

Como método de inmovilización se eligió la adsorción por intercambio iónico entre varios grupos carboxilo de cada molécula de la enzima y varios grupos amino ionizados de un soporte de agarosa recubierta de polietilimina. De este modo el entorno altamente hidrofílico que rodea cada molécula de enzima puede también protegerla de otros efectos

negativos promovidos por la presencia de etanol necesaria para solubilizar sustratos y productos.



Actividad de la azoreductasa respecto al rojo de metilo.

La mezcla de reacción contenía 2 mL de tampón TRIS 50 mM a la que se añadían 100 μ L de una disolución de rojo de metilo (1mg/mL en diglime) y 30 μ L de NADH 10 mM disuelto en agua. Se utilizó diglime para disolver el Rojo de Metilo porque es un disolvente poco tóxico con un elevado punto de ebullición y por ello la disolución de Rojo de Metilo se conserva estable y sin variar de concentración durante meses.

La reacción se realiza en una cubeta de espectrofotómetro conteniendo un sistema de agitación magnética en las cubetas y así se puede ensayar tanto la enzima soluble como los derivados inmovilizados.

La velocidad de reducción del Rojo de metilo se mide por la disminución de la absorbancia a 430 nm por minuto.

La actividad específica de la enzima pura es 500 μ moles de RM reducido / minuto/ mg de enzima.

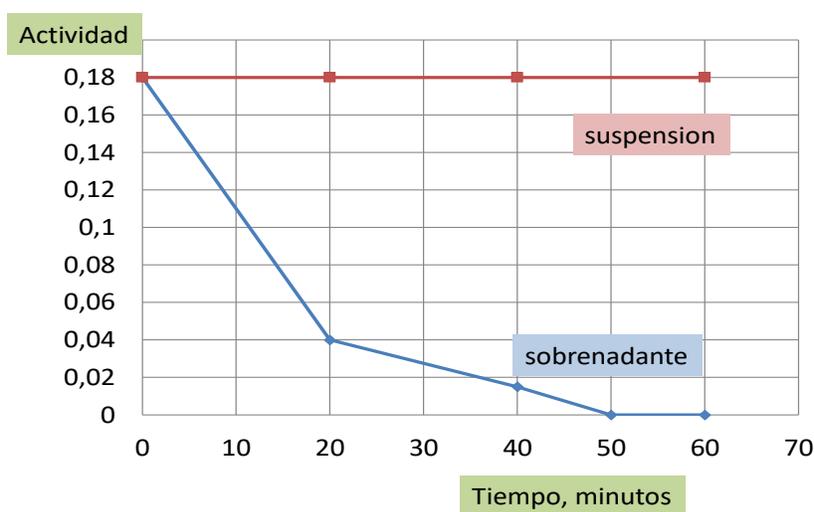
Inmovilización sobre Agarosa PEI

2 mL de azoreductasa diluida (0.5 mg/mL) se diluyen en 60 mL de tampón TRIS 25 mM pH 7. A la disolución se le añaden de 3 gramos de soporte de agarosa 6B (al 6%) completamente tapizada su superficie con polietilenimina (PEI) de 25000 Da de peso molecular. La suspensión se agita suavemente para evitar la ruptura de las partículas del soporte sólido.

Actividad inicial de la disolución (antes de añadir el soporte) era de -0.18 D.O. / min utilizando 50 μ L de la disolución enzimática.

La desaparición de la actividad del sobrenadante (la suspensión sin agitación con el soporte depositado en el fondo) indica el porcentaje de enzima que se adsorbe sobre el soporte sólido. Por otro lado, la actividad de la suspensión (se coge la muestra de la suspensión agitándose) indica el porcentaje de actividad que conserva la enzima después de su inmovilización).

En la Figura se observa que la enzima se inmoviliza completamente en menos de una hora y que la enzima inmovilizada conserva el 100% de la actividad. El derivado contiene 0.33 mg de enzima por gramo de catalizador.



Actividad en 50 % etanol

La mezcla de reacción contenía 1 mL de tampón TRIS 50 mM y 1 mL de etanol absoluto. A la mezcla se le se añadían 100 μ L con de una disolución de rojo de metilo (1mg/mL en diglime) y 30 μ L de NADH 10 mM disuelto en agua La mezcla de reacción contenía 2 mL de

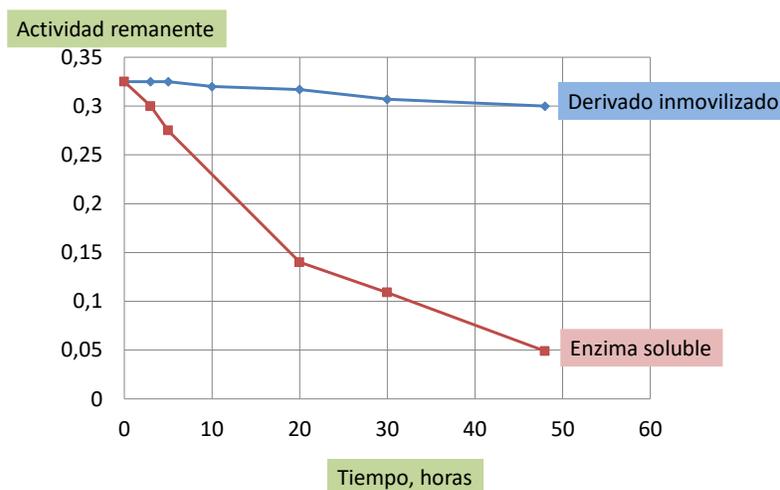
tampón TRIS 50 mM a la que se añadían 100 μL con de una disolución de rojo de metilo (1mg/mL en diglime) y 30 μL de NADH 10 mM disuelto en agua

Inmovilizada	Actividad	Porcentaje	Soluble
pH 7.0 TRIS	0,21	100	100
+50% etanol	0,041	20	3

Parece que la enzima soluble es casi 7 veces menos activa que la inmovilizada en presencia de etanol. En parte puede ser debido fenómenos de agregación, pero también parece que el etanol disminuye la actividad enzimática.

Estabilidad en 50% etanol

5 mL de la suspensión del derivado se diluyen con 5 mL de tampón o con % mL de tanol. A diferentes tiempos se retiran 200 μL de cada una de las suspensiones y se ensayan en ausencia de etanol. De nuevo los derivados inmovilizados son más resistentes al efecto desestabilizante del etanol



Reducción de Azocompuestos en 50 % de etanol.

La mezcla de reacción contenía 1 mL de tampón TRIS 50 mM y 1 mL de etanol a la que se añadían 25 μL con de una disolución de cada azocompuesto (1mg/mL en diglime) y 30 μL de NADH 10 mM disuelto en agua. Se utilizó etanol porque es necesario para solubilizar incluso bajas concentraciones de los azocompuestos preparados en esta Tesis. Se utilizó diglime para disolver los azocompuestos porque es un disolvente poco tóxico con un elevado

punto de ebullición y por ello la disolución de todos los azocompuestos se mantiene estable y sin variar de concentración durante meses.

La reacción se realiza en una cubeta de espectrofotómetro conteniendo un sistema de agitación de las cubetas.

ENSAYOS CELULARES

CULTIVOS CELULARES.

La línea celular HeLa se cultivó en medio de cultivo DMEM, suplementado con 10% de SFB y 1% de Penicilina-Estreptomicina para evitar contaminación bacteriana. Este medio de cultivo será referido como DMEM completo. Los cultivos se mantuvieron en un incubador Midi 40 (*Thermo Scientific*®) a 37°C de temperatura, con una concentración de CO₂ del 5% y una humedad relativa del 95%. El desarrollo del cultivo se verificó observando el cambio de color del medio, como indicativo de la ocurrencia de procesos metabólicos y revisando los cultivos en un microscopio invertido (*Olympus CK30*).

- Tripsina-EDTA 0,05% y 0,025% (*Thermo Fisher Scientific*®), para el mantenimiento del cultivo celular.
- Frascos de 25 cm² (F25) y placas multipocillo P24 para el cultivo de células (*Thermo Fisher Scientific*®).
- Placas multipocillo P6 (*Thermo Fisher Scientific*®) para los ensayos de microscopía. Los cultivos se realizaron sobre cubreobjetos (*MenzelGläser*®).
- Tubos de centrifugación de 15 y 50 ml (*Thermo Fisher Scientific*®).
- Tubos *Eppendorf* 2 ml (*Eppendorf Tubes*®).

Otros reactivos

- Dimetilsulfóxido (DMSO) (*Panreac*®).
- Tampón fosfato salino (PBS) (*Thermo Fisher Scientific*®).
- Para la realización de la estimación de la viabilidad celular se usó bromuro de 3(-4,5-dimetil-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (*Sigma-Aldrich*®).

TRATAMIENTO FOTODINÁMICO.

Para el tratamiento fotodinámico se sembraron las células resuspendidas en DMEM completo en placas multipocillos P24. Posteriormente, se mantuvieron en el incubador 48

horas hasta que las células alcanzaron una confluencia del 50-70%. Tras esto, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se administraron las diferentes concentraciones de los distintos compuestos (foto sensibilizador) a analizar, diluidas en DMEM completo. A continuación, las células fueron irradiadas con luz de una determinada longitud de onda a tiempos variables, tras lo cual se retiró el PS y se sustituyó por DMEM completo. Hasta su procesamiento 24 horas más tarde, el cultivo se mantuvo en el incubador y en oscuridad.

El ensayo colorimétrico del MTT se fundamenta en la capacidad que tienen las enzimas deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas de reducir el MTT (sales de tetrazolio hidrosoluble de color amarillo claro) en cristales de formazán (precipitado liposoluble de color violeta). Una vez hecho esto, las células se mantuvieron en el incubador de 2 a 3 horas. A continuación, se retiró el medio y se añadió DMSO para disolver los cristales de formazán, cuya presencia, al ser un compuesto coloreado, se determinó mediante medición de la absorbancia a una longitud de onda de 542 nm en un espectrofotómetro Synergy HT (*BioTek*®). La densidad óptica que se obtiene en el volumen de DMSO utilizado para lisar las células está en relación directa con el número total de células que redujeron el MTT a formazán y por tanto esto permite estimar el número de células que estaban vivas, obteniéndose los datos de viabilidad celular. Las medidas de absorción resultantes de los controles totales se tomaron como el 100% de viabilidad celular, y a partir de ellas se estimaron los porcentajes de viabilidad para el resto de condiciones.

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR.

En placas multipocillos P6, se colocó en cada pocillo un cubreobjetos, y a continuación se sembraron células HeLa. Se mantuvieron en el incubador durante 48 horas hasta alcanzar una confluencia celular de entre 50-70%. Tras este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se administraron dos concentraciones de los compuestos a estudiar (a distintas concentraciones). Tras 2 horas de incubación, se eliminó el medio de cultivo y se procedió al lavado con PBS, manteniendo las células en PBS para su posterior análisis en el microscopio de fluorescencia (OLYMPUS BX-61 con cámara CCD DP70 (*Olympus*®, *Japón*) acoplada) para analizar la localización subcelular de los compuestos estudiados.

FUENTES DE IRRADIACIÓN.

En los TFs, las placas de células tratadas con los compuestos deseados, fueron iluminadas con luz verde ($\lambda = 535 \text{ nm}$) a diferentes tiempos (1, 3, 5 y 10 minutos) en un irradiador LED (UAM SEGAINVEX. $\lambda = 535 \text{ nm}$ (verde) (Figura n)).

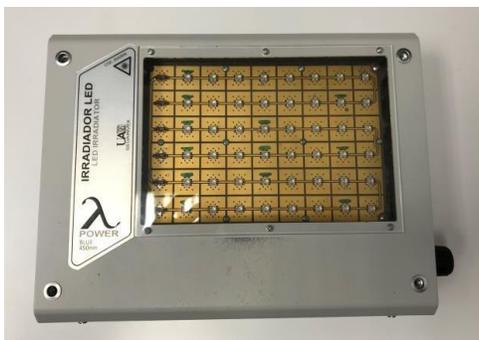


Figura n. Irradiador LED (UAM-SEGAINVEX). Constituido por una matriz rectangular de diodos emisores de luz verde (LEDs) de una $\lambda = 535 \text{ nm}$.

Capítulo 4

Resumen y Conclusiones.

4. RESUMEN Y CONCLUSIONES

La demanda creciente de compuestos orgánicos que posean una aplicación concreta, implica una apuesta hacia el diseño y desarrollo de metodologías de síntesis cada vez más generales y selectivas que permitan modificar la estructura orgánica, de forma eficaz que permita a su vez modular sus propiedades físicas y químicas, para a su vez adaptarlas a la aplicación buscada. El desarrollo de estas nuevas metodologías sintéticas es por tanto un objetivo prioritario en un campo de la química orgánica y de la química en general.

La presente tesis doctoral ha abordado este objetivo prioritario, a través del desarrollo de metodologías de síntesis, cuyo hilo conductor es la preparación de azocompuestos para su aplicación como interruptores moleculares quirales y como inhibidores de la fluorescencia, sensores de medios reductores biológicos.

Este manuscrito consta de una introducción general, seguida de dos capítulos principales. Cada capítulo posee una introducción más específica, que describe los aspectos generales de los procesos estudiados y recoge los antecedentes bibliográficos más relevantes seguido de los objetivos concretos del capítulo. A continuación, se abordan la discusión de los resultados experimentales y la parte experimental donde se detalla la preparación y caracterización de los compuestos nuevos obtenidos.

En concreto, los dos capítulos comprenden:

Capítulo 2: Preparación de azocompuestos con un fragmento quiral enantiopuro de sulfíniferroceno. Estudio de sus propiedades fotofísicas y del proceso de fotoisomerización E/Z.

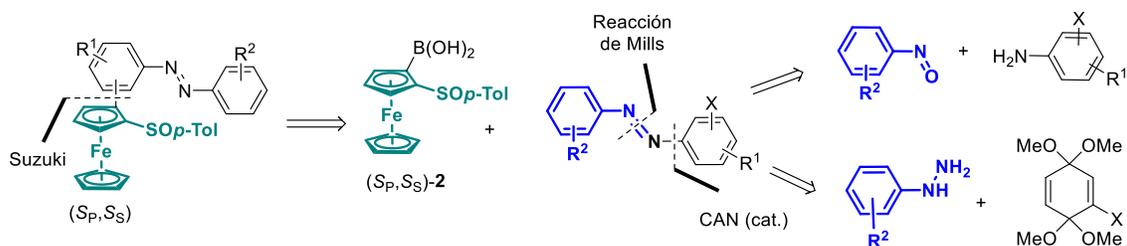
Los azobencenos son una familia de cromóforos orgánicos, conocidos industrialmente por su empleo como colorantes. Además, las propiedades fotocromáticas de estos compuestos les ha situado como uno de los mejores fotointerruptores moleculares orgánicos, generando un movimiento molecular reversible, gracias a la interconversión entre sus dos isómeros E/Z, por medio de la luz. Cuando los azobencenos poseen en su estructura grupos que poseen quiralidad este movimiento puede realizarse de forma estereocontrolada, dando lugar a fotointerruptores moleculares quirales. Los ferrocenos 1,2-disustituídos con quiralidad planar son estructuras de bien conocidas en la química orgánica actual, especialmente en catálisis quiral, debido a su amplio uso como ligandos o catalizadores en

síntesis asimétrica. Aunque en la bibliografía se encuentra descrita la síntesis de 2- y 3-ferrocenilazobencenos y la influencia de este grupo sobre las propiedades fotocromáticas de los azocompuestos, estos ferrocenilazobencenos no presentaban ningún tipo de quiralidad. En el año 2004, nuestro grupo de investigación desarrolló un método de síntesis de azobencenos en condiciones muy suaves de reacción, que permitió la preparación de sulfinil azocompuestos enantiopuros. Asimismo, se estudió por primera vez la influencia que ejercía el grupo *p*-tolilsulfinilo enantiopuro sobre el proceso de fotoisomerización del azocompuesto, dando como resultado un nuevo tipo de interruptores moleculares quirales. En todos los casos se comprobó que se producía una transferencia de la quiralidad central del sulfóxido al fragmento de azobenceno.

Continuado esta línea de investigación, en este capítulo hemos abordado un nuevo tipo de interruptores moleculares quirales, no explorados hasta el momento, basados en un fragmento de sulfinilferroceno enantiopuro anclado a un azocompuesto.

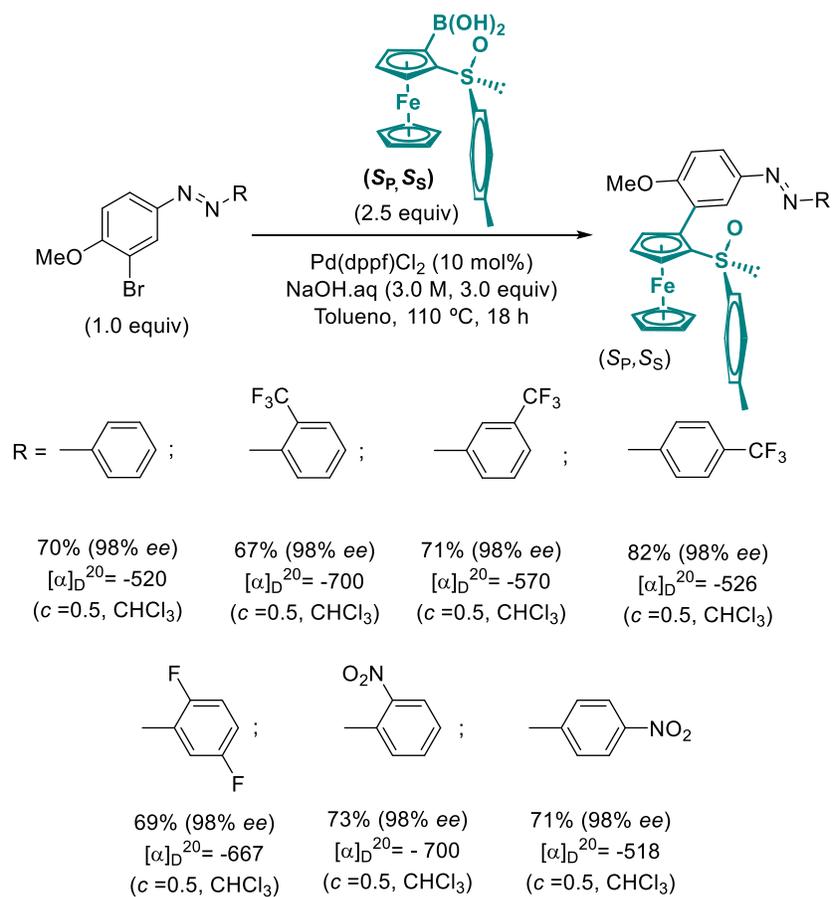
En concreto se ha desarrollado una metodología de síntesis de azobencenos 2 y 3-*p*-tolilsulfinilferrocenil sustituidos con quiralidad planar (ferroceno) y central (sulfóxido), y los *p*-toliltioferrocenil azobencenos que únicamente presentan quiralidad planar. Con esta familia de azocompuestos e ha evaluado por primera vez la influencia de la quiralidad central y planar de sulfinilferrocenilos en el proceso de fotoisomerización E/Z de azocompuestos.

La síntesis de los azocompuestos se ha logrado empleando como etapa clave de la síntesis la reacción de acoplamiento de Suzuki entre el ácido ferrocenil borónico enantiopuro y diferentes azobencenos que contuvieran un halógeno en su estructura. La síntesis de azobencenos con sustituyentes halogenados se prepararon mediante dos rutas sintéticas: a) la reacción de Mills, entre halo anilinas y nitrosoderivados aromáticos y b) la reacción entre bisacetales de quinona y arilhidracinas. Las estrategias sintéticas desarrolladas en esta parte de la tesis doctoral han permitido obtener los azocompuestos deseados con buenos rendimientos y enantioselectividades, siendo una alternativa sintética versátil y complementaria a la desarrollada hasta el momento para los ferrocenil azobencenos descritos en la bibliografía.

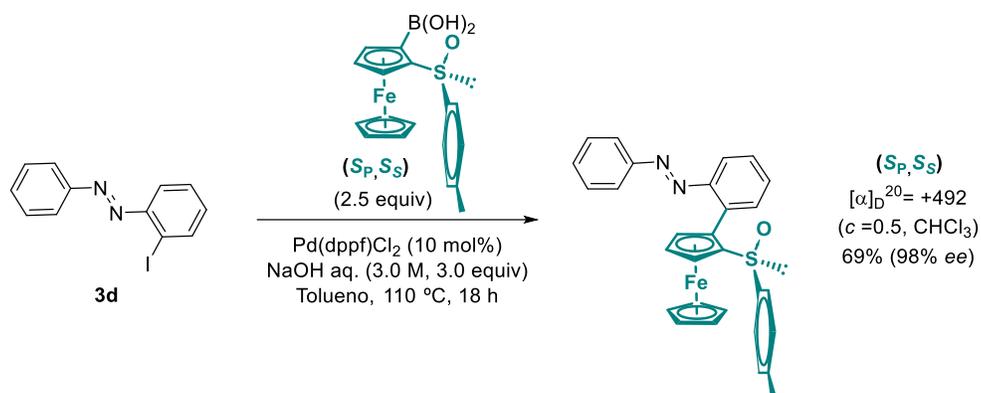


Esquema 4. 1

Se han preparado dos tipos de sulfonilferrocenil azocompuestos 3- y 2-sustituidos que se detallan en los siguientes Esquemas:



Esquema 4. 2



Esquema 4. 3

Para el caso de los 3-sulfinilferrocenilazobencenos, se comprobó que la reacción daba lugar a una mezcla de dos isómeros en proporciones 90/10, cuya estructura pudo ser establecida mediante un estudio detallado de sus parámetros de RMN-¹H, incluyendo experimentos de NOESY, y adicionalmente corroborada mediante la difracción de rayos X del isómero mayoritario del *orto*-nitrofenil sustituido

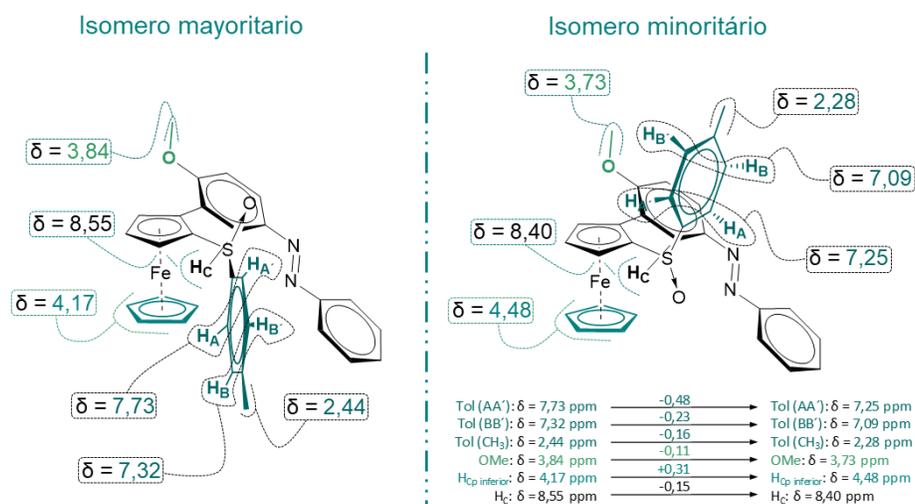


Figura 4. 1

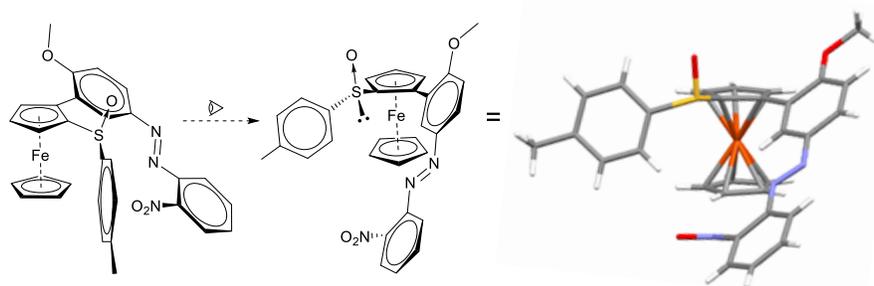


Figura 4. 2

Se pudo establecer que la diferencia fundamental entre estos dos isómeros era la disposición del *p*-tolilsulfóxido entorno al enlace arilo-ferroceno. El sulfóxido se dispone en una conformación fija mayoritaria situando el grupo *p*-tolilo anti con respecto al otro anillo de ciclopentadienilo del ferroceno. Las restricciones entorno a este enlace azufre-ferroceno observadas pueden ser consecuencia del entorno esteroelectrónico que rodea al grupo sulfinilo, especialmente del grupo metoxi en *orto* con respecto al ferroceno.

Finalmente, se ha realizado un estudio detallado de sus propiedades fotocromáticas, incluyendo el proceso de fotoisomerización, empleando como fuente de irradiación LEDs de longitudes de onda de: 365 nm, 460nm y 530 nm. Todas las propiedades se han monitorizado mediante espectroscopia de UV/Vis y DC. Salvo en el caso de los compuestos que poseen un grupo nitro, en todos los casos se produce la fotoisomerización reversible de los azobencenos entre el isómero E al Z. De todos los compuestos obtenidos, los azocompuestos que poseen un resto 2,5-difluorurado y el 2-trifluorometilo son los que mejores transferencias de quiralidad presentan, tanto en el caso de poseer la quiralidad central y planar (*p*-tolilsulfinilferrocenil derivados), como en el caso del *p*-tolilitioferrocenil azocompuesto que sólo posee únicamente la quiralidad planar.

Capítulo 3: Preparación de azocompuestos derivados de BODIPY. Estudio de sus propiedades fotofísicas y evaluación de los azoderivados como inhibidores de la fluorescencia. Estudio de la ruptura reductora del enlace azo química y enzimáticamente. Estudio de las propiedades fotofísicas y evaluación de su comportamiento en cultivos celulares.

La hipoxia es una condición asociada a niveles bajos de oxígeno en tejidos biológicos o células, que lleva implícita la sobreexpresión de enzimas reductoras. La hipoxia está asociada a procesos inflamatorios, a tejidos isquémicos o a células cancerígenas de tumores sólidos. El diseño de sensores para la detección de hipoxia en tejidos representa una

herramienta tremendamente valiosa para el diagnóstico de este tipo de lesiones celulares. En la bibliografía se encuentran recogidos varios ejemplos de azocompuestos como sensores orgánicos de medios reductores, especialmente de hipoxia, que se fundamentan en dos características principales de los azocompuestos:

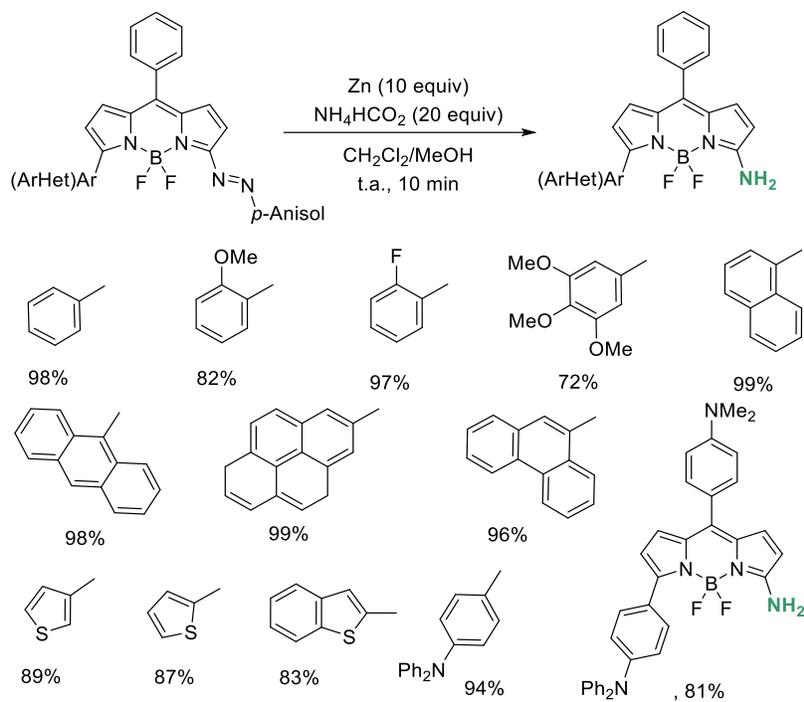
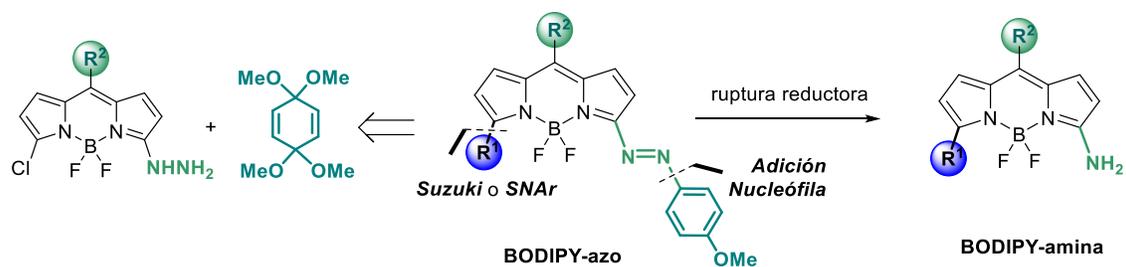
A) Los azobencenos son capaces de inhibir la fluorescencia de fluoróforos orgánicos que se encuentran cercanos a ellos, a través de procesos de transferencia de energía, que a su vez el azobenceno emplea en emisiones no radiativas, asociadas al proceso de fotoisomerización *cis/trans* del doble enlace N=N.

B) En un medio reductor los azobencenos pueden sufrir una ruptura reductora del doble enlace N=N; que provoca la ruptura del enlace N=N, liberándose dos aminas.

Los sensores de hipoxia basados en azocompuestos que se emplean en bioimagen, idealmente no emiten en tejido con un nivel normal de oxígeno (normoxia), mientras que, en hipoxia, los bajos niveles de oxígeno y el aumento de las azoreductasas favorece la ruptura del enlace N=N, recuperándose la fluorescencia, y permitiendo visualizar mediante fluorescencia el tejido dañado.

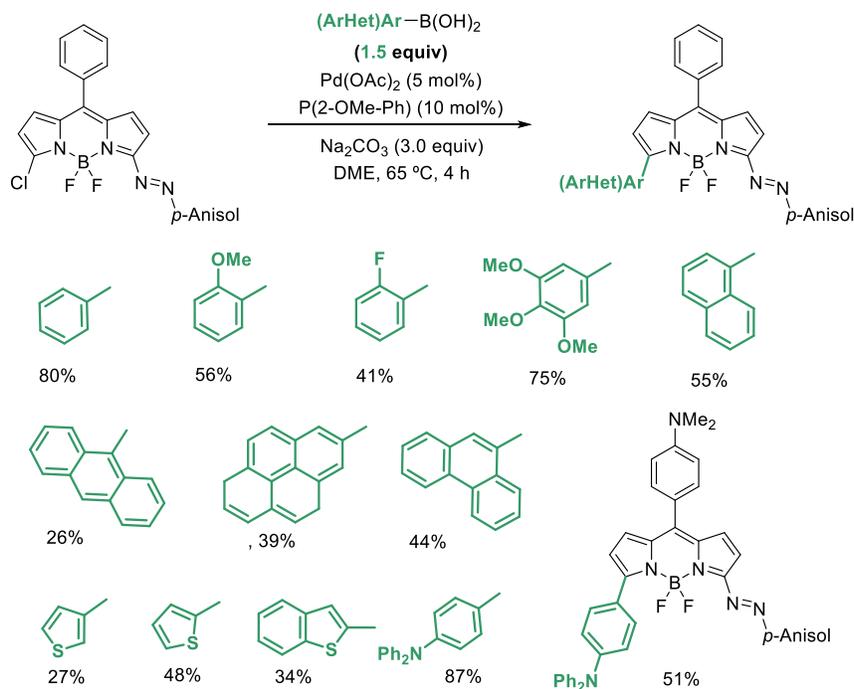
En este capítulo de la tesis doctoral se ha abordado la preparación de una nueva familia de azocompuestos, como potenciales sensores de medios reductores. Junto con el estudio metodológico de síntesis, se ha realizado un estudio detallado de las propiedades fotofísicas y electroquímicas, y se han realizado estudios preliminares biológicos.

La familia de azocompuestos inhibidores de la fluorescencia constan en su esqueleto de un fragmento de BODIPY unido a través de la posición alfa a un azocompuesto. La etapa clave para la formación de los BODIPY-azocompuestos se ha fundamentado en la reacción de adición entre BODIPY-hidracinas y bisacetales de *p*-benzoquinona catalizada por nitrato cérico amónico, obteniéndose los BODIPY-azos con buenos rendimientos.



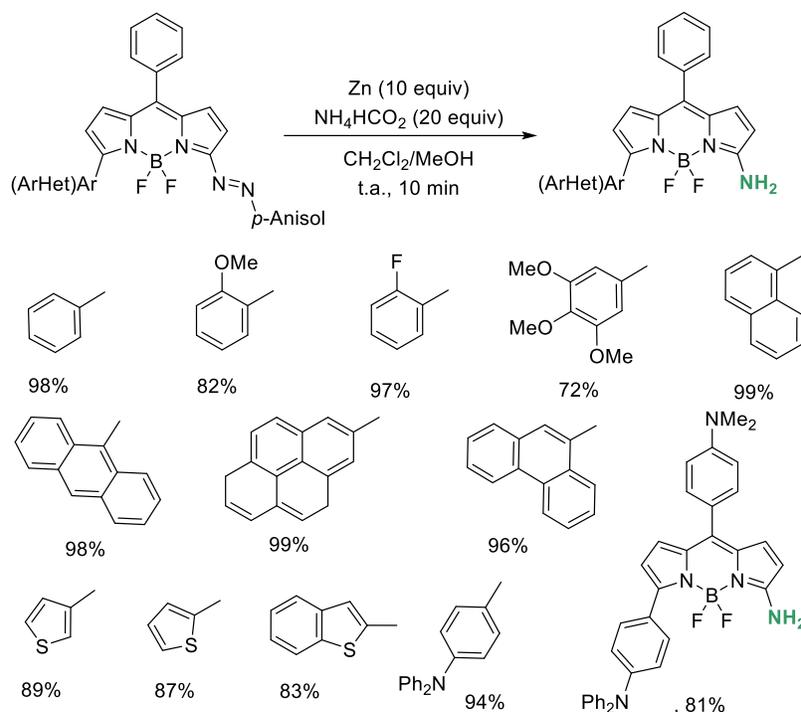
Esquema 4. 4

La ruta de síntesis además permitió modificar la estructura final del BODIPY-azo mediante transformaciones sintéticas sencillas, que implicaban reacciones de acoplamiento de Suzuki, o reacciones de sustitución nucleofila.



Esquema 4. 5

Se pudo comprobar que todos los BODIPY-azo derivados obtenidos inhibían la fluorescencia inherente del fragmento de BODIPY. Asimismo, se comprobó que, tras la reducción química, los BODIPY-azo dieron lugar a las BODIPY-aminas correspondientes, con muy buenos rendimientos, recuperándose la fluorescencia del sistema de BODIPY.



Esquema 4. 6

Por otro lado, también se ha realizado un estudio de la reducción enzimática, realizada en colaboración con el grupo de J. Manuel Guisán Seijas del Dpto de Biocatálisis, del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC-UAM, del que se concluyó que este tipo de BODIPY-azo compuestos pueden romperse en presencia de una azoreductasa bacteriana humana, si bien los resultados parecían indicar que esta reducción es dependiente del tiempo.

Del estudio de sus propiedades fotofísicas, se han extraído las siguientes conclusiones: el análisis de los espectros de UV-vis puso de manifiesto que el máximo de absorción de los BODIPY-azo derivados aparecen desde 600 nm hasta 679 nm, variando sensiblemente en función de la sustitución presente en la posición C-5 del BODIPY y en algunos casos como una banda muy ancha, desde.

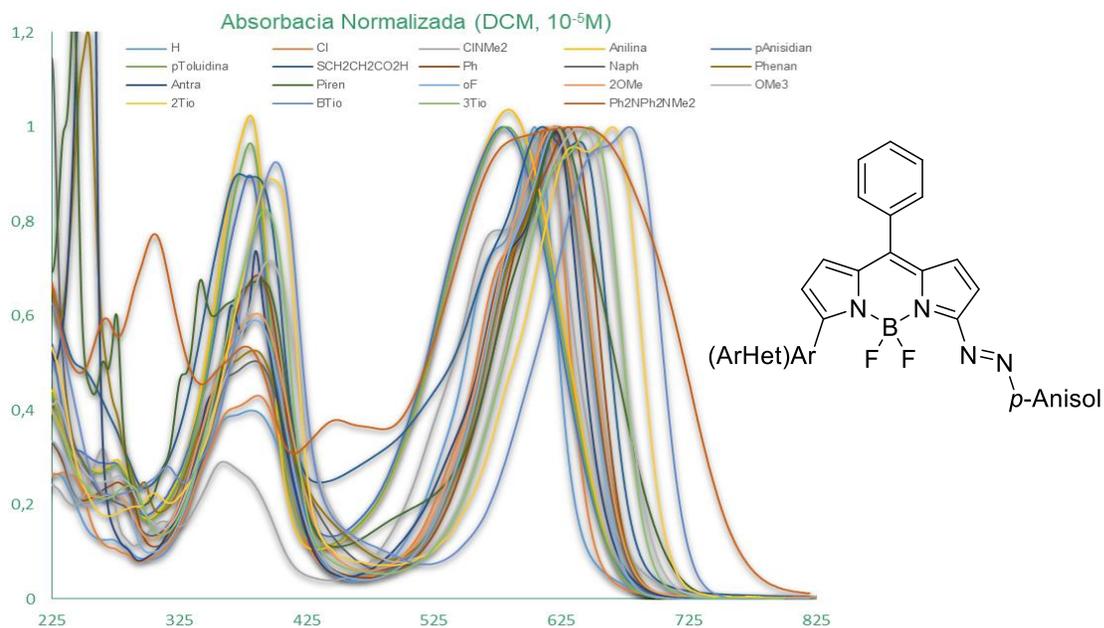
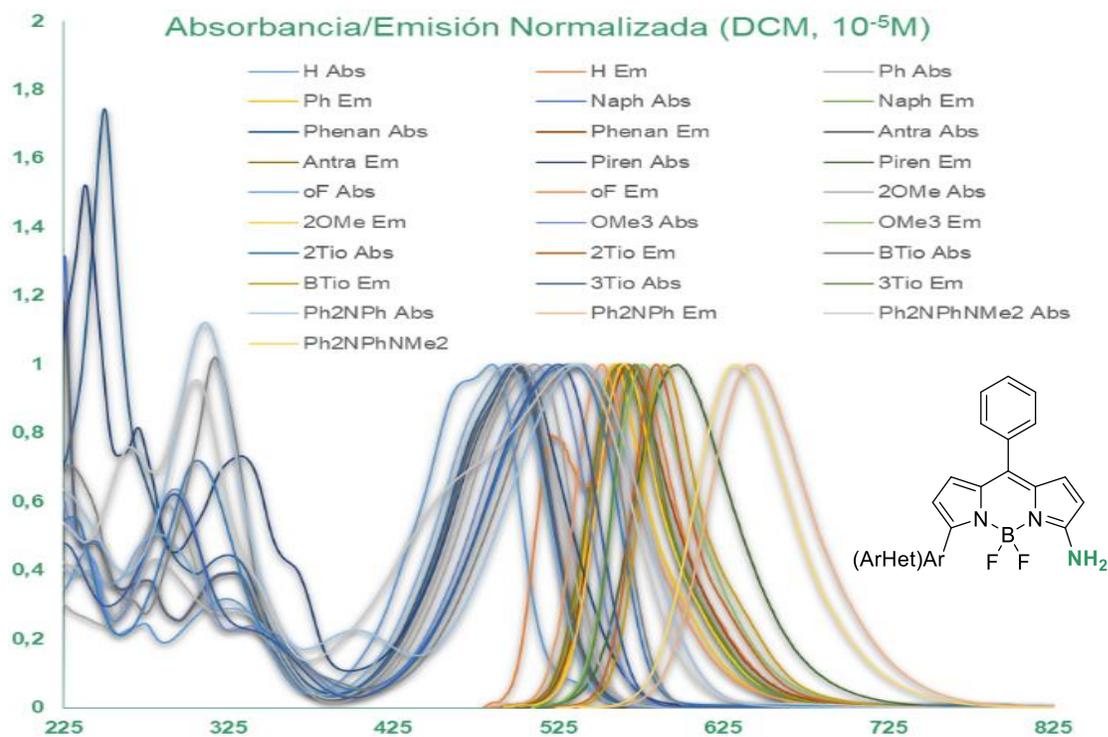


Figura 4. 3

Por otro lado, todos los BODIPY-amina obtenidos, presentaron un máximo de absorción en torno a 487-538nm, en todos los casos se recuperó la fluorescencia esperada del BODIPY-amina, emitiendo en el intervalo de 560-633 nm. Además, se comprobó que eran capaces de generar especies de oxígeno singlete bajo irradiación con luz verde.



Finalmente, en colaboración con el Prof. Francisco Sanz del Departamento de Biología Celular de la UAM, se ha evaluado la toxicidad de los BODIPY-azo y BODIPY-aminas en cultivos celulares de tipo HeLa. De estos estudios se puede concluir que de forma general los BODIPY-azo estudiados no son compuestos tóxicos ni en oscuridad ni bajo la irradiación con luz verde. Los compuestos de BODIPY-amina evaluados tampoco resultaron tóxicos en oscuridad. Sin embargo, de los ensayos de viabilidad celular bajo irradiación se pudo concluir que la acción fotosensibilizadora del BODIPY-NH₂ es completamente diferente al BODIPY-AZO, ya que la irradiación con luz verde, conduce a la muerte celular tras 5 min de irradiación. Esta acción fotosensibilizadora del BODIPY-NH₂ resulta ser muy interesante para su futura aplicación como PS en terapia fotodinámica, especialmente atractivo para el caso de tratamiento de células con hipoxia, ya que se podría formar de forma selectiva por tratamiento de su correspondiente BODIPY-AZO derivado, que en caso de ruptura reductora generaría el PS deseado (BODIPY-NH₂) para el tratamiento. Estos resultados nos permiten concluir el BODIPY-NH₂ parece reunir las características apropiadas para su aplicación en PDT. Los estudios de localización realizados en el microscopio de fluorescencia indicaron que las BODIPY-aminas aparecen como una señal roja a modo de punteado citoplásmico, semejantes a vesículas del sistema de endomembrana.

