



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Estudio de las propiedades fotoluminiscentes de compuestos derivados de hidrazona y de su potencial aplicación en el tratamiento del cáncer.

Estudo das propiedades fotoluminiscentes de compostos derivados de hidrazonas e da súa potencial aplicación no tratamento do cancro.

Study on the photoluminescent properties of hydrazone-derived compounds and their potential application in cancer treatment.

Jacobo Boga Barbeito

Curso: 2020 - 2021.

Convocatoria: Septiembre

*Directores: Fernando Francisco Avecilla Porto
Manuel Sánchez Andújar*

ABREVIATURAS.

ACQ: Aggregation-Caused Quenching

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AIE: Aggregation-Induced Emission

AINE: Antiinflamatorios no esteroideos

Ar: Aromático

ATR: Attenuated Total Reflection

Benz: Benceno

COSY: Correlated Spectroscopy

DFT: Density Functional Theory

DMSO: Dimetilsulfóxido

DRX: Difracción de Rayos-X

ESI: Electrospray Ionization

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HPS: Hexaphenylsilole (Hexafenilsilol)

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation

I%: Porcentaje de intensidad

ICT: Intramolecular Charge Transfer

IR: Infrarrojo

LC-Q-q-TOF: Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight

LUMO: Lowest Unoccupied Molecular Orbital

m/z: Relación masa/carga

MeOH: Metanol

MS: Mass Spectrometry

Naft: Naftaleno

NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

OLEDs: Organic Light-Emitting Diodes

ORTEP: Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot

PBS: Phosphate Buffered Saline (Tampón fosfato salino)

ppm: Partes por millón

PTFE: Politetrafluoroetileno

Py: Piridina

Redox: Reducción-oxidación

RIR: Restricted Intramolecular Rotation

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

TD-DFT: Time-Dependent Density Functional Theory

UV-Vis: Ultravioleta-visible

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Química bioinorgánica y sus aplicaciones.....	5
1.2. Actividades biológicas de hidrazidas e hidrazonas.....	6
1.2.1. Propiedades antibacteriales.....	6
1.2.2. Propiedades antiinflamatorias.....	7
1.2.3. Propiedades antitumorales.....	8
1.3. Complejos metálicos de hidrazona como agentes anticancerígenos.....	9
1.4. Conceptos generales de fotoluminiscencia molecular.....	12
1.4.1. Espectro de emisión y excitación de UV-Vis.....	15
1.4.2. Factores que afecta a la fluorescencia.....	15
1.5. Fluorescencia de compuestos en estado sólido. Efecto ACQ y AIE.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
3.1. Síntesis.....	20
3.1.1. Compuesto H1.....	20
3.1.2. Compuestos H2, AL2 y AR8.....	21
3.2. Caracterización estructural.....	21
3.2.1. Análisis elemental.....	21
3.2.2. Espectrometría de masas.....	22
3.2.3. Espectroscopia infrarroja.....	22
3.2.4. Espectroscopia RMN ¹ H y RMN ¹³ C.....	22
3.2.5. Difracción de rayos X.....	22
3.3. Espectroscopia de absorción y emisión UV-Vis.....	22
3.3.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.....	22
3.3.2. Determinación de los <i>gaps</i> energéticos.....	23
3.3.3. Espectroscopia de fluorescencia UV-Vis.....	25
3.4. Estudios de interacción con el ADN.....	25

3.4.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.	25
3.4.2. Espectroscopia de fluorescencia UV-Vis.....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. Caracterización estructural.....	29
4.1.1. Compuesto H1.....	30
4.1.2. Compuesto H2.....	31
4.1.3. Compuesto AL2.....	32
4.1.4. Compuesto AR8.....	34
4.2. Espectroscopia de absorción y emisión UV-Vis.....	36
4.2.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.....	36
4.2.1.1. Compuestos en disolución.....	36
4.2.1.2. Compuestos en estado sólido.....	38
4.2.1.3. Determinación de los <i>gaps</i> energéticos.....	40
4.2.2. Espectroscopia de fluorescencia UV-Vis.....	41
4.2.2.1. Compuestos en disolución.....	41
4.2.2.2. Compuestos en estado sólido.....	46
4.3. Estudios de interacción con el ADN.....	49
4.3.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.....	49
4.3.2. Espectroscopia de fluorescencia UV-Vis.....	51
5. CONCLUSIONES.....	54
6. BIBLIOGRAFÍA.....	57
7. ANEXOS.....	I
7.1. Caracterización estructural del compuesto H1.....	I
7.2. Caracterización estructural del compuesto H2.....	VIII
7.3. Caracterización estructural del compuesto AL2.....	XVI
7.4. Caracterización estructural del compuesto AR8.....	XXIV
7.5. Difracción de rayos X de monocristal.....	XXXII
7.6. Cromaticidad.....	XXXVI

RESUMEN.

Las hidrazonas y sus derivados constituyen un grupo versátil de compuestos conocidos en química médica por su amplia variedad de actividades biológicas, como antioxidante, antibacterial, antiviral, antiinflamatoria o anticancerígena, y por su capacidad de actuar como agentes quelantes en la formación de complejos metálicos.

Este trabajo recoge la síntesis, caracterización y estudio de las propiedades ópticas, fotoluminiscentes y de interacción con el ADN de cuatro compuestos hidrazida-hidrazona (H1, H2, AL2 y AR8). Los compuestos se obtienen por condensación de hidrazidas aromáticas con hidrocloreuro de piridoxal y su caracterización estructural se realiza mediante las técnicas de espectroscopia IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C , RMN bidimensional, análisis elemental, espectrometría de masas y difracción de rayos X de monocristal. Los espectros de absorción UV-Vis y emisión fluorescente muestran importantes diferencias entre las especies en disolución y las moléculas agregadas en estado sólido, consecuencia de interacciones π - π en la fase cristalina. Se detecta, además, una interesante dependencia del perfil de fluorescencia con la longitud de onda de excitación, indicativo de la posible formación de excímeros en disolución.

Finalmente, la interacción del compuesto AR8 con ADN de timo de ternera (ctADN) se investiga bajo condiciones fisiológicas simuladas (pH 7.4) por espectroscopia UV-Vis y espectroscopia de fluorescencia. Se puede concluir que el compuesto interacciona con el ADN vía unión a los surcos, con constantes de unión del orden de 10^4 M^{-1} . Para un conocimiento más detallado del proceso, se determina la energía libre de Gibbs y la constante de "quenching" Stern-Volmer.

Palabras clave: Química biológica, hidrazida-hidrazona, cáncer, interacción con ADN, absorción UV-Vis, fluoróforo, excímero.

RESUMO.

As hidrazonas e os seus derivados constitúen un grupo versátil de compostos coñecidos en química médica pola súa ampla variedade de actividades biolóxicas, como antioxidante, antibacterial, antiviral, antiinflamatoria ou anticanceríxena, e pola súa capacidade de actuar como axentes quelantes na formación de complexos metálicos.

Este traballo recolle a síntese, caracterización e estudo das propiedades ópticas, fotoluminiscentes e de interacción co ADN de catro compostos hidrazida-hidrazona (H1, H2, AL2 e AR8). Os compostos obtéñense por condensación de hidrazidas aromáticas con hidrocloreuro de piridoxal e a súa caracterización estrutural realízase mediante as técnicas de espectroscopia IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C , RMN bidimensional, análise elemental, espectrometría de masas e difracción de raios X de monocristal. Os espectros de absorción UV-Vis e emisión fluorescente mostran importantes diferenzas entre as especies en disolución e a moléculas agregadas en estado sólido, consecuencia de interaccións π - π na fase cristalina. Detéctase, ademais, unha interesante dependencia do perfil de fluorescencia coa lonxitude de onda de excitación, indicativo da posible formación de excímeros en disolución.

Finalmente, a interacción do composto AR8 con ADN de timo de tenreira (ctADN) invéstigase baixo condicións fisiolóxicas simuladas (pH 7.4) por espectroscopia UV-Vis e espectroscopia de fluorescencia. Pódese concluír que o composto interacciona co ADN vía unión aos surcos, con constantes de unión da orde de 10^4 M^{-1} . Para un coñecemento máis detallado do proceso, determínase a enerxía libre de Gibbs e a constante de “quenching” Stern-Volmer.

Palabras clave: Química biolóxica, hidrazida-hidrazona, cancro, interacción con ADN, absorción UV-Vis, fluoróforo, excímero.

ABSTRACT.

Hydrazones and their derivatives constitute a versatile group of compounds known in medicinal chemistry for their wide variety of biological activities, such as antioxidant, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory or anticancer, and for their ability to act as chelating agents in the formation of metal complexes.

This work reports the synthesis, characterization and study of the optical, photoluminescent and DNA interaction properties of four hydrazone-hydrazone compounds (H1, H2, AL2 and AR8). The compounds are obtained by condensation of aromatic hydrazides with pyridoxal hydrochloride and their structural characterization is performed by IR spectroscopy, ^1H NMR, ^{13}C NMR, two-dimensional NMR, elemental analysis, mass spectrometry and single crystal X-ray diffraction. UV-Vis absorption and fluorescence emission spectra show important differences between species in solution and molecules aggregated in the solid state, a consequence of π - π stacking interactions in the crystal phase. An interesting dependence of the fluorescence profile on the excitation wavelength is also detected, indicative of the possible formation of excimers in solution.

Finally, the interaction of compound AR8 with calf thymus DNA (ctDNA) is investigated under simulated physiological conditions (pH 7.4) by UV-Vis spectroscopy and fluorescence spectroscopy. It can be concluded that the compound interacts with DNA via groove binding, with binding constants of the order of 10^4 M^{-1} . For a more detailed understanding of the process, Gibb's free energy and Stern-Volmer quenching constant are determined.

Keywords: Biological chemistry, hydrazone-hydrazone, cancer, DNA interaction, UV-Vis absorption, fluorophore, excimer.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Química bioinorgánica y sus aplicaciones.

La importancia de los compuestos inorgánicos en las funciones bioquímicas y fisiológicas de los seres vivos, tanto en el crecimiento como metabolismo, ha estado presente en la comunidad científica desde la década de 1930. Sin embargo, no es hasta finales del siglo pasado, con el desarrollo de técnicas y metodologías adecuadas que permiten la detección y estudio de estos elementos en los organismos vivos, que surge la denominada química bioinorgánica. Esta nueva área de investigación situada en la frontera entre la química inorgánica y la biología puede definirse como “la ciencia que trata del estudio de la reactividad química de los elementos y compuestos inorgánicos en los sistemas biológicos”.¹

Actualmente se conocen al menos 20 elementos inorgánicos con un papel fundamental en los seres vivos, estando la mayoría de ellos presentes en cantidades traza y ultratraza y realizando funciones de diversa complejidad tales como transferencia de electrones y grupos funcionales, participación estructural en proteínas y centros catalíticos de enzimas, fijación de biomoléculas o el mantenimiento de membranas y paredes celulares. En el caso concreto de los metales de transición, estos son transportados y/o almacenados por los organismos vivos con el fin de asegurar concentraciones que permitan su participación en procesos biológicos fundamentales, además de evitar patologías derivadas de un exceso o defecto de los mismos.² Estos metales se encuentran siempre en forma iónica, cambiando sus estados de oxidación y entorno de coordinación de acuerdo con las necesidades biológicas.

Los descubrimientos de la química bioinorgánica durante las últimas décadas han supuesto un gran impacto en la medicina clínica por medio de la introducción de compuestos artificiales en los sistemas vivos a modo de sondas, agentes de contraste o fármacos. Estos avances han permitido, no solo el desarrollo de nuevos agentes médicos imposibles de conseguir a partir de compuestos puramente orgánicos, sino una mejor comprensión de los mecanismos biológicos de ciertas enfermedades.³

De acuerdo con esto, se entiende que la química bioinorgánica tiene como objetivos principales, (i) el estudio de las propiedades, entornos de coordinación y mecanismos de reacción de los metales implicados en funciones celulares, (ii) el diseño de fármacos inorgánicos para curar o prevenir enfermedades y (iii) la introducción o extracción de ciertos compuestos en los sistemas biológicos. Los temas abarcados por la

bioinorgánica son de enorme importancia en muchas otras ramas de la ciencia como la bioquímica, la medicina, la farmacología o la agricultura.¹

1.2. Actividades biológicas de hidrazidas e hidrazonas.

Las hidrazonas constituyen un grupo de compuestos orgánicos con estructura básica $R_1R_2C=N-NR_3R_4$ considerados de gran importancia biológica. Ambos átomos de nitrógeno tienen una naturaleza nucleofílica, siendo el nitrógeno amino el más reactivo, mientras que el átomo de carbono muestra carácter tanto nucleófilo como electrófilo.⁴ Esta flexibilidad de reacción de sus centros activos hace que las hidrazonas sean ampliamente utilizadas como base para la síntesis de un gran número de compuestos.

La principal ruta para la síntesis de hidrazonas y derivados consiste en el calentamiento de hidrazidas debidamente sustituidas con diferentes aldehídos y cetonas en disolventes orgánicos tales como etanol, metanol o butanol.⁵ Recientemente, los compuestos hidrazida-hidrazona ($R_1CO-NH-N=CR_2R_3$) han atraído la atención de campos como la biotecnología médica debido a que contiene el grupo azometino (o base de Schiff) conectado a un grupo carbonilo, lo que les confiere una gran variedad de aplicaciones farmacológicas. Este grupo C=O donador hace que la estructura sea mucho más versátil, permitiendo a estos compuestos actuar incluso como agentes quelantes para formar complejos con metales de transición.⁴ Numerosos estudios han demostrado que los compuestos hidrazida-hidrazona y sus derivados están asociados con un amplio espectro de actividades biológicas como antiinflamatoria,^{6,7} analgésica,^{5,7} antioxidante,⁸ anticonvulsiva,⁹ antitubercular,^{10,11} antidepresiva,⁵ antiagregante plaquetario,¹² anti-VIH,¹³ anticancerígena,¹⁴⁻¹⁷ antibacterial, antifúngica o antiviral, entre otras. Estas características han potenciado la síntesis y desarrollo de compuestos portadores del grupo hidrazida-hidrazona para su uso como agentes quimioterapéuticos en la lucha contra diversas enfermedades.

1.2.1. Propiedades antibacteriales.

Las enfermedades de naturaleza bacteriana son un campo de estudio especialmente complicado debido a la creciente cantidad de cepas multiresistentes y al reto que supone su tratamiento en pacientes con un sistema inmune debilitado. En la actualidad, los derivados de hidrazida-hidrazona resultan de gran interés en la búsqueda de nuevos agentes antibacteriales ya que gran parte de los fármacos utilizados con éxito presentan este grupo en su estructura (Figura 1). Es por este motivo que, entre las diferentes propiedades biológicas de estos compuestos, su actividad antimicrobial es la que más se recoge en las publicaciones científicas de los últimos años.¹⁰

Entre los múltiples compuestos de hidrazida-hidrazona con esta naturaleza antibacteriana se incluyen ejemplos como los derivados del ácido 4-fluorobenzoico sintetizados por Rollas et al. (2002) con actividad frente a *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa* y *C.albicans*,⁵ derivados de isonicotinoil hidrazidas sintetizados por Moldovan et al. (2011), hidrazida-hidrazonas del ácido 4-clorofenilsulfonil desarrolladas por Kumar et al. (2011) con gran capacidad de inhibición frente a *E.coli* y *S.aureus*,¹⁰ derivados de 1,2-dihidropirimidina obtenidos por Al-Sharifi y Patel (2012) con actividad frente a diversas bacterias Gram positivas y Gram negativas o las hidrazonas con metales de transición sintetizadas por Bhagat et al. (2012). La mayoría de estos compuestos de nueva síntesis han demostrado actividades que igualan o incluso superan a fármacos antibióticos tradicionales como ampicilina, cloranfenicol y ciprofloxacino.

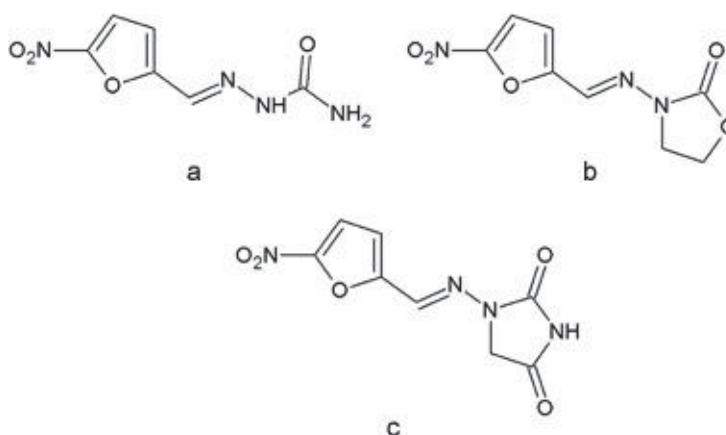


Figura 1. Estructura química de los medicamentos antibacterianos (a) nitrofurazona, (b) furazolidona y (c) nitrofurantoina portadores del grupo hidrazida-hidrazona.

1.2.2. Propiedades antiinflamatorias.

El desencadenamiento de reacciones inflamatorias está asociado no solo a enfermedades comunes como la artritis reumatoide, sino también a los primeros estadios de enfermedades de mayor riesgo como el cáncer o enfermedades cardiovasculares. Hoy en día, la mayoría de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) siguen presentando importantes problemas gástricos como la aparición de úlceras o dispepsia.⁶ Por este motivo, las investigaciones alrededor del diseño y síntesis de agentes químicos capaces de maximizar la respuesta antiinflamatoria reduciendo los daños gastrointestinales resultan de gran urgencia.

Numerosos estudios han demostrado que compuestos derivados del grupo hidrazida-hidrazona exhiben esta naturaleza antiinflamatoria. Algunos ejemplos incluyen: derivados de benzotiazina N-acilhidrazonas con actividad superior a la de fármacos

antiinflamatorios estándar como piroxicam, derivados 6-sustituidos del compuesto 3(2H)-piridazinona-2-acetil-2-benzalhidrazona con propiedades farmacológicas capaces de sustituir al antiinflamatorio indometacina,⁴ N-fenilpirazolil-4-acilhidrazonas capaces de inhibir la agregación plaquetaria o las hidrazida-hidrazonas con estructura 5-metil-2-benzoxazolina sintetizadas por Gokhan-Kelekçi et al. con efectos analgésicos comparables a la morfina.⁵

1.2.3. Propiedades antitumorales.

Los tumores malignos continúan siendo, a día de hoy, la principal causa de mortalidad y morbilidad en personas de todo el mundo, manteniendo la necesidad de encontrar y sintetizar nuevos fármacos que permitan una citotoxicidad eficiente y selectiva.¹⁴ Entre las actividades biológicas mostradas por derivados de hidrazida-hidrazonas destaca, por su importancia en el futuro desarrollo de agentes anticancerígenos, la capacidad de inhibir la proliferación celular e inducir apoptosis y autofagia en células de cáncer de colon,^{15,18} cáncer de esófago,¹⁴ cáncer de pulmón,^{16,19} o cáncer de mama,²⁰ entre otros. A mayores, estos compuestos pueden asociarse con otras estructuras, como es el caso de las quinolinas, con el objeto de potenciar sus efectos inhibitorios.

La química de las quinolinas ha sido de gran interés a lo largo de todo el siglo pasado por su éxito frente a diversos tipos de cáncer.¹⁷ Así, nuevos compuestos hidrazida-hidrazona portadores de estos motivos quinolina (Figura 2) han mostrado importante actividad antineoplásica por medio de intercalación en el ADN, inhibición de la angiogénesis y arresto del ciclo celular.

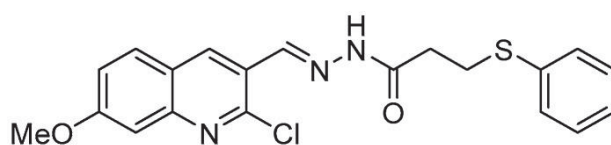


Figura 2. Estructura química del compuesto anticancerígeno (E)-N'-((2-cloro-7-metoxiquinolin-3-il)metileno)-3-(feniltio)propano hidrazida.

En la actualidad, las terapias contra el cáncer están adoptando perspectivas innovadoras que pasan por el uso de nuevas dianas celulares nunca antes consideradas. Estos tratamientos son el resultado de una comprensión más profunda de la biología de ciertos orgánulos como la mitocondria, cuyas funciones se ven alteradas en células de distintos tipos de cáncer. Recientemente, estudios como el desarrollado por Patil y colaboradores en 2018 han conseguido sintetizar especies moleculares

derivadas del grupo hidrazida-hidrazona con la capacidad de actuar sobre este orgánulo, estimulando la apoptosis e inhibiendo la proliferación en células de cáncer de colon.¹⁸ Otro objetivo potencial en tratamientos de nueva generación por su función en procesos de división celular es el hierro y las proteínas férricas.²¹

Varios compuestos quelantes del hierro como la 2-hidroxi-1-naftilaldehído benzoil hidrazona han demostrado efectividad evitando el crecimiento de células tumorales de cáncer de mama, vejiga o cabeza y cuello. Sin embargo, pocos son los quelantes que han llegado a ser testados en ensayos clínicos.²¹

Con todas las características aquí expuestas, sumadas a la escasez de efectos secundarios tóxicos en pacientes, resulta lógico pensar que los compuestos derivados de hidrazida-hidrazonas tienen un futuro muy prometedor en el estudio y desarrollo de nuevos medicamentos que abarquen un amplio espectro de aplicaciones farmacológicas.

1.3. Complejos metálicos de hidrazona como agentes anticancerígenos.

El tratamiento contra el cáncer es una lucha multidisciplinar, abordándose a través de cirugía, radioterapia, hormonoterapia o quimioterapia en función del tipo y grado de avance en el paciente.²²

En las últimas décadas, la química médica inorgánica ha incrementado su interés en el desarrollo de nuevos fármacos basados en compuestos metálicos capaces de unirse o escindir ácidos nucleicos bajo condiciones fisiológicas, exhibiendo múltiples ventajas frente a los compuestos tradicionales centrados en el carbono. Estas ventajas se deben al amplio espectro de geometrías, números de coordinación y estados de oxidación que presentan y que les permiten participar en procesos biológicos redox, funcionalizar grupos para adaptarse a dianas moleculares específicas y coordinarse con moléculas a través de reacciones de intercambio de ligando.²³

El éxito clínico del complejo *cis*-diaminodicloroplatino (II) o *cis*-platino, y de los correspondientes derivados de segunda generación como el carbaplatino, nedaplatino u oxaliplatino, supone un punto de inflexión en la importancia que estos compuestos metálicos tienen en la lucha contra el cáncer.²⁴ Hoy en día, el uso de estos fármacos se extiende a ~70% de los pacientes que sufren esta enfermedad.²⁵

La penetración del *cis*-platino en el interior de las células depende de una combinación de transportes activo, pasivo y mediado por proteínas. Una vez en el interior de las

mismas, los ligandos cloruro son sustituidos por ligandos aquo como resultado de una menor concentración de iones cloruros con respecto al medio extracelular. El complejo resultante, cargado positivamente, reacciona con grupos nucleófilos de ciertas biomoléculas como los grupos tiol de algunas proteínas o los nitrógenos dadores presentes en el ADN (preferentemente N7 de guaninas y adeninas), provocando una deformación en la estructura de doble hélice y con ello la muerte celular (Figura 3).^{22,26}

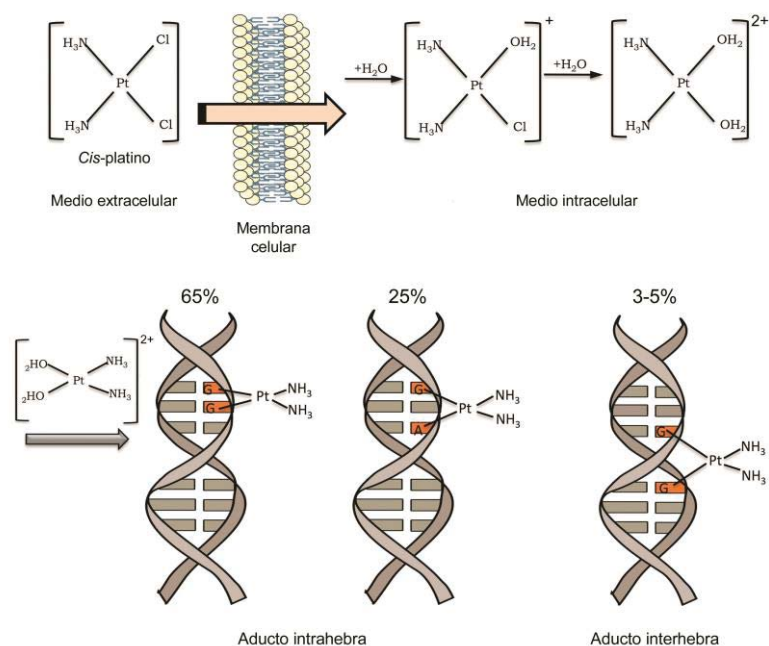


Figura 3. Mecanismo de acción del compuesto *cis*-platino como fármaco antitumoral.

No obstante, estos agentes platinados solo son útiles frente a un número limitado de tumores y los pacientes tratados muestran importantes efectos secundarios, derivados de su elevada toxicidad, junto con fenómenos de resistencia en las células cancerosas, lo que disminuye su impacto y aumenta la mortalidad.²⁵

En la búsqueda de especies menos tóxicas y más efectivas para su aplicación quimioterapéutica, los complejos metálicos de hidrazona se presentan como importantes candidatos. Además de sus ya comentadas propiedades biológicas y farmacéuticas, las hidrazonas sirven como excelentes agente quelantes capaces de ofrecer distintos modos de coordinación con una gran variedad de metales de transición.²⁷ Así, estudios realizados con complejos metálicos de Cu (I) y (II), Co (II) o Ni (II), utilizando derivados de hidrazona como ligandos, han demostrado que estos compuestos exhiben propiedades de unión al ADN y escisión de ADN muy prometedoras para su uso como agentes anticancerígenos y antimicrobiales.^{24,28,29}

Habitualmente, los ligandos polidentados hidrazona se unen al ion metálico a través del nitrógeno azometino y el átomo de oxígeno en su forma enólica.

Tanto los ligandos libres como los complejos de metales de transición interactúan con el ADN mediante la formación de enlaces covalentes irreversibles y asociaciones intermoleculares reversibles, siendo las uniones covalentes, como alquilación y formación de enlaces *crosslink* inter- e intrahebra, responsables de una completa inhibición de las funciones del ADN y la consiguiente muerte celular.³⁰ En cuanto a los mecanismos de unión no covalente, estos incluyen intercalación, unión al surco y atracción electrostática (Figura 4).

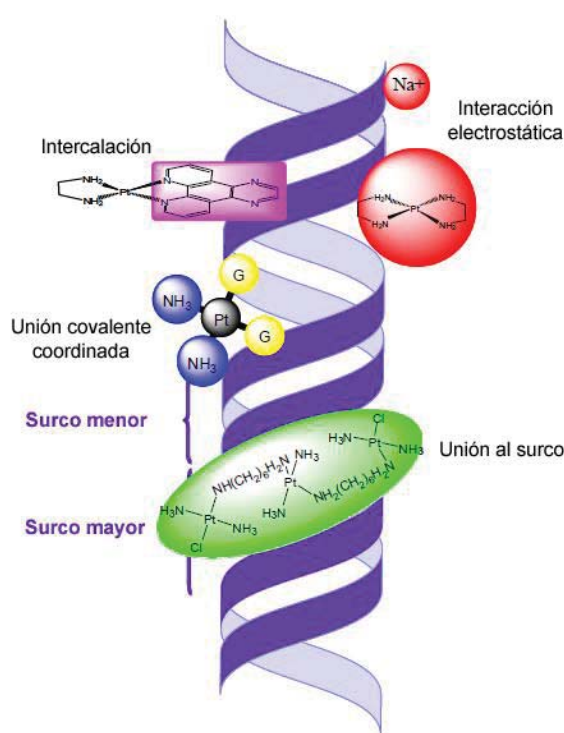


Figura 4. Representación de los distintos modos de interacción de moléculas pequeñas con la doble hélice de ADN.

Los compuestos que se intercalan entre pares de bases adyacentes del ADN deben cumplir una serie de requisitos estructurales, como la presencia de grupos aromáticos planos o cargas positivas. La estabilidad de estas uniones ADN-intercalador depende de fuerzas de van der Waals, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y apilamientos π - π entre los sistemas aromáticos del agente intercalante y las bases nitrogenadas. En el caso de especies que interactúan con los surcos del ADN, estas pueden hacerlo variando ligeramente su forma para ajustarse a la curvatura del surco o encajando directamente en ella. Las moléculas que interactúan de este modo suelen presentar

gran especificidad por las secuencias ricas en adenina-timina, estableciendo enlaces de hidrógeno con el N3 de adenina y O2 de timina. Finalmente, los ligandos y complejos metálicos con carga positiva también pueden asociarse electrostáticamente con la cadena de fosfatos cargada negativamente en la parte externa de la doble hélice de ADN.^{26,31}

Las distorsiones provocadas en la estructura de los ácidos nucleicos por parte de estos compuestos pueden inhibir procesos fundamentales como la transcripción, la replicación o la interacción del ADN con ciertas proteínas, deteniendo así la proliferación celular y estimulando la apoptosis.²⁶ Por consiguiente, el estudio y comprensión de los mecanismos de interacción molécula-ADN resulta fundamental para el diseño de nuevos fármacos más eficientes y selectivos en el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

1.4. Conceptos generales de fotoluminiscencia molecular.

Las técnicas de análisis de fotoluminiscencia constituyen una forma adecuada de evaluar las complejas interacciones intermoleculares que se producen en las moléculas con interés en áreas como la química bioinorgánica o la química médica. El fenómeno de luminiscencia consiste en la emisión de fotones infrarrojos, visibles o ultravioletas por especies que se encuentran en un estado electrónico excitado. Dentro de estas especies emisoras se incluyen compuestos orgánicos, como hidrocarburos aromáticos, aminoácidos, cumarinas o rodaminas, compuestos inorgánicos y compuestos organometálicos, principalmente aquellos que cuentan con iones de las tierras raras o agentes quelantes.³² Los diferentes modos de excitar las moléculas dan lugar a los diversos tipos de luminiscencia.

Una forma particular de luminiscencia es la fotoluminiscencia, donde la excitación se realiza empleando fotones de luz visible o ultravioleta. En este caso, la absorción de fotones de luz lleva a la especie molecular a un estado electrónico excitado. El retorno al estado fundamental estable está acompañado por la emisión de fotones (UV-Vis o IR), dando lugar a las distintas clases de fotoluminiscencia: fluorescencia, fosforescencia y fluorescencia retardada. Asimismo, este decaimiento desde el estado excitado puede seguir procesos no radiantes como son la conversión interna, transición entre dos estados electrónicos de igual multiplicidad de espín con la subsiguiente relajación al nivel vibracional más bajo del estado electrónico final, el cruce intersistema, transición entre niveles vibracionales similares en energía correspondientes a estados electrónicos con diferente multiplicidad de espín, la transferencia intramolecular de

carga (ICT) o los cambios conformacionales ocurridos en la molécula (Figura 5).³² A mayores, las interacciones de la especie excitada con otras moléculas del ambiente también pueden competir con los procesos de relajación radiante.

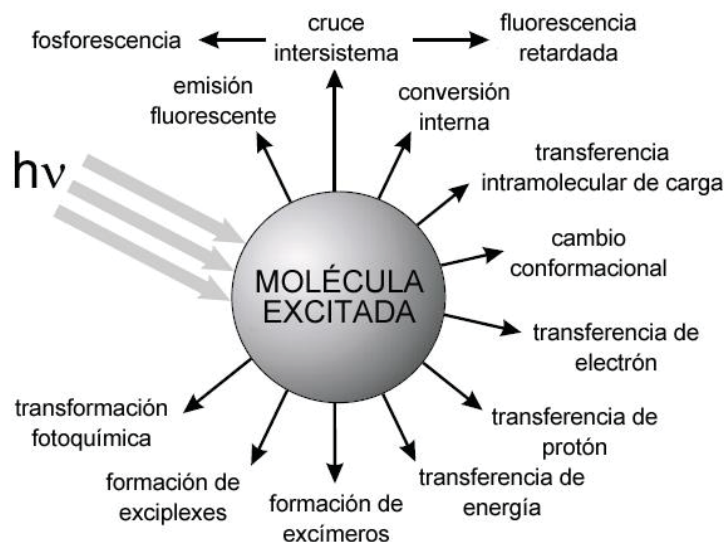


Figura 5. Esquema de las posibles vías de relajación de una molécula excitada.

Los niveles energéticos del estado fundamental y estados excitados de un determinado átomo o molécula, así como todos los posibles procesos de excitación y relajación mencionados, pueden describirse visualmente por medio de un diagrama Perrin-Jablonski (Figura 6). Los estados electrónicos singletes se denotan por S_n , siendo S_0 el estado electrónico fundamental, mientras que los estados tripletes se denotan por T_n , presentando cada estado electrónico (líneas gruesas) múltiples niveles vibracionales y rotacionales asociados (líneas finas). A temperatura ambiente la mayoría de las moléculas se encuentran en el nivel vibracional más bajo del estado electrónico fundamental singlete (S_0). La absorción de un fotón de luz excita la molécula desde este estado S_0 hasta estados electrónicos excitados ($S_1, S_2\dots$), siendo siempre la energía del fotón absorbido igual a la diferencia de energía entre los niveles energéticos implicados en el tránsito.³³ El fenómeno de absorción es del orden de femtosegundos ($<10^{-15}$ s). Debido a la presencia de niveles vibracionales, los espectros de absorción pueden presentar diferentes máximos asociados a un tránsito electrónico.

Como ya se ha reportado anteriormente, la emisión de fotones que acompaña a la relajación $S_1 \rightarrow S_0$ corresponde al fenómeno de fluorescencia, cuyas características son en la mayoría de casos independientes de la longitud de onda de excitación. El espectro de emisión de fluorescencia aparece siempre a menor energía (mayor longitud de onda)

que el de absorción debido a las pérdidas de energía ocurridas en el estado excitado, resultado de la relajación vibracional, y al decaimiento a niveles vibracionales superiores al 0 del estado electrónico fundamental S_0 . Este fenómeno es conocido como “corrimiento al rojo” del espectro.^{32,33} La diferencia entre los máximos de la banda de absorción y emisión del primer tránsito electrónico constituye el desplazamiento de Stokes.

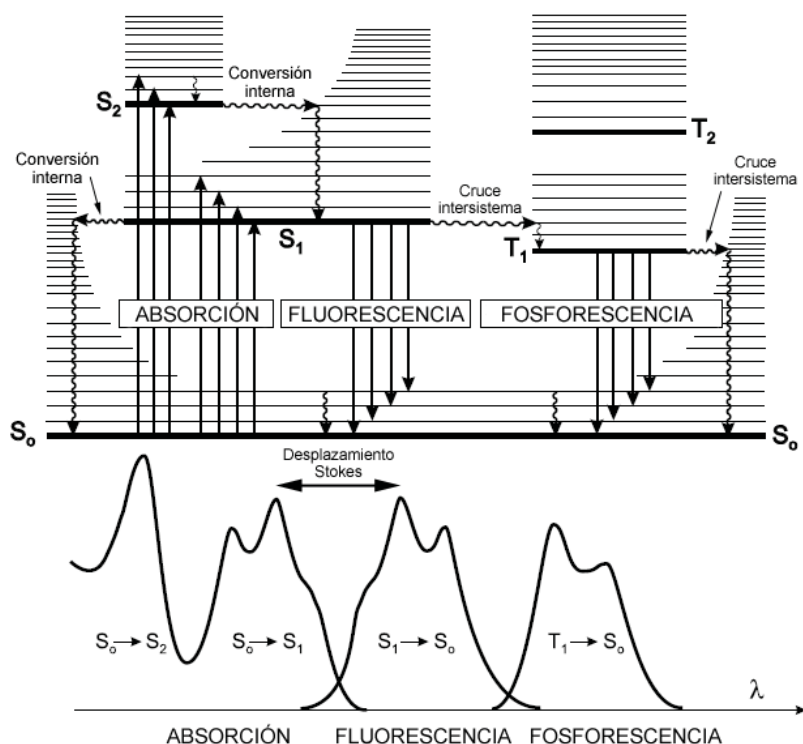


Figura 6. Diagrama Perrin-Jablonski (superior) y representación de las posiciones relativas de los espectros de absorción, emisión fluorescente y emisión fosforescente (inferior).

En ocasiones, los niveles vibracionales de los distintos estados electrónicos pueden mostrarse como picos bien definidos en el espectro, pero las interacciones de los fluoróforos con las moléculas del ambiente tienden a dar espectros constituidos por bandas relativamente anchas. Estos espectros son, por tanto, una potente herramienta para el análisis químico y físico del ambiente molecular del fluoróforo.³³

Otra de las emisiones radiactivas englobadas dentro de la fotoluminiscencia es la fosforescencia. Tras un proceso de cruce intersistema que lleva la especie excitada a un cambio en la multiplicidad de espín de un estado singlete, de S_n a T_n . La transición $T_1 \rightarrow S_0$ es un proceso más lento que el tránsito $S_1 \rightarrow S_0$. Por ser la energía del nivel vibracional más bajo del estado T_1 inferior a la energía de su homólogo en el estado S_1 , el espectro de fosforescencia aparece a mayores longitudes de onda que el espectro de

fluorescencia. Además, si la diferencia energética entre los estados S_1 y T_1 es pequeña y el tiempo que permanece la molécula en el estado excitado T_1 es relativamente largo, puede darse un cruce intersistema inverso $T_1 \rightarrow S_1$ que tiene como resultado un espectro de emisión semejante al espectro normal de fluorescencia. Este tipo de emisión es dependiente de la temperatura, siendo más efectiva a temperaturas elevadas, y se conoce como fluorescencia retardada.

1.4.1. Espectro de emisión y excitación de UV-Vis.

El espectro de emisión o espectro de fluorescencia representa las probabilidades de las distintas transiciones que pueden tener lugar desde el estado excitado S_1 hasta los diferentes niveles vibracionales del estado fundamental S_0 . De este modo, el espectro de emisión refleja la distribución energética de los fotones emitidos y es característico de cada compuesto, pudiendo ser utilizado como herramienta eficaz en la identificación de especies o la determinación de concentraciones en disolución diluida. En la práctica, la medida de la intensidad de fluorescencia en estado estacionario (bajo un haz continuo de luz) en función de la longitud de onda de emisión fluorescente (λ_F), a una longitud de onda de excitación constante (λ_E), constituye el espectro de fluorescencia.³² Generalmente, la λ_E escogida es igual a la longitud de onda de máxima absorción.

Conocida la longitud de onda de fluorescencia (λ_F) correspondiente al máximo del espectro de emisión, la representación de la variación de la intensidad de fluorescencia (I_F) en función de la longitud de onda de excitación (λ_E), para una longitud de onda λ_F seleccionada, constituye el denominado espectro de excitación. Este espectro de excitación suele ser idéntico al de absorción siempre y cuando el estado electrónico fundamental esté ocupado por una única especie molecular. La comparación de los espectros de excitación y emisión obtenidos para un determinado compuesto aporta información importante acerca de su naturaleza e interacciones con el medio.

1.4.2. Factores que afectan a la fluorescencia.

Dentro de los principales factores que afectan al perfil de los espectros, así como a los valores de los rendimientos cuánticos de fluorescencia, se incluyen: la extensión del sistema conjugado π -electrón, presencia de átomos de elementos pesados, sustituyentes dadores y aceptores de electrones, anillos aromáticos heterocíclicos, el efecto de la temperatura y parámetros ambientales como la polaridad del disolvente, el grado de acidez o la viscosidad.³² En general, la gran mayoría de compuestos con propiedades fluorescentes son aromáticos, observándose un desplazamiento de los

espectros de emisión y absorción hacia mayores longitudes de onda y un incremento del rendimiento cuántico a medida que aumenta el grado de conjugación. Este efecto ha sido confirmado en estudios con hidrazonas de aldehídos aromáticos en los que la extensión del sistema π -conjugado en ambas partes de la molécula, aldehído y amina, se traduce en el desplazamiento batocrómico de la banda de absorción.³⁴

En el caso concreto de las especies aromáticas, la transición electrónica de menor energía es de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, caracterizada por rendimientos cuánticos de fluorescencia considerablemente elevados. La existencia de átomos con electrones de no enlace, por ejemplo O y N, en la estructura del sistema π -conjugado provoca que la transición de menor energía sea de tipo $n \rightarrow \pi^*$, en lugar de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$. La lentitud de este proceso hace que los mecanismos de relajación no radiantes sean predominantes.³² No obstante, en medios próticos, compuestos con átomos de nitrógeno heterocíclicos pueden establecer enlaces de hidrógenos con las moléculas del disolvente resultando en una inversión de las transiciones de menor energía de $n \rightarrow \pi^*$ a $\pi \rightarrow \pi^*$ y el consiguiente aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia. En la práctica, muchos de los fluoróforos de mayor interés en campos como la biología médica y conservación medioambiental son heterocíclicos, destacando las fluoresceínas, oxazinas o las ya mencionadas rodaminas y cumarinas. Múltiples investigaciones con hidrazonas basadas en estos últimos compuestos han demostrado su utilidad como sondas fluorescentes de gran selectividad y sensibilidad para la detección de iones metálicos como Cu^{2+} (Figura 7) y sus posibles aplicaciones en técnicas de bioimagen fluorescente en organismos vivos.³⁵

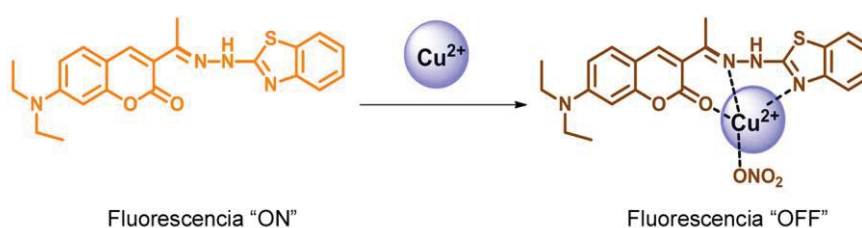


Figura 7. Hidrazona con grupo cumarina (BENZPYR) empleada como sensor para la detección de iones Cu^{2+} . La unión del catión metálico a la molécula resulta en una reducción de la intensidad de fluorescencia.

De forma genérica, la presencia de sustituyentes dadores de electrones tales como grupos hidroxilo, alcoxi o amino, tienden a aumentar el coeficiente de absorción molar e inducir un "corrimiento al rojo" en los espectros de emisión y absorción. Este fenómeno puede explicarse por la participación activa de los electrones desapareados de los

átomos de O y N en la conjugación $p \rightarrow \pi$ con el sistema aromático, lo que se traduce en una disminución de la energía de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$.³⁶

Efecto opuesto tiene la presencia de grupos aceptores de electrones (C=O, -NO₂). Las transiciones de menor energía en estos compuestos son de naturaleza $n \rightarrow \pi^*$, con el cruce intersistema $S_1 \rightarrow T_1$ como proceso dominante de relajación. Sin embargo, la polaridad del disolvente y su capacidad para formar enlaces de hidrógeno puede desestabilizar energéticamente el estado $n \rightarrow \pi^*$ y estabilizar el estado $\pi \rightarrow \pi^*$, observándose así una mayor intensidad de fluorescencia en disolventes polares con respecto a los no polares.³²

Además de los factores moleculares, múltiples parámetros ambientales pueden afectar a las características de la fluorescencia, siendo los más relevantes la temperatura, la viscosidad y la ya citada polaridad del disolvente. Mayoritariamente, el incremento de temperatura aumenta la eficiencia de los procesos no radiantes asociados a la agitación térmica. Del mismo modo, los estados excitados tripletes son fácilmente desactivados por colisión con las moléculas de disolvente, por lo que el fenómeno de fosforescencia también muestra gran sensibilidad a la temperatura. Estos efectos se ven compensados si la especie se encuentra en una matriz rígida o un medio a baja temperatura.³² En cuanto a la polaridad, si el fluoróforo se encuentra en un entorno polar, antes de que la molécula excitada emita el fotón, los dipolos del disolvente polar tienen tiempo a reorientarse alrededor del compuesto disminuyendo la energía del estado excitado. Este proceso se conoce como relajación por disolvente y explica el desplazamiento del espectro de fluorescencia hacia longitudes de onda mayores a medida que aumenta la polaridad del medio.³³

1.5. Fluorescencia de compuestos en estado sólido. Efecto ACQ y AIE.

De forma general, la mayoría de propiedades fotofísicas, tales como el tiempo de vida media del estado excitado,³⁷ el rendimiento cuántico de fluorescencia,³⁸ la tasa de decaimiento o los espectros de emisión y absorción, se estudian en disolución diluida. En estas condiciones, las moléculas de fluoróforo se encuentran relativamente aisladas sin que se produzcan interacciones intermoleculares apreciables entre ellas.^{39,40} No obstante, gran variedad de compuestos luminiscentes muestran comportamientos fotofísicos muy diferentes en disolución diluida en comparación con disoluciones a mayor concentración. Así, por ejemplo, se ha observado frecuentemente que moléculas con una intensa fluorescencia en disolución se convierten en no emisivas en estado sólido. Este fenómeno, denominado “quencheo” por agregación o *aggregation-caused*

quenching (ACQ),^{40,41} se debe a la aparición de interacciones intermoleculares en el estado sólido que originan la formación de nuevas especies menos emisivas como excímeros o exciplexes.⁴²

El efecto ACQ es común a gran parte de compuestos fluorescentes que presentan grupos funcionales aromáticos. Este tipo de fluoróforos emiten eficientemente en disolución, sin embargo, las interacciones tipo π - π que se dan por solapamiento de los sistemas π -conjugados de moléculas adyacentes facilitan la formación de agregados en estado sólido y favorecen el “quencheo” de la fluorescencia (Figura 8).^{40,43} A lo largo de los años, distintas ramas de la ciencia analítica y biológica han aprovechado las ventajas que ofrecen estas moléculas fluorescentes en disolución.⁴¹ Con todo, la reciente aparición de nuevos dispositivos optoelectrónicos como los transistores orgánicos de efecto de campo emisores de luz (OLEFETs),⁴⁴ los diodos orgánicos de emisión de luz (OLEDs)⁴⁵ o los láseres orgánicos en estado sólido (OSSLs),⁴⁶ ha impulsado la síntesis de especies altamente fluorescentes en su estado sólido. Como resultado, muchos grupos de investigación han abordado el problema que supone el efecto ACQ. Entre las principales estrategias diseñadas con objeto de evitar la formación de agregados luminóforos sobresalen: la introducción de sustituyentes voluminosos,^{47,48} la protección dendrítica del núcleo fluorogénico,^{49,50} el aumento de la transferencia de carga intramolecular,⁵¹ o el apilamiento de dipolos cruzados.⁵²

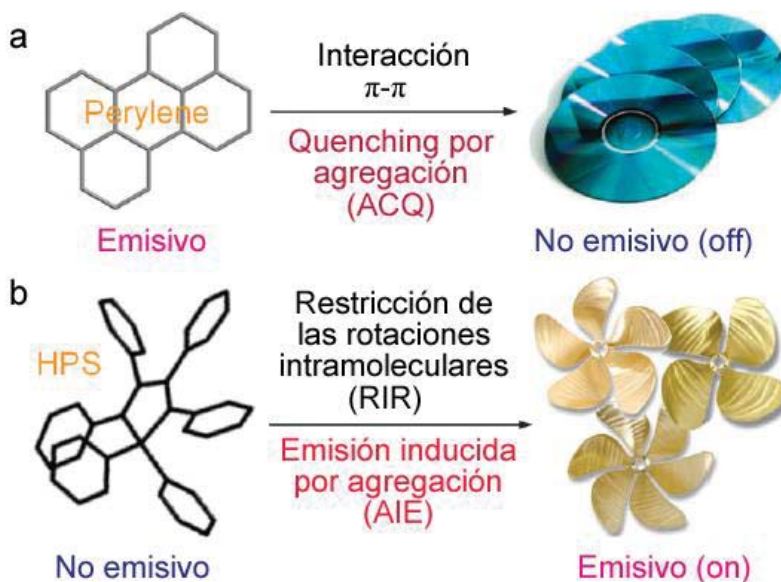


Figura 8. Representación de (a) proceso de “quenching” por agregación en moléculas de perileno debido a interacciones de apilamiento π - π entre los anillos aromáticos y (b) proceso de emisión inducida por agregación en moléculas de hexafenilsilol (HPS) debido a la restricción de las rotaciones intramoleculares de los grupos fenilo.

En 2001, un nuevo fenómeno exactamente opuesto al efecto ACQ se descubre en un derivado del grupo de los “siloles”.⁴² El compuesto 1-metil-1,2,3,4,5-pentafenilsilol (Figura 9) no emite en disolución diluida, pero exhibe una intensa luminiscencia cuando sus moléculas se agregan en disoluciones concentradas o finas películas sólidas.³⁹ Desde el punto de vista estructural, la molécula de silol tiene forma de hélice con sus grupos fenílicos en disposición no coplanar. En disolución diluida, estos grupos periféricos experimentan rotaciones intramoleculares dinámicas, lo que favorece la relajación del estado excitado por procesos no radiantes y resulta en la ausencia de luminiscencia. Contrariamente, en estado agregado, las moléculas se encuentran estrechamente empaquetadas, por lo que las rotaciones intramoleculares de los grupos arilo están restringidas por impedimento estérico. Además, la naturaleza helicoidal impide que las moléculas de silol se alineen frontalmente por apilamiento π - π . Esta restricción de las rotaciones intramoleculares (RIR) y de las interacciones tipo π - π activa los mecanismos radiantes de relajación. Como consecuencia, la especie 1-metil-1,2,3,4,5-pentafenilsilol se vuelve emisiva en estado agregado.^{39,40} Este efecto se denomina, por analogía con el ACQ, emisión inducida por agregación o *aggregation-induced emission* (AIE).⁴²

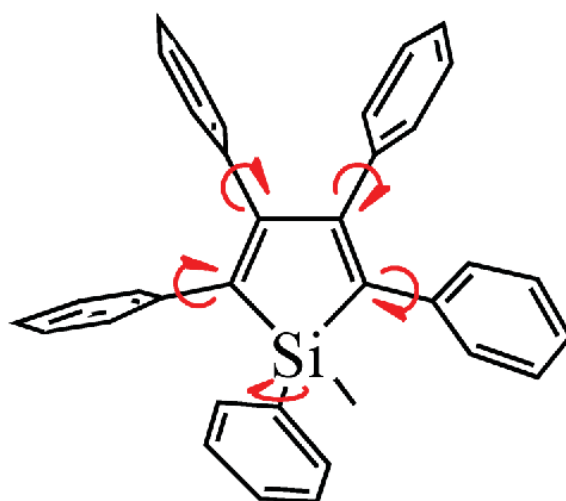


Figura 9. Estructura química de la especie AIE-activa 1-metil-1,2,3,4,5-pentafenilsilol.

Desde el descubrimiento del efecto AIE por Tang y colaboradores, el estudio de nuevos sistemas AIE-activos, así como el desarrollo de materiales con emisión modulable en estado sólido, se han convertido en áreas de gran interés por sus posibles aplicaciones en el mundo real.⁴¹

2. OBJETIVOS.

- Síntesis de los compuestos H1, H2, AL2 y AR8 derivados del grupo hidrazona.
- Caracterización estructural de las especies obtenidas por medio de las técnicas de análisis elemental, espectrometría de masas, espectroscopia IR, RMN ¹H, RMN ¹³C, RMN bidimensional y difracción de rayos X de monocristal.
- Estudio de las propiedades ópticas de los compuestos en disolución y estado sólido mediante espectroscopia de absorción UV-Vis.
- Estudio de las propiedades fotofísicas de los compuestos en disolución y estado sólido mediante espectroscopia de fluorescencia.
- Estudio de la interacción del compuesto AR8 con ADN mediante técnicas de espectrofotometría UV-Vis y espectrofluorimetría. Determinación del mecanismo y constante de unión.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Síntesis.

3.1.1. Compuesto H1.

La síntesis del compuesto H1 se basa en una reacción de condensación entre el hidrocloreuro de piridoxal (Sigma-Aldrich, 99%) y la 4-aminobenzóico hidrazida (Sigma-Aldrich, 95%). Cantidades equivalentes de ambos reactivos se disuelven, por separado, en metanol (PanReac, 99.9%). Tras su completa disolución, se mezclan en un matraz de fondo redondo y se calientan a reflujo durante 2 horas con agitación magnética. La reacción ocurre rápidamente, dando como resultado un producto de color amarillo-naranja.

El precipitado obtenido se filtra a vacío, se lava con pequeñas porciones de metanol y dietiléter (Fisher Chemical, 99%) y se conserva en un desecador durante varios días para eliminar posibles restos de humedad. Adicionalmente, las aguas madres recogidas se separan en un vaso de precipitados con el objeto de conseguir cristalizar más producto.

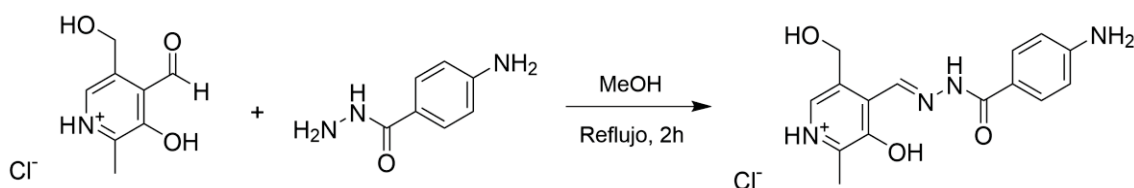


Figura 10. Reacción de síntesis del compuesto H1.

3.1.2. Compuestos H2, AL2 y AR8.

La obtención de los compuestos de hidrazona H2, AL2 y AR8 sigue el mismo procedimiento experimental que la síntesis del derivado H1, haciéndose reaccionar hidrocloreto de piridoxal con 3-hidroxi-2-naftohidrazida (Sigma-Aldrich, $\geq 98.0\%$), 3-hidroxi-benzoico hidrazida (Sigma-Aldrich, 98%) y nicotinohidrazida (Sigma-Aldrich, 97%), respectivamente (Figura 11). Tras el filtrado a vacío y lavado con porciones de metanol y dietiléter, se consigue un producto en forma de polvo de color amarillo pálido, en el caso de H2, y polvo blanco-amarillento, en el caso de AL2 y AR8. Todos ellos se almacenan en el desecador y sus aguas madres se dejan cristalizar en vasos de precipitados.

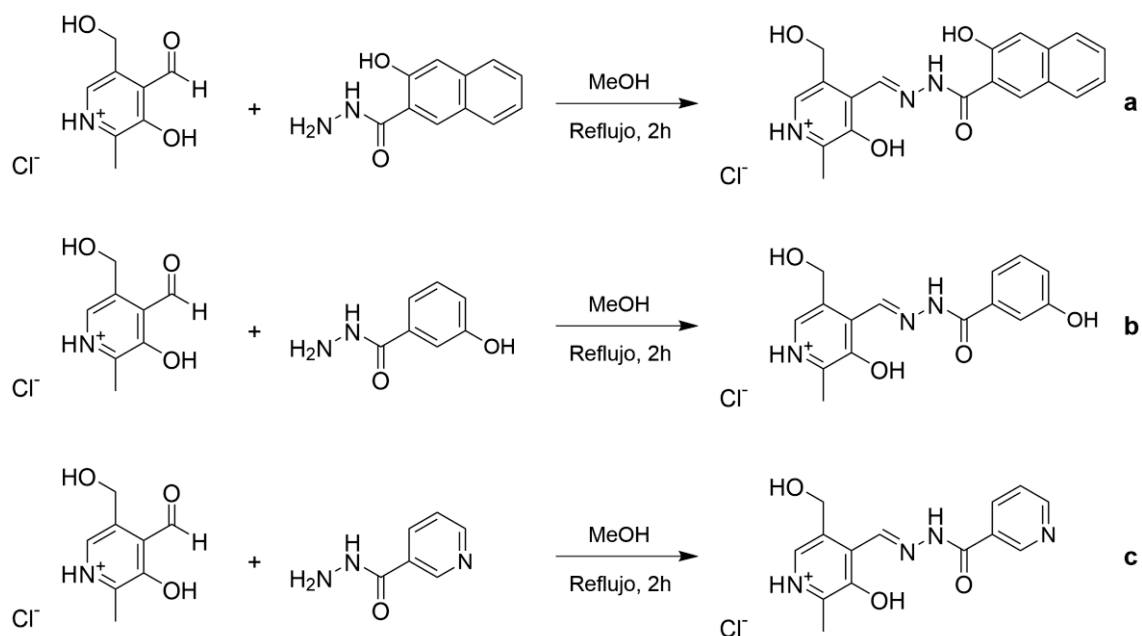


Figura 11. Reacción de síntesis del compuesto (a) H2, (b) AL2, y (c) AR8.

3.2. Caracterización estructural.

3.2.1. Análisis elemental.

Se determinan los porcentajes de nitrógeno, carbono e hidrógeno empleando un analizador elemental FlashEA112 (ThermoFinnigan). El análisis se realiza mediante combustión instantánea de la muestra en un tubo de cuarzo relleno de WO_3 y cobre.

3.2.2. Espectrometría de masas.

Con el objeto de determinar la masa exacta de las moléculas se emplea un espectrómetro de masas LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite para conseguir los espectros correspondientes (positivo y negativo) mediante ionización con electrospray (ESI) acoplado a HPLC Agilent 1200, utilizando metanol como disolvente.

3.2.3. Espectroscopia infrarroja.

Para medir los espectros de IR se utiliza un espectrómetro FT-IR Nicolet iS10 de la casa comercial Thermo Scientific con el módulo de ATR (Attenuated Total Reflection). El procesamiento y visualización de los resultados se efectúa con el software OMNIC.

3.2.4. Espectroscopia RMN ¹H y RMN ¹³C.

Para obtener los espectros de RMN se emplea un sistema de dos espectrómetros de Resonancia Magnética Nuclear: Bruker AVANCE 500, equipado con una criosonda dual ¹H/¹³C y sonda inversa BBI, y Bruker AVANCE III HD 400, con sonda BBFO para observación en banda ancha y sonda HR-MAS ¹H/¹³C. Las medidas se realizan utilizando DMSO-d₆ como disolvente.

3.2.5. Difracción de rayos X.

Se emplea un difractómetro X8 APEX Kappa Bruker-Nonius de difracción de rayos X de monocristal, con radiación MoK α y monocromador de grafito, para obtener las estructuras cristalinas de los correspondientes compuestos. La resolución, refinado y representación de las mismas se realizan con el software SHELXL⁵³ y OLEX2.⁵⁴

3.3. Espectroscopia de absorción y emisión UV-Vis.

3.3.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.

Se realiza un estudio de espectroscopia UV-Vis tanto en disolución como en estado sólido con el objeto de evaluar posibles diferencias entre los espectros recogidos en ambas condiciones.

Antes de comenzar las medidas, se preparan disoluciones stock de los distintos compuestos disolviendo aproximadamente 4 mg de H1, H2, AL2 y AR8 en 13 ml de metanol (0.92, 0.79, 0.91 y 0.96 mM, respectivamente). Tras obtener los valores iniciales de absorbancia de estas disoluciones, se preparan diluciones de trabajo 1/4, en el caso de H1 y H2 (230 y 197.50 μ M, respectivamente), y 1/20, en el caso de AL2 y AR8 (45.50

y 48 μM , respectivamente), que se utilizan para desarrollar el experimento sin saturar el equipo. Todos los espectros de absorción se registran con un espectrofotómetro UV-Vis JASCO V650 entre los 250 y 750 nm. Las medidas se efectúan siempre en cubeta de cuarzo con camino óptico de 10 mm.

Para el análisis de los compuestos en estado sólido, se emplea la técnica de espectroscopia UV-Vis de reflectancia difusa. Los espectros de reflectancia difusa representan la relación entre la luz dispersada por la muestra y la dispersada por un estándar ideal no absorbente, en este caso BaSO_4 , en función de la longitud de onda λ .

Considerando una capa plana de muestra de espesor infinito, se puede obtener una correlación entre la reflectancia absoluta de la muestra (R_∞) y el coeficiente de absorción (K) según la función Kubelka-Munk ($F(R_\infty)$) (1).

$$F(R_\infty) = \frac{(1 - R_\infty)^2}{2R_\infty} = \frac{K}{S} \quad (1)$$

La transformación de Kubelka-Munk permite, así, convertir el espectro de reflectancia difusa en una aproximación al espectro de absorbancia real recogido para la muestra en disolución.^{55,56}

Las medidas se realizan en el espectrofotómetro UV-Vis JASCO V650, al que se acopla un accesorio de esfera integradora capaz de registrar la radiación reflejada por los compuestos. Esta esfera integradora consiste en una estructura hueca con orificios a través de los cuales penetra la radiación incidente y reemitida, y puertos para el montaje de la muestra y el estándar de referencia. Su parte interna está recubierta por un material cuyo valor de reflectancia difusa se aproxima a la unidad.⁵⁷

Dado que el tamaño de partícula es uno de los factores que más afecta a las medidas de reflectancia, con la intención de obtener resultados consistentes, se muelen fracciones pequeñas de los compuestos a analizar en un mortero de ágata hasta conseguir polvo fino. A continuación, la muestra se deposita en el soporte de muestras que se acomoda en el correspondiente puerto de la esfera integradora. Todos los espectros de reflectancia difusa se registran en el intervalo entre 200 y 800 nm.

3.3.2. Determinación de los *gaps* energéticos.

El *gap* energético (E_g) describe la energía necesaria para excitar un electrón desde el orbital molecular HOMO hasta el orbital molecular LUMO, análogos de las bandas de valencia y conducción en semiconductores, y constituye uno de los factores más

importantes en la predicción de las propiedades fotofísicas y potenciales aplicaciones optoelectrónicas del material.^{58,59}

El valor del *gap* energético en estado sólido se calcula a partir del espectro de reflectancia difusa por medio del método Tauc,⁶⁰ el cual asume que el coeficiente de absorción α dependiente de energía puede expresarse como:

$$(\alpha \cdot h\nu)^{1/\gamma} = B(h\nu - E_g) \quad (2)$$

donde h es la constante de Plank, ν la frecuencia del fotón, E_g el *gap* de energía y B es una constante. El valor de γ varía en función de la naturaleza de la transición electrónica, siendo $\frac{1}{2}$ para transiciones directas y 2 para transiciones indirectas.

Sustituyendo el término α de la ecuación (2) por la función Kubelka-Munk $F(R_\infty)$ se obtiene la siguiente expresión:

$$(F(R_\infty) \cdot h\nu)^{1/\gamma} = B(h\nu - E_g) \quad (3)$$

Así, la representación de $(F(R_\infty) \cdot h\nu)^{1/\gamma}$ frente a $h\nu$ resulta en el conocido como diagrama de Tauc (Figura 12), y la intersección de su ajuste lineal con el eje x da una estimación del *gap* energético.^{58,61}

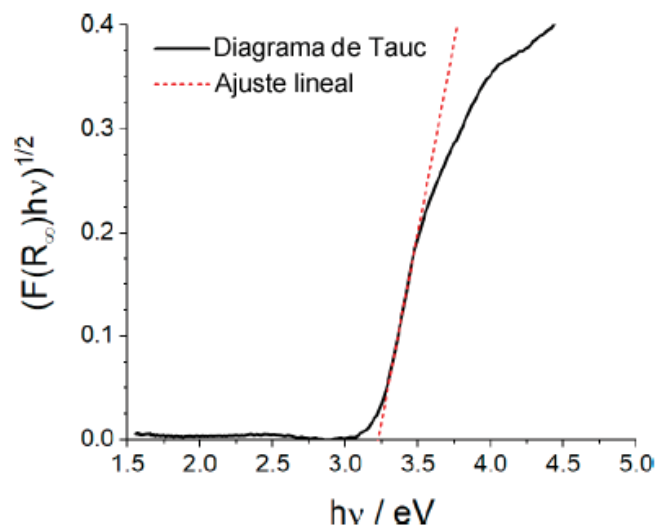


Figura 12. Método de determinación del *gap* energético (E_g) a partir de la representación de Tauc.

3.3.3. Espectroscopia de fluorescencia UV-Vis.

Con la intención de evaluar el comportamiento fotoluminiscente de los distintos derivados de hidrazona sintetizados, así como posibles cambios en la fluorescencia emitida, se realiza un estudio espectrofluorométrico tanto en disolución como en estado agregado.

Las medidas de fluorescencia se recogen con un espectrofluorímetro Horiba Scientific Fluoromax Plus-P utilizando las disoluciones stock de H1, H2, AL2 y AR8 en metanol elaboradas para el experimento de espectroscopia de absorción UV-Vis (0.92, 0.79, 0.91 y 0.96 mM, respectivamente). Se realizan espectros de emisión fluorescente de cada uno de los compuestos a distintos valores de longitud de onda de excitación (λ_E). Las longitudes λ_E que maximizan la emisión fluorescente se escogen en base a los resultados de los espectros de excitación previamente registrados. Todos los espectros de emisión se miden para rangos de longitudes de onda de fluorescencia (λ_F) variables, aproximadamente desde los 400 a los 750 nm.

En cuanto a la emisión en estado sólido, los compuestos se depositan directamente en el soporte metálico de muestras, prensando cuidadosamente el polvo para que se sostenga por sí mismo. A continuación, el soporte se coloca en el correspondiente puerto del espectrofluorímetro Horiba Scientific Fluoromax Plus-P. Al igual que en disolución diluida, se realizan espectros de fluorescencia de las especies H1, H2, AL2 y AR8 a distintos valores de λ_E para rangos de λ_F variables en torno a 400-750 nm.

3.4. Estudios de interacción con el ADN.

Como se comenta en el apartado “Introducción”, actualmente, gran variedad de fármacos anticancerígenos ejercen sus funciones biológicas por medio de la unión con las moléculas de ADN. El estudio de los mecanismos de interacción de estos compuestos con el ADN resultan de gran importancia en el área quimioterapéutica al contribuir en el desarrollo de nuevos agentes químicos para terapia antitumoral.⁶²

En el presente trabajo, se analizan las propiedades de unión al ADN del derivado AR8 a través de las técnicas de espectroscopia de absorción UV-Vis y espectroscopia de fluorescencia.

3.4.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.

La espectroscopia de absorción UV-Vis es una de las técnicas analíticas más comunes y elementales para explorar la interacción entre moléculas de pequeño tamaño y el ADN.

Previamente a la realización de las medidas, se prepara una disolución salina tamponada con fosfato (0.01 M de fosfato, 0.0027 M KCl, 0.137 M NaCl, pH 7.4 a 25 °C) disolviendo dos pastillas de tampón fosfato salino PBS (Fisher Scientific) en 200 ml de agua doblemente destilada. Esta disolución tampón se utiliza a lo largo de todo el experimento para controlar el pH del sistema de reacción y mantener la estabilidad del ADN.

A continuación, se prepara la disolución stock de ADN disolviendo aproximadamente 1 mg de ADN de timo de ternera (ctADN) (Sigma-Aldrich) en 1 ml del tampón PBS. Esta disolución se conserva a 4 °C en oscuridad durante 24 horas y su concentración exacta se determina por absorbancia UV a 260 nm, utilizando un valor de coeficiente de absortividad molar $\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.⁶³ Además, se comprueba la pureza del ctADN controlando la relación de absorbancias a 260 y 280 nm, siendo un valor de $A_{260}/A_{280} > 1.8$ indicativo de que el ADN se encuentra suficientemente libre de proteínas.⁶⁴ La selección de estas longitudes de onda se debe a que el espectro UV-Vis del ADN exhibe una banda de absorción en el rango 200-350 nm con un máximo a 260 nm. Esta banda resulta de las transiciones electrónicas que se originan en los grupos cromóforos situados en las bases nitrogenadas. Una vez realizadas estas medidas, a partir de la disolución stock, se prepara por dilución con PBS una disolución de trabajo de concentración 1200 μM .

Finalmente, se disuelven 2.6 mg del compuesto AR8 en 50 ml de DMSO (Sigma-Aldrich, $\geq 99.9\%$), obteniéndose una primera disolución a partir de la cual se preparan las dos disoluciones stock de concentración 20 μM y 40 μM en PBS que se utilizan para estudiar la unión de este derivado al ADN.

Los espectros de absorción se recogen con un espectrofotómetro UV-Vis JASCO V650 manteniendo la concentración del compuesto de estudio constante a 20 μM y añadiendo concentraciones crecientes de ctADN (0, 11.76, 23.08, 39.25, 80.52, 120, 158.82 y 200 μM) directamente en la cubeta de cuarzo en la que se efectúan las medidas. El mismo volumen de disolución stock 40 μM de AR8 que de ctADN debe adicionarse en cada paso para evitar la dilución y conseguir mantener constante la concentración del fármaco. Además, con el objeto de eliminar posibles interferencias causadas por la absorbancia del propio ADN, las disoluciones del blanco se preparan siguiendo el mismo patrón de adiciones, pero añadiendo disolvente PBS en lugar del compuesto. La absorbancia se registra siempre entre 250 y 550 nm.

El principio de esta técnica se basa en analizar los cambios observados en el perfil de absorbancia del compuesto tras las sucesivas adiciones de ADN. De forma genérica, la unión por medio de intercalación provoca una disminución de la intensidad de absorción del fármaco, efecto hipocrómico, y un desplazamiento de su máximo hacia mayores longitudes de onda, efecto batocrómico, como consecuencia de las interacciones por apilamiento π - π entre los sustituyentes aromáticos del cromóforo y los pares de bases del ADN.⁶⁵ El acoplamiento entre el orbital π^* vacío de la molécula y el orbital π^* de las bases nitrogenadas del ADN provoca una reducción del nivel energético de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$, lo que se traduce en el “corrimiento al rojo” del máximo de absorción. Del mismo modo, esto contribuye al efecto hipocrómico al disminuir las probabilidades del tránsito electrónico por el llenado parcial del orbital π^* vacío.⁶² El grado de hipocromismo está directamente relacionado con la fortaleza de la interacción, la cual disminuye con el cubo de la distancia entre el compuesto cromogénico y las bases del ADN. También resulta frecuente la obtención de espectros con efecto hiperocrómico, acompañado por un pequeño o nulo desplazamiento batocrómico, en el caso de especies que interactúan con el ADN mediante unión a los surcos.⁶⁶

Otro tipo de interacción que puede atribuirse al efecto hiperocrómico, y que provoca la desnaturalización de la molécula de ADN, es el contacto externo (unión electrostática) del fármaco con la doble hélice. Cuando esto sucede, las fuerzas que mantienen unidas las hebras de ADN (mayormente enlaces de hidrógeno) y que limitan la resonancia del anillo aromático de las bases nitrogenadas se debilitan. Como consecuencia, se produce un aumento de la absorbancia UV de la disolución de ADN debido a la presencia de bases en su forma libre.^{31,66}

A partir de los datos de absorción obtenidos, el valor de la constante de unión o constante de asociación (K_b) para la interacción AR8-ctADN se determina utilizando la ecuación (4):

$$\frac{[ADN]}{(\varepsilon_A - \varepsilon_f)} = \frac{[ADN]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} \quad (4)$$

donde $[ADN]$ es la concentración de ADN en molaridad, $\varepsilon_A = A_{\text{obsd}} / [\text{compuesto}]$, ε_f es el coeficiente de extinción del compuesto libre y ε_b es el coeficiente de extinción del compuesto completamente unido al ADN. La constante de unión K_b se calcula como la división entre la pendiente y la ordenada en el origen de la recta resultante de representar $[ADN] / (\varepsilon_A - \varepsilon_f)$ frente $[ADN]$.^{65,66}

Mientras que la constante de unión mide la estabilidad de la interacción entre el compuesto estudiado y el ADN, la energía libre de Gibbs (ΔG) aporta información sobre la espontaneidad de la asociación. Esta energía se calcula de acuerdo con la ecuación (5):

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad (5)$$

siendo R la constante de gases ideales ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), K_b la constante de asociación determinada para el compuesto y T la temperatura en kelvin (considerada 298.15 K).

3.4.2. Espectroscopia de fluorescencia UV-Vis.

La espectroscopia de fluorescencia es una técnica ampliamente utilizada en el estudio de interacciones entre especies moleculares y ADN debido a su elevada sensibilidad y selectividad, facilidad de implementación y rapidez. Dado que el compuesto AR8 es una especie altamente fluorescente, sus propiedades de unión al ADN pueden determinarse directamente en base a los distintos cambios observados en los espectros de emisión.

Antes de comenzar a realizar las medidas, al igual que en espectroscopia UV-Vis, se prepara una disolución stock de ctADN en tampón fosfato PBS (concentración exacta calculada por absorbancia a 260 nm) a partir de la cual, se elabora la disolución de trabajo de concentración $1200 \mu\text{M}$. A mayores, se preparan las dos disoluciones stock de AR8 de concentración $10 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$ en PBS utilizadas para medir la emisión fluorescente.

El experimento se realiza en un espectrofluorímetro Horiba Scientific Fluoromax Plus-P manteniendo la concentración del compuesto de estudio constante a $10 \mu\text{M}$ e incrementando gradualmente la concentración de ctADN ($0\text{-}145.45 \mu\text{M}$) directamente en la cubeta de fluorescencia. El mismo volumen de disolución stock $20 \mu\text{M}$ de AR8 que de ctADN debe adicionarse en cada paso para mantener constante la concentración del fármaco a analizar. La longitud de onda de excitación (λ_E) y longitud de onda (λ_F) de máxima emisión se escogen a partir de las propiedades fotoluminiscentes de AR8, anteriormente estudiadas por espectrofluorimetría. Así, los espectros de emisión se recogen utilizando un valor de $\lambda_E = 400 \text{ nm}$ para un rango de λ_F entre 430 y 600 nm . Los *slits* de excitación y emisión se fijan ambos a 2 nm .

Cualquier molécula externa puede, potencialmente, “quenchar” la fluorescencia de otra especie mediante unión a la misma.⁶² De este modo, el fundamento de la técnica

realizada se basa en analizar la intensidad y posición de la banda de fluorescencia del compuesto AR8 en presencia de distintas cantidades de ctADN.

En el caso de fármacos que interaccionan mediante intercalación, la rotación de las moléculas libres promueve la desactivación del estado excitado por mecanismos no radiantes. Igualmente, las fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno que se dan en las interacciones mediante unión al surco provocan un descenso de la emisión fluorescente a medida que aumenta la concentración de ADN en el medio.³¹

Por el contrario, si el fármaco se une covalentemente al ADN, la relajación por fluorescencia se ve potenciada y los espectros obtenidos muestran un incremento significativo en la intensidad de la emisión.

Los resultados de fluorescencia obtenidos se utilizan para calcular la constante de unión (K_b) y estequiometría (n) de la interacción AR8-ctADN por medio de la ecuación (6):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (6)$$

donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia del compuesto en ausencia y presencia de “quencher”, respectivamente, y $[Q]$ es la concentración del “quencher”. El valor de la constante de unión K_b se determina a partir de la ordenada en el origen de la representación $\log [(F_0 - F) / F]$ frente $\log [Q]$.⁶⁴

A mayores, el “quencheo” de la fluorescencia también se analiza a través de la constante de “quenching”, la cual se calcula empleando la ecuación de Stern-Volmer (7):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (7)$$

donde, nuevamente, F_0 y F son las intensidades de fluorescencia del compuesto en ausencia y presencia de “quencher” y $[Q]$ la concentración del “quencher”. La constante de “quenching” Stern-Volmer (K_{SV}) se determina por la pendiente de la recta resultante de representar F_0 / F frente $[Q]$ y es indicativa de la accesibilidad del fluoróforo al ADN.⁶²

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Caracterización estructural.

La caracterización de los compuestos sintetizados en el presente trabajo se realiza por medio de análisis elemental, espectrometría de masas, espectroscopia infrarroja,

espectroscopia RMN ^1H y ^{13}C y espectroscopia RMN bidimensional COSY, HSQC, HMBC y NOESY. Además, la estructura de las especies AL2 y AR8 se estudia por difracción de rayos X de monocristal.

Los espectros conseguidos por las diferentes técnicas empleadas, así como los resultados cristalográficos, se recogen detalladamente en el apartado “Anexos”.

4.1.1. Compuesto H1.

Los datos analíticos obtenidos para este compuesto permiten confirmar que su estructura coincide con lo propuesto teóricamente. Debido a la imposibilidad de generar cristales adecuados, no se efectúan estudios de difracción de rayos X para este derivado. El rendimiento de la reacción de síntesis es del 76%.

Tabla 1. Análisis elemental del compuesto H1. Se muestran los porcentajes de C, H y N obtenidos experimentalmente y los valores calculados para una estructura molecular propuesta.

Compuesto H1	C (%)	H (%)	N (%)
Experimental	47.72	5.25	14.06
Teórico H1·HCl·2H ₂ O·0.5MeOH	47.86	6.17	14.41

MS-ESI⁺ (MeOH): Pico de máxima intensidad a m/z (I%) 301.13 (100) correspondiente al catión pseudomolecular $[\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_3]^+$. Pico a m/z (I%) 323.11 (21.48) correspondiente al catión pseudomolecular $[\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{NaO}_3]^+$.

MS-ESI⁻ (MeOH): Pico de máxima intensidad a m/z (I%) 299.12 (100) correspondiente al anión pseudomolecular $[\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3]^-$. Pico a m/z (I%) 335.09 (52.25) correspondiente al anión pseudomolecular $[\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_4\text{O}_3]^-$.

IR: El espectro infrarrojo del derivado H1 presenta bandas características a 3212.13, 1641.22, 1600.42 y 1044.63 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones $\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=N})$ y $\nu(\text{N-N})$, respectivamente. La señal originada por el enlace C=O carbonílico es indicativa de que la especie en estado sólido se encuentra en su forma cetónica.

Adicionalmente, las dos bandas moderadamente anchas que se encuentran entre los 3300 y 3400 cm^{-1} se atribuyen a la tensión N-H simétrica y asimétrica propia de la amina

primaria aromática (Ar-NH₂). Las bandas a 2981.23 y 1264.48 cm⁻¹ se corresponden a las vibraciones de tensión O-H y C-O_{enólico} del residuo piridoxal, respectivamente.

RMN: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 2.63 (3H, s, Ar-CH₃), 4.77 (2H, s, Ar-CH₂-OH), 6.66 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, 3-H_{Ar-benz} y 5-H_{Ar-benz}), 7.81 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, 2-H_{Ar-benz} y 6-H_{Ar-benz}), 8.20 (1H, s, 6-H_{Ar-piridoxal}), 9.01 (1H, s, -CH=N), 12.84 (1H, s, N-H_{hidrazona}), 13.48 (1H, s, Ar-CH₂-OH).

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 14.57 (CH₃, Ar-CH₃), 57.99 (CH₂, Ar-CH₂-OH), 112.94 (CH, 3-C_{Ar-benz} y 5-C_{Ar-benz}), 117.32 (C, C_{Ar-C=O}), 127.01 (C, C_{Ar-CH₂-OH}), 129.27 (CH, 6-C_{piridoxal}), 129.95 (CH, 2-C_{Ar-benz} y 6-C_{Ar-benz}), 136.20 (C, C_{Ar-CH=N}), 141.41 (CH, -CH=N), 142.98 (C, C_{Ar-CH₃}), 152.75 (C, C_{Ar-NH₂}), 152.98 (C, C_{piridoxal-OH}), 162.70 (C, C=O).

4.1.2. Compuesto H2.

Los datos analíticos obtenidos para este compuesto permiten confirmar que su estructura coincide con lo propuesto teóricamente. Debido a la imposibilidad de generar cristales adecuados, no se efectúan estudios de difracción de rayos X para este derivado. El rendimiento de la reacción de síntesis es del 81%.

Tabla 2. Análisis elemental del compuesto H2. Se muestran los porcentajes de C, H y N obtenidos experimentalmente y los valores calculados para una estructura molecular propuesta.

Compuesto H2	C (%)	H (%)	N (%)
Experimental	57.77	4.40	10.26
Teórico			
H2·HCl·0.5MeOH	57.97	4.95	10.41

MS-ESI⁺ (MeOH): Pico de máxima intensidad a *m/z* (I%) 352.13 (100) correspondiente al catión pseudomolecular [C₁₉H₁₈N₃O₄]⁺. Pico a *m/z* (I%) 374.11 (6.20) correspondiente al catión pseudomolecular [C₁₉H₁₇N₃NaO₄]⁺.

MS-ESI⁻ (MeOH): Pico de máxima intensidad a *m/z* (I%) 350.11 (100) correspondiente al anión pseudomolecular [C₁₉H₁₆N₃O₄]⁻. Pico a *m/z* (I%) 374.11 (6.20) correspondiente al dímero aniónico [C₃₈H₃₃N₆O₈]⁻ formado por las especies [C₁₉H₁₆N₃O₄]⁻ y C₁₉H₁₇N₃O₄ unidas mediante enlace de hidrógeno.

IR: El espectro infrarrojo del derivado H2 presenta bandas características a 3275.08, 1691.66, 1627.10 y 1042.10 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones $\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=N})$ y $\nu(\text{N-N})$, respectivamente. La señal originada por el enlace C=O carbonílico es indicativa de que la especie en estado sólido se encuentra en su forma cetónica.

Por otra parte, las bandas que aparecen en la región entre 1212 y 1290 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones de tensión $\text{C-O}_{\text{enólico}}$, mientras que la banda relativamente ancha situada a 3118.58 cm^{-1} se corresponde a la tensión O-H .

RMN: ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6 , ppm) δ 2.65 (3H, s, Ar-CH_3), 4.81 (2H, s, $\text{Ar-CH}_2\text{-OH}$), 7.39 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, $5\text{-H}_{\text{Ar-naft}}$), 7.41 (1H, s, $4\text{-H}_{\text{Ar-naft}}$), 7.54 (1H, ddd, $J = 8.2, 6.7, 1.3$ Hz, $8\text{-H}_{\text{Ar-naft}}$), 7.79 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, $7\text{-H}_{\text{Ar-naft}}$), 7.95 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, $6\text{-H}_{\text{Ar-naft}}$), 8.23 (1H, s, $6\text{-H}_{\text{Ar-piridoxal}}$), 8.54 (1H, s, $1\text{-H}_{\text{Ar-naft}}$), 9.08 (1H, s, $-\text{CH=N}$), 11.26 (1H, s, $\text{Ar}_{\text{piridoxal}}\text{-OH}$), 12.89 (1H, s, $\text{N-H}_{\text{hidrazona}}$), 13.20 (1H, s, $\text{Ar}_{\text{naft}}\text{-OH}$).

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO-d_6 , ppm) δ 14.79 (CH_3 , Ar-CH_3), 58.03 (CH_2 , $\text{Ar-CH}_2\text{-OH}$), 109.42 (C, $\text{C}_{\text{Ar-naft}}$), 110.58 (CH, $4\text{-C}_{\text{Ar-naft}}$), 119.84 (C, $\text{C}_{\text{Ar-C=O}}$), 123.93 (CH, $5\text{-C}_{\text{Ar-naft}}$), 125.85 (CH, $7\text{-C}_{\text{Ar-naft}}$), 126.56 (CH, $1\text{-C}_{\text{Ar-naft}}$), 126.77 (CH, $\text{C}_{\text{Ar-CH}_2\text{-OH}}$), 128.59 (CH, $6\text{-C}_{\text{Ar-naft}}$), 128.80 (CH, $8\text{-C}_{\text{Ar-naft}}$), 131.45 (CH, $6\text{-C}_{\text{piridoxal}}$), 136.11 (C, $\text{C}_{\text{Ar-naft}}$), 136.79 (C, $\text{C}_{\text{Ar-CH=N}}$), 143.46 (C, $\text{C}_{\text{Ar-CH}_3}$), 144.17 (CH, $-\text{CH=N}$), 152.87 (C, $\text{C}_{\text{piridoxal-OH}}$), 153.46 (C, $\text{C}_{\text{Ar-naft-OH}}$), 163.65 (C, C=O).

4.1.3. Compuesto AL2.

Los datos analíticos obtenidos para este compuesto permiten confirmar que su estructura coincide con lo propuesto teóricamente. El rendimiento de la reacción de síntesis es del 75%.

Tabla 3. Análisis elemental del compuesto AL2. Se muestran los porcentajes de C, H y N obtenidos experimentalmente y los valores calculados para la estructura molecular propuesta.

Compuesto AL2	C (%)	H (%)	N (%)
Experimental	51.37	4.33	11.73
Teórico AL2·HCl·0.5H ₂ O	51.90	5.19	12.11

MS-ESI⁺ (MeOH): Pico de máxima intensidad a m/z (I%) 302.11 (100) correspondiente al catión pseudomolecular $[\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4]^+$.

MS-ESI⁻ (MeOH): Pico de máxima intensidad a m/z (I%) 300.10 (100) correspondiente al anión pseudomolecular [C₁₅H₁₄N₃O₄]⁻. Pico a m/z (I%) 336.08 (45) correspondiente al anión pseudomolecular [C₁₅H₁₅ClN₃O₄]⁻.

IR: El espectro infrarrojo del derivado AL2 presenta bandas características a 3146.12, 1663.07, 1581.39 y 1051.12 cm⁻¹ correspondientes a las vibraciones $\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=N})$ y $\nu(\text{N-N})$, respectivamente. La señal originada por el enlace C=O carbonílico es indicativa de que la especie en estado sólido se encuentra en su forma cetónica.

A mayores, las bandas que aparecen en la región entre 1250 y 1285 cm⁻¹ se atribuyen a las vibraciones de tensión C-O_{enólico}.

RMN: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 2.64 (3H, s, Ar-CH₃), 4.78 (2H, s, Ar-CH₂-OH), 7.08 (1H, ddd, $J = 8.1, 2.6, 1.0$ Hz, 2-H_{Ar-benz}), 7.38 (1H, t, $J = 7.9$ Hz, 5-H_{Ar-benz}), 7.41 (1H, t, $J = 2.1$ Hz, 4-H_{Ar-benz}), 7.49 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, 6-H_{Ar-benz}), 8.23 (1H, s, 6-H_{Ar-piridoxal}), 9.06 (1H, s, -CH=N), 9.97 (1H, s, Ar_{benz}-OH), 13.06 (1H, s, N-H_{hidrazona}), 13.26 (1H, s, Ar-CH₂-OH).

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 14.71 (CH₃, Ar-CH₃), 58.05 (CH₂, Ar-CH₂-OH), 114.71 (CH, 2-C_{Ar-benz}), 118.39 (CH, 6-C_{Ar-benz}), 119.83 (CH, 4-C_{Ar-benz}), 126.76 (C, C_{Ar-CH₂-OH}), 129.57 (CH, 6-C_{piridoxal}), 129.81 (CH, 5-C_{Ar-benz}), 132.66 (C, C_{Ar-C=O}), 136.59 (C, C_{Ar-CH=N}), 143.40 (C, C_{Ar-CH₃}), 143.65 (CH, -CH=N), 152.89 (C, C_{piridoxal-OH}), 157.65 (C, C_{Ar-benz-OH}), 163.14 (C, C=O).

DRX: La lenta evaporación de las aguas madre resulta en la formación de cristales amarillos con forma de aguja aptos para su estudio a través de esta técnica.

El compuesto AL2 presenta una estructura prácticamente plana, con el nitrógeno N3 del grupo piridoxal protonado, enlaces de hidrógeno entre el anión cloruro Cl1 y los grupos N2H y N3H e interacciones intramoleculares por enlace de hidrógeno entre el O1H y el nitrógeno azometino N1. La especie cristaliza en un sistema monoclinico en el grupo espacial Cc.

En cuanto a las interacciones intermoleculares que estabilizan el empaquetamiento cristalino, las moléculas adyacentes muestran enlaces de hidrógeno entre los grupos O4H y O3H y apilamientos π - π entre los anillos de hidroxibenceno y piridoxal. Los datos de refinado estructural, así como distancias y ángulos de enlace se recogen en el apartado "Anexos".

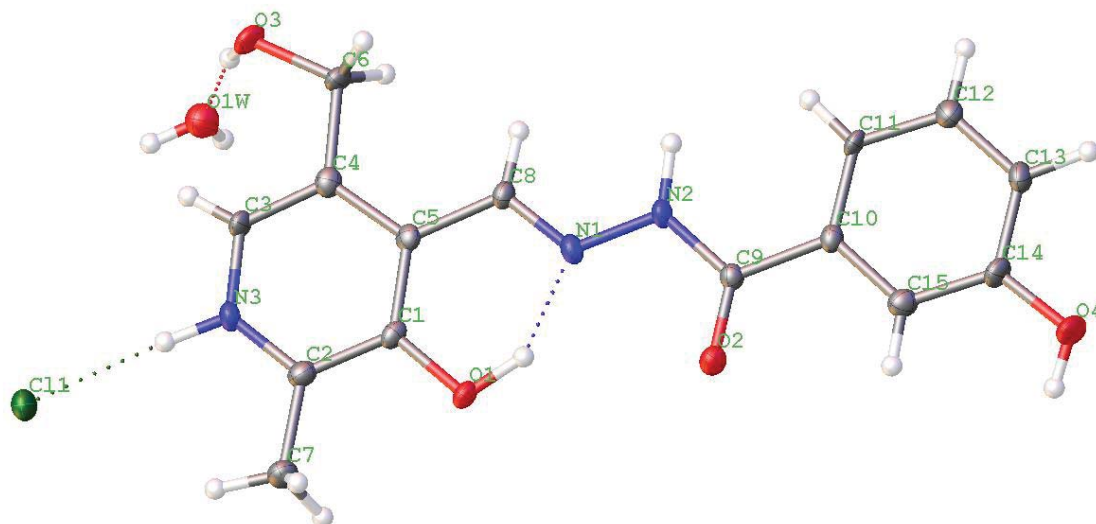


Figura 13. Diagrama ORTEP del compuesto AL2 obtenido mediante del software OLEX2. Los elipsoides térmicos se representan al 50% de probabilidad.

4.1.4. Compuesto AR8.

Los datos analíticos obtenidos para este compuesto permiten confirmar que su estructura coincide con lo propuesto teóricamente. El rendimiento de la reacción de síntesis es del 67%.

Tabla 4. Análisis elemental del compuesto AR8. Se muestran los porcentajes de C, H y N obtenidos experimentalmente y los valores calculados para la estructura molecular propuesta.

Compuesto AR8	C (%)	H (%)	N (%)
Experimental	52.20	4.21	17.28
Teórico AR8·HCl	52.10	4.68	17.36

MS-ESI⁺ (MeOH): Pico de máxima intensidad a m/z (I%) 287.11 (100) correspondiente al catión pseudomolecular [C₁₄H₁₅N₄O₃]⁺. Pico a m/z (I%) 309.10 (15.05) correspondiente al catión pseudomolecular [C₁₄H₁₄N₄NaO₃]⁺.

MS-ESI⁻ (MeOH): Pico de máxima intensidad a m/z (I%) 285.10 (100) correspondiente al anión pseudomolecular [C₁₄H₁₃N₄O₃]⁻. Pico a m/z (I%) 321.08 (24.80) correspondiente al anión pseudomolecular [C₁₄H₁₄ClN₄O₃]⁻.

IR: El espectro infrarrojo del derivado AR8 presenta bandas características a 2981.27, 1684.36, 1613.23 y 1039.10 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones $\nu(\text{N-H})$, $\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=N})$ y $\nu(\text{N-N})$, respectivamente. La señal originada por el enlace C=O carbonílico es indicativa de que la especie en estado sólido se encuentra en su forma cetónica.

Adicionalmente, las bandas situadas entre los 1550 y 1600 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones $\nu(\text{C=N})$ del anillo de piridina. La banda relativamente ancha a 2660.18 cm^{-1} y la intensa a 1258.28 cm^{-1} se corresponden a las tensiones O-H y $\text{C-O}_{\text{enólico}}$ del grupo piridoxal, respectivamente.

RMN: ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6 , ppm) δ 2.65 (3H, s, Ar-CH_3), 4.79 (2H, s, $\text{Ar-CH}_2\text{-OH}$), 7.68 (1H, dd, $J = 8.0, 4.8$ Hz, $5\text{-H}_{\text{Ar-py}}$), 8.24 (1H, s, $6\text{-H}_{\text{Ar-piridoxal}}$), 8.48 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, $4\text{-H}_{\text{Ar-py}}$), 8.86 (1H, t, $J = 3.0$ Hz, $6\text{-H}_{\text{Ar-py}}$), 9.14 (1H, s, $-\text{CH=N}$), 9.24 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, $2\text{-H}_{\text{Ar-py}}$), 13.05 (1H, s, $\text{N-H}_{\text{hidrazona}}$), 13.49 (1H, s, $\text{Ar-CH}_2\text{-OH}$).

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO-d_6 , ppm) δ 14.95 (CH_3 , Ar-CH_3), 58.16 (CH_2 , $\text{Ar-CH}_2\text{-OH}$), 123.98 (CH , $5\text{-C}_{\text{Ar-py}}$), 126.43 (C , $\text{C}_{\text{Ar-CH}_2\text{-OH}}$), 127.58 (C , $\text{C}_{\text{Ar-C=O}}$), 130.05 (CH , $6\text{-C}_{\text{piridoxal}}$), 136.32 (CH , $4\text{-C}_{\text{Ar-py}}$), 136.63 (C , $\text{C}_{\text{Ar-CH=N}}$), 143.71 (C , $\text{C}_{\text{Ar-CH}_3}$), 144.59 (CH , $-\text{CH=N}$), 148.55 (CH , $2\text{-C}_{\text{Ar-py}}$), 152.65 (CH , $6\text{-C}_{\text{Ar-py}}$), 152.83 (C , $\text{C}_{\text{piridoxal-OH}}$), 161.76 (C , C=O).

DRX: La lenta evaporación de las aguas madre resulta en la formación de cristales de color amarillo pálido con forma de aguja aptos para su estudio a través de esta técnica.

El compuesto AR8 presenta una estructura prácticamente plana, con el nitrógeno N3 del grupo piridoxal protonado, enlaces de hidrógeno entre el anión cloruro Cl1 y los grupos O3H, N2H y N3H e interacciones intramoleculares por enlace de hidrógeno entre el hidrógeno O1H y el nitrógeno azometino N1. La especie cristaliza en un sistema monoclinico en el grupo espacial $\text{P2}_1/\text{n}$.

Las interacciones intermoleculares que estabilizan el empaquetamiento cristalino son apilamientos $\pi\text{-}\pi$ entre los anillos aromáticos de piridina y piridoxal. Los datos de refinado estructural se recogen en el apartado "Anexos".

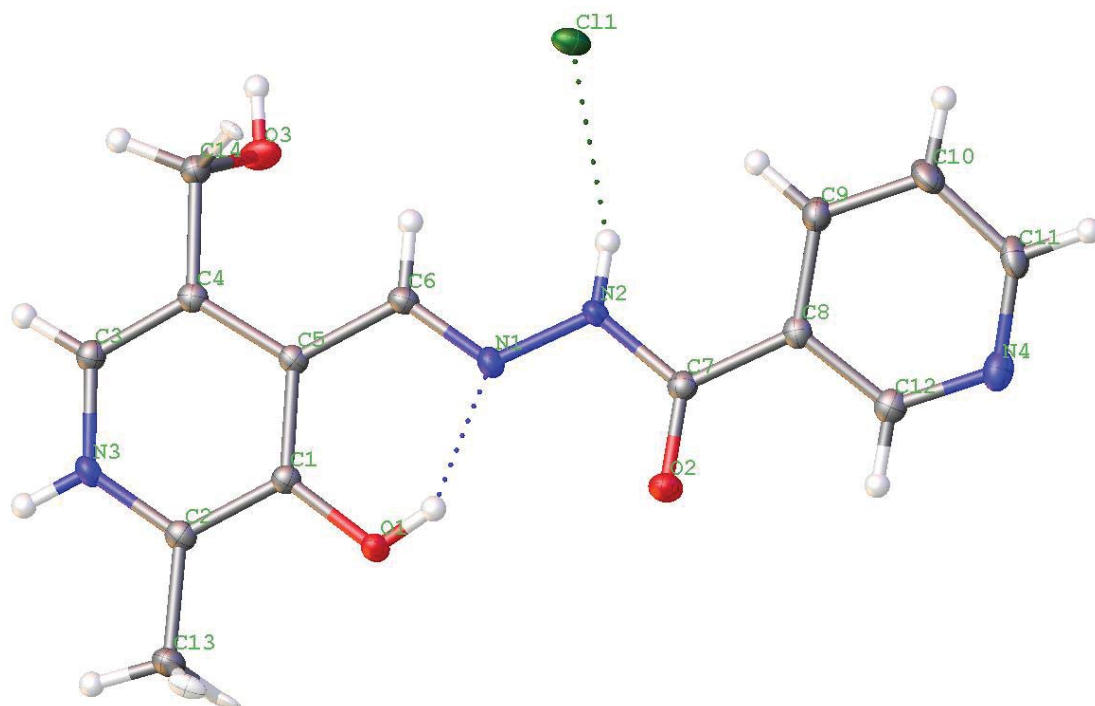


Figura 14. Diagrama ORTEP del compuesto AR8 obtenido mediante del software OLEX2. Los elipsoides térmicos se representan al 50% de probabilidad.

4.2. Espectroscopia de absorción y emisión UV-Vis.

4.2.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.

Los espectros de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) de los cuatro derivados de hidrazona sintetizados en el presente trabajo muestran diferencias significativas entre las especies en disolución y las moléculas empaquetadas en estado sólido. Estas diferencias pueden atribuirse a las interacciones intermoleculares, mayormente de tipo apilamiento π - π , que aparecen en la red cristalina. Así, el color y los espectros de absorción en el estado sólido no dependen solo de la estructura electrónica de la molécula individual, sino también de sus interacciones intermoleculares con las moléculas adyacentes.⁶⁷

4.2.1.1. Compuestos en disolución.

Los espectros de absorción de los compuestos H1, H2, AL2 y AR8 en disolución se recogen para el intervalo de longitudes de onda 250-750 nm, empleando metanol como disolvente (Figura 15). En estas condiciones, las bandas de absorción aparecen siempre por debajo de los 450 nm, siendo la absorbancia prácticamente nula a longitudes de onda superiores a 500 nm. Para mejorar la visualización de los picos obtenidos se divide

la absorción en tres regiones: 275-330 nm (violeta), 330-380 nm (naranja) y 380-450 nm (azul) (Figura 15). Los derivados de hidrazona H2 (línea roja), AL2 (línea verde) y AR8 (línea azul) presentan sus máximos de absorción en la región de menor longitud de onda, 275-330 nm (violeta), con hombros intensos en la zona de 330-380 nm (naranja) y hombros de menor intensidad en la zona de 380-450 nm (azul). En el caso del derivado H1 (línea negra), su espectro muestra un único y ancho máximo de absorción a 335 nm (región naranja), con hombros en las regiones de 275-330 nm (violeta) y 380-450 nm (azul).

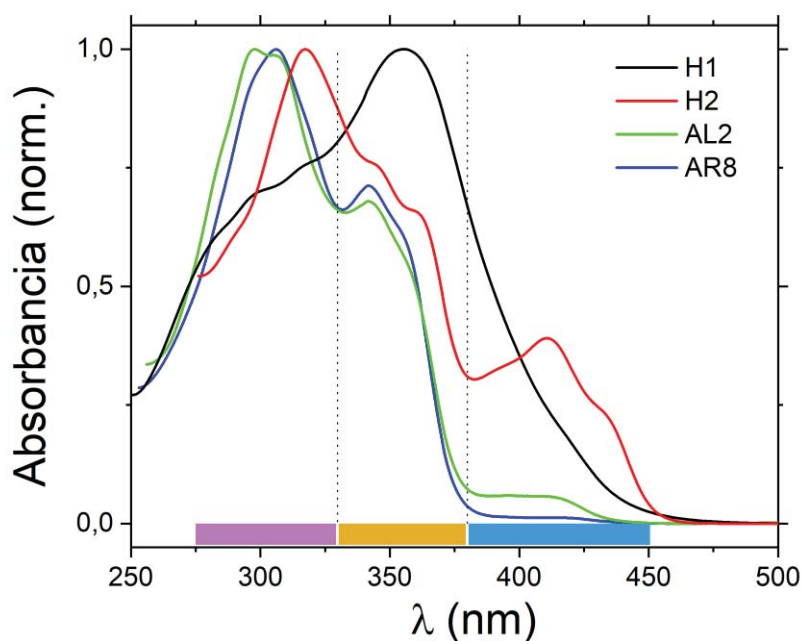


Figura 15. Espectros de absorción UV-Vis de las especies H1, H2, AL2 y AR8 en disolución de MeOH. Los datos normalizados se representan hasta $\lambda = 500$ nm debido a la ausencia de señales de absorbancia a longitudes de onda superiores.

La correcta asignación de las transiciones electrónicas asociadas a cada una de estas bandas de absorción requiere cálculos computacionales adicionales por el método DFT (Density Functional Theory), lo que se encuentra fuera de los objetivos fijados para el presente trabajo. Esta metodología describe los distintos estados excitados de una especie en términos de todas las posibles transiciones electrónicas desde orbitales ocupados hasta orbitales vacíos.⁶⁸ No obstante, las asignaciones reportadas en investigaciones con moléculas similares permiten realizar una interpretación aproximada de las estructuras electrónicas. Así, las bandas de absorción a mayores longitudes de onda pueden atribuirse a la transición $n \rightarrow \sigma^*$ o $\pi \rightarrow \pi^*$ del nitrógeno en

el grupo azometino C=N, mientras que las bandas que aparecen a longitudes de onda menores se corresponden con la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del grupo C=O hidrazida.⁶⁹⁻⁷¹

Por otra parte, los desplazamientos observados en los máximos de absorbancia de las especies sintetizadas pueden tener su explicación a nivel estructural y electrónico, en función de los distintos sustituyentes que posee la parte hidrazida de la molécula. Así, por ejemplo, la extensión del sistema π -conjugado o la introducción de grupos dadores de electrones tiende a inducir un “corrimiento al rojo” de los espectros de absorción.³⁴

4.2.1.2. Compuestos en estado sólido.

Los espectros de absorción en estado sólido se recogen para el intervalo de longitudes de onda entre 200 y 800 nm (Figura 16). Todos estos espectros tienen un perfil relativamente similar, mostrando una gran absorbancia a longitudes de onda inferiores a un determinado valor (dependiente de cada compuesto) y una amplia zona (región visible) en la que apenas se registra absorción. El espectro del compuesto H1 presenta el borde de absorbancia en torno a 550 nm, el de H2 en torno a 450 nm y los de AL2 y AR8 en torno a 410 nm (Figura 16). Así, la representación conjunta de los distintos espectros revela cómo estos bordes de absorción son prácticamente idénticos para las especies AL2 y AR8, al tiempo que aparecen desplazados hacia longitudes de onda mayores en los espectros de H1 y H2, siendo el de H1 el que muestra un efecto batocrómico más acusado.

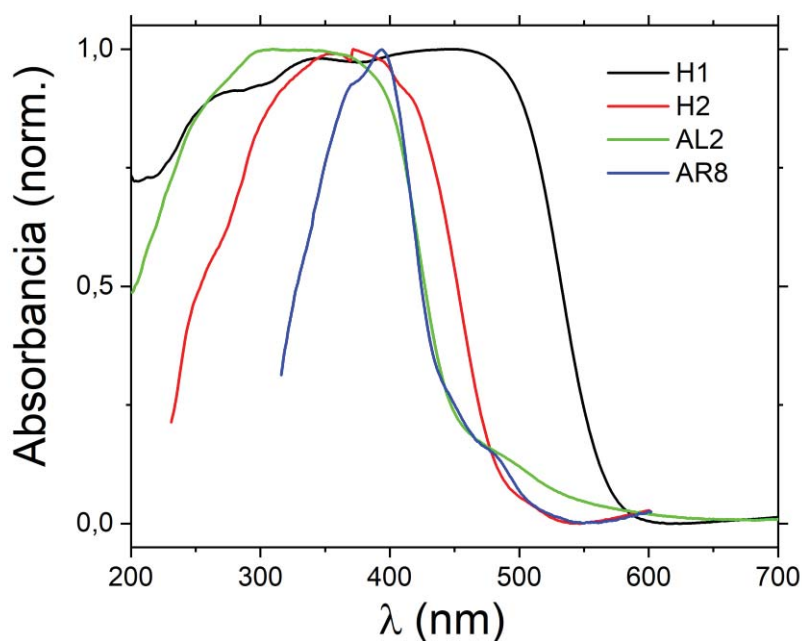


Figura 16. Espectros de absorción UV-Vis de las especies H1, H2, AL2, y AR8 en estado sólido. Los datos normalizados se representan en el intervalo de 200 a 700 nm.

Además, los resultados de absorbancia obtenidos se corresponden con la progresión de color que se puede apreciar a simple vista (Figura 17) y que va desde un amarillo pálido para AL2 y AR8, hasta un naranja para H1, pasando por amarillo para H2.

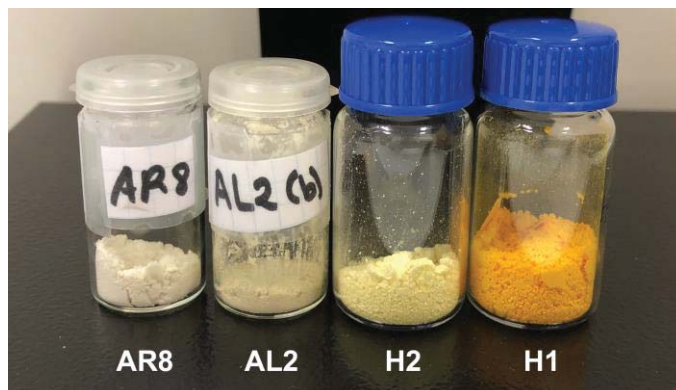


Figura 17. Fotografía de los compuestos sólidos H1, H2, AL2 y AR8 tomada en el laboratorio bajo condiciones de luz natural y temperatura ambiente.

El estudio comparativo entre los espectros de absorción en estado sólido y en disolución denota una importante diferencia. Mientras que estos últimos presentan varios máximos, resultado de los diferentes tránsitos electrónicos entre niveles energéticos discretos, los espectros de las especies en estado agregado no muestran absorción hasta una determinada longitud de onda, a partir de la cual la absorbancia aumenta bruscamente. Esto es propio de una estructura electrónica formada por dos bandas de orbitales separadas por una diferencia o *gap* de energía, lo que se traduce en el característico borde de absorbancia continuo que aparecen en todas las especies analizadas.

Seguidamente, a modo de ejemplo, se muestran los espectros UV-Vis obtenidos para H1 en metanol y estado sólido (Figura 18). Se puede observar cómo el perfil en estado sólido muestra un marcado efecto batocrómico ($\Delta\lambda_{m\acute{a}x} \sim 150$ nm) y ensanchamiento en comparación con la disolución, al tiempo que la resolución es mucho menor. Esta diferencia en la longitud de onda a la que se sitúa el máximo de las bandas de menor energía es indicativo de interacciones intermoleculares que modifican los niveles energéticos HOMO-LUMO de la especie molecular, así como de la formación de bandas electrónicas en la fase cristalina. Estos rasgos son comunes a todos los compuestos del grupo hidrazida-hidrazona que se han estudiado.

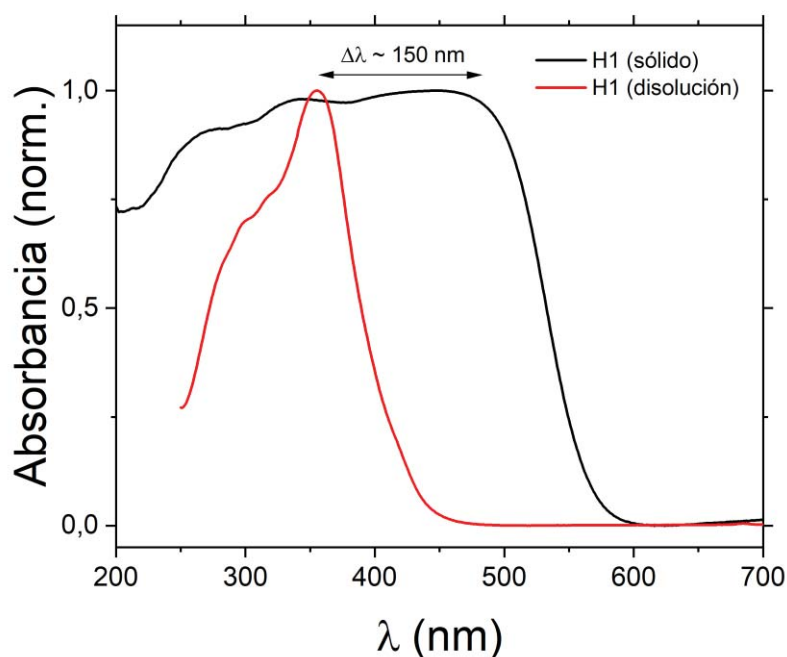


Figura 18. Representación comparativa de los espectros de absorción UV-Vis del compuesto H1 en estado sólido (negro) y disolución (rojo). El espectro en estado sólido muestra un marcado “corrimiento al rojo” de su perfil de absorbancia.

4.2.1.3. Determinación de los *gaps* energéticos.

En la Tabla 5 se recogen los valores de los *gaps* energéticos para los compuestos H1, H2, AL2 y AR8 en estado sólido y disolución. Los datos se extraen directamente a través del software *Spectra Manager™* de JASCO, siendo los espectros con bordes de absorbancia continuos los que permiten una identificación más sencilla (Figura 19). Como era de esperar, el valor de los *gaps* de energía mantiene una relación de proporcionalidad inversa con la longitud de onda a la que aparece el máximo de las primeras bandas de absorción. En disolución, estas energías crecen en el orden: H2 < H1 < AL2 < AR8. Sin embargo, en estado sólido, este orden es diferente: H1 < H2 < AR8 < AL2, consecuencia del ensanchamiento y efecto batocrómico anteriormente mencionados.

Tabla 5. Valores experimentales de los *gaps* energético (E_g) en estado sólido y disolución para los distintos compuestos sintetizados.

Compuesto	E_g (eV) sólido	E_g (eV) disolución
H1	2.31	2.88
H2	2.68	2.79
AL2	2.88	3.33
AR8	2.74	3.33

Por tanto, de forma genérica, se puede concluir que la agregación de las moléculas conduce a una reducción de la energía entre los orbitales HOMO y LUMO, indicativo del importante papel que tienen el empaquetamiento y las interacciones intermoleculares en el *gap* energético de los compuestos.

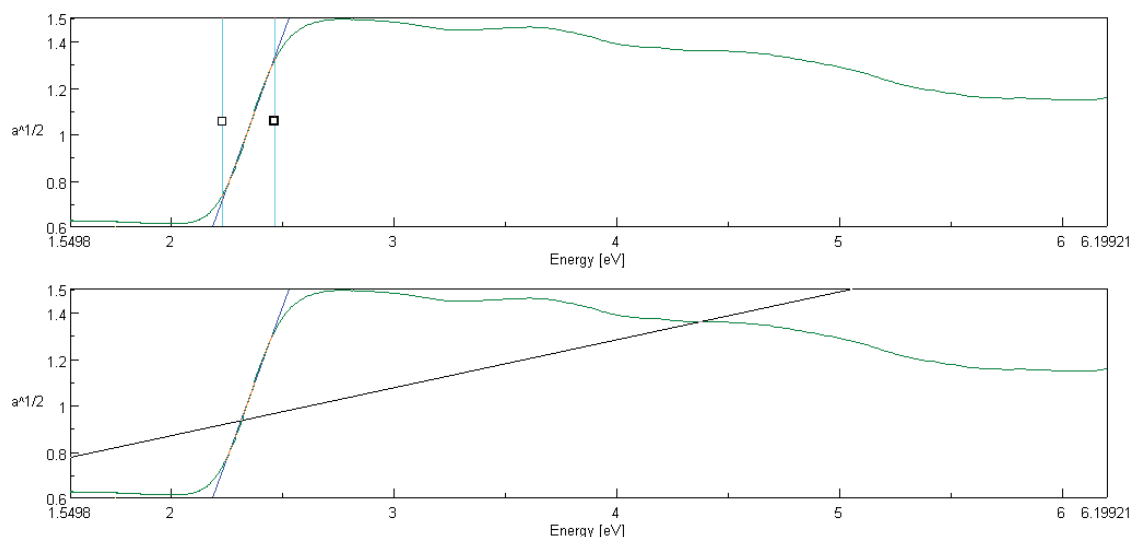


Figura 19. Método de determinación del valor de E_g del compuesto H1 en estado sólido a partir del diagrama de Tauc. La representación se realiza con el software *Spectra Manager™* de JASCO suponiendo transiciones electrónicas indirectas ($\gamma = 2$).

4.2.2. Espectroscopia de fluorescencia UV-Vis.

Se estudian los espectros de emisión y excitación correspondientes a las distintas especies sintetizadas tanto en disolución de metanol como en estado sólido.

4.2.2.1. Compuestos en disolución.

La representación normalizada de los espectros de fluorescencia de toda la serie de moléculas estudiadas en disolución para una misma longitud de onda de excitación ($\lambda_E = 390$ nm), demuestra la importancia que tienen los distintos sustituyentes en la posición a la que aparecen las bandas de emisión (Figura 20). Así, de forma genérica, el aumento del grado de conjugación o la presencia de sustituyentes dadores de electrones tienden a incrementar el rendimiento cuántico de fluorescencia e inducir un desplazamiento batocrómico del máximo de emisión. Contrariamente, los grupos aceptores de electrones o la existencia de heteroátomos en el sistema π -conjugado provocan que las transiciones electrónicas de menor energía sean de tipo $n \rightarrow \pi^*$, favoreciendo mecanismos de relajación no radiantes. No obstante, estos átomos heterocíclicos pueden formar enlaces de hidrógeno con disolvente próticos, lo que

desestabiliza energéticamente el estado $n \rightarrow \pi^*$ y aumenta la intensidad de fluorescencia.

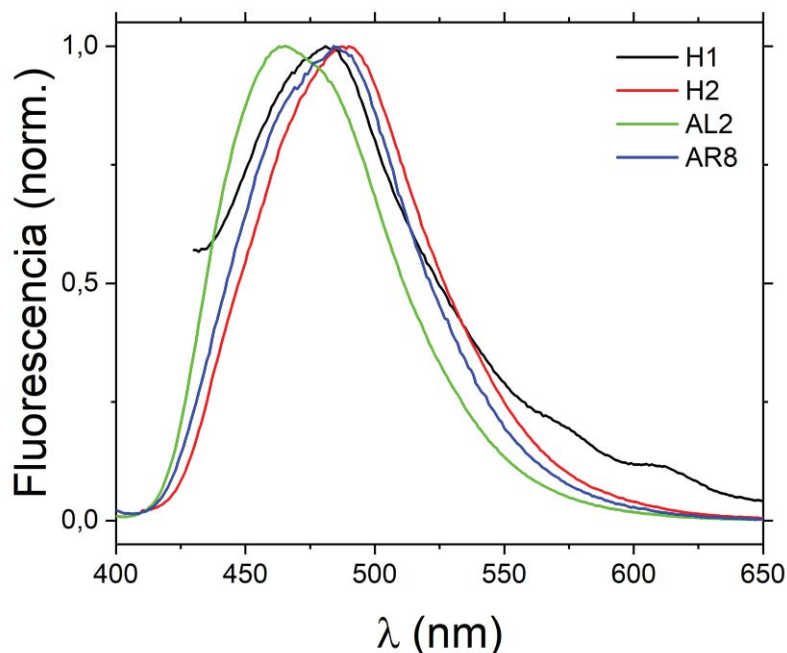


Figura 20. Espectros de emisión de las cuatro especies sintetizadas en disolución recogidos para el mismo valor de longitud de onda de excitación ($\lambda_E = 390$ nm). El máximo de la banda de fluorescencia varía en función de los distintos sustituyentes que presenta la parte hidracida del compuesto.

Al igual que en los estudios de absorción UV-Vis, la asignación de las transiciones electrónicas de fluorescencia, la localización de la densidad electrónica de los orbitales HOMO y LUMO o la optimización de la geometría del estado excitado requiere cálculos computacionales por los métodos DFT y TDDFT (Time-Dependent Density Functional Theory) que exceden los objetivos de este trabajo.

En cuanto a los espectros de emisión en disolución realizados a diferentes longitudes de onda de excitación, todos los compuestos presentan un comportamiento peculiar: la intensidad y posición del máximo de emisión de fluorescencia cambia en función de la longitud de onda λ_E a la que se excita la molécula. A modo de ejemplo, se muestran los espectros obtenidos para el derivado H2 (Figura 21), pudiendo observarse las siguientes regiones:

- $300 < \lambda_E$ (nm) < 360 . La forma del espectro de emisión y la posición de su máximo son independientes de la longitud de onda de excitación. A medida que aumenta λ_E se observa un incremento en la intensidad de la fluorescencia.

- $370 < \lambda_E$ (nm) < 400 . La forma del espectro de emisión y la posición de su máximo dependen de la longitud de onda de excitación. A medida que aumenta λ_E se observa un incremento en la intensidad de la fluorescencia y el máximo se desplaza hacia menores longitudes de onda (efecto hipsocrómico).
- $400 < \lambda_E$ (nm) < 420 . La forma del espectro de emisión y la posición de su máximo son independientes de la longitud de onda de excitación. A medida que aumenta λ_E se observa una disminución en la intensidad de la fluorescencia.

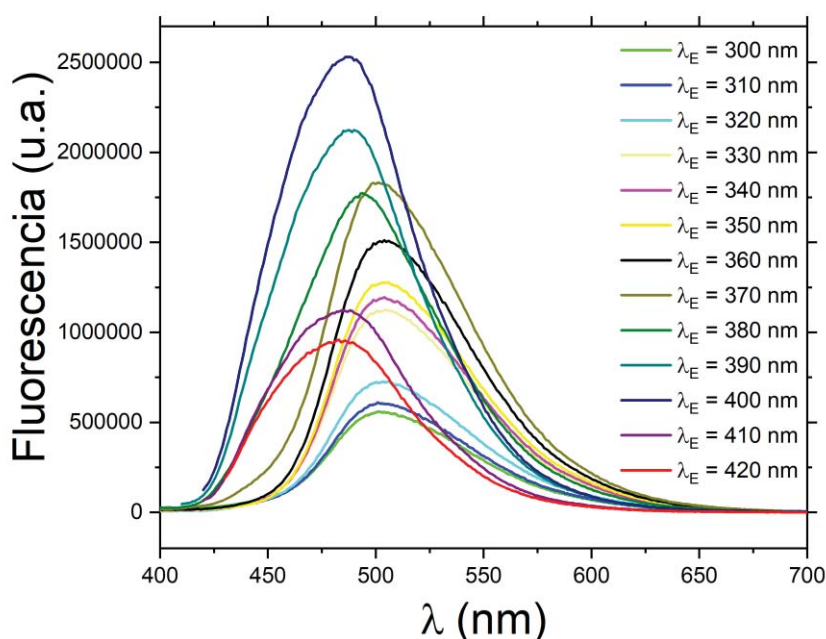


Figura 21. Espectros de emisión del compuesto H2 en disolución recogidos a distintos valores de longitud de onda de excitación (λ_E). Los máximos de fluorescencia en torno a 505 nm ($\lambda_E < 370$ nm) se corresponden con la emisión del excímero, mientras que los máximos en torno a 485 nm ($\lambda_E > 370$ nm) son propios del monómero.

Para obtener más información, se realizan espectros de excitación de las distintas especies sintetizadas. Las muestras se excitan a $200 < \lambda_E$ (nm) < 450 y las longitudes de onda de emisión se registran para 460 y 500 nm (aproximadamente los máximos de fluorescencia). En la Figura 22 se recogen los espectros de excitación y emisión para el compuesto H2. Como puede observarse, la emisión a menores longitudes de onda aparece cuando la molécula se excita a $370 < \lambda_E$ (nm) < 420 , mientras que la emisión a mayores longitudes de onda se obtiene cuando la molécula se excita a $\lambda_E < 370$ nm.

Una posible explicación para este comportamiento es la formación de especies diméricas en el estado excitado conocidas como excímeros. Los excímeros son el resultado de la asociación entre una molécula electrónicamente excitada y una molécula

idéntica no excitada.⁷² Esta reacción está controlada por difusión y sus efectos fotofísicos se observan principalmente a concentraciones elevadas, a las cuales se pueden originar suficientes colisiones moleculares durante el tiempo de vida media del estado excitado. Por otra parte, la banda de emisión correspondiente al excímero aparece a longitudes de onda superiores en comparación con la del monómero. Esta banda suele ser más ancha y carente de estructura vibrónica debido a la naturaleza disociativa de la emisión del excímero.^{32,73}

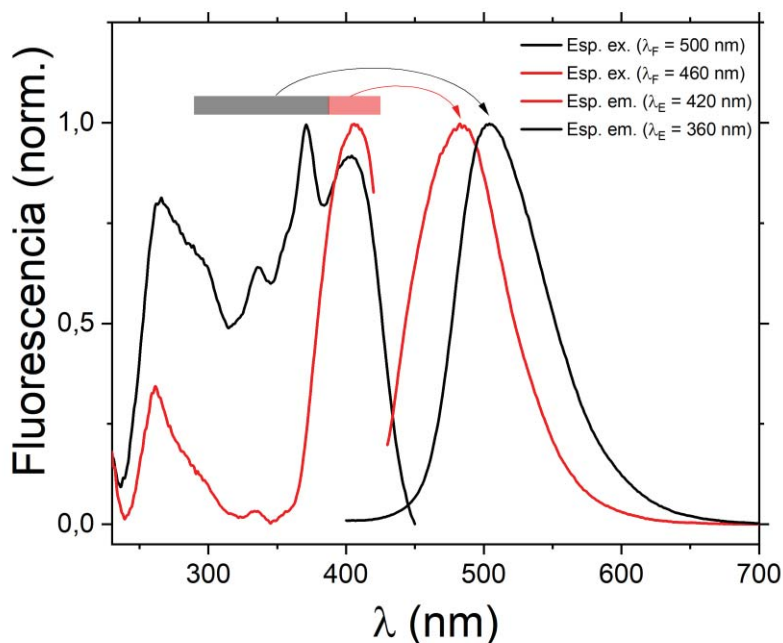


Figura 22. Representación conjunta de los espectros de excitación ($\lambda_F = 500$ y 460 nm) y emisión ($\lambda_E = 420$ y 360 nm) del compuesto H2 en disolución de MeOH. Se ilustra de forma esquemática cómo la excitación por debajo de 370 nm origina la banda de fluorescencia de menor energía (excímero), mientras que la excitación por encima de los 370 nm resulta en la emisión fluorescente de mayor energía (monómero).

Adicionalmente, la superposición de los espectros normalizados de absorbancia y emisión fluorescente de los compuestos permite representar el ya mencionado desplazamiento de Stokes (Figura 23). Esta diferencia entre el máximo de la primera banda de absorción y el máximo de la banda de fluorescencia se debe a la pérdida de energía de la molécula en el estado excitado por relajación vibracional. El valor de desplazamiento de Stokes para los derivados de hidrazona H1, H2, AL2 y AR8 es 126 , 75 , 63 y 145 nm, respectivamente. Como era de esperar, la emisión fluorescente aparece en todos los casos a mayores longitudes de onda que la absorbancia.

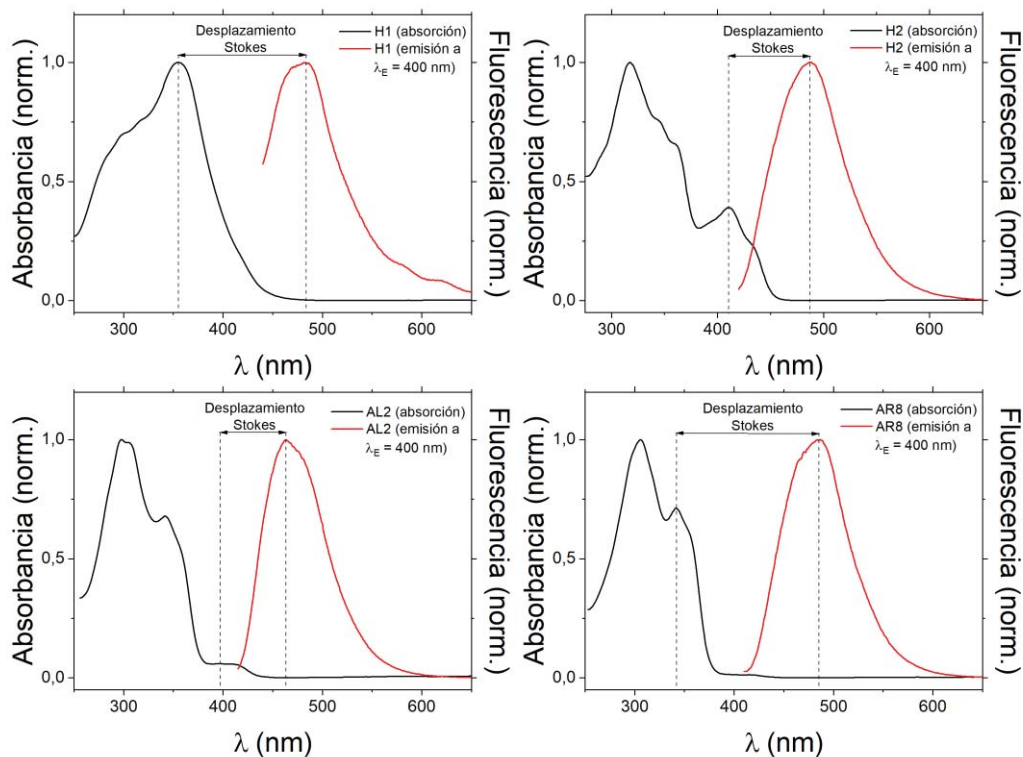


Figura 23. Representación conjunta de los espectros de absorción UV-Vis y emisión fluorescente ($\lambda_E = 400 \text{ nm}$) obtenidos para los distintos compuestos estudiados. La separación entre el máximo de emisión y el máximo de la primera absorción corresponde al desplazamiento de Stokes de la molécula.

Un último estudio comparativo entre los espectros de absorbancia y excitación de la serie de moléculas analizada permite identificar de forma visual aquellas transiciones electrónicas, resultado de la absorción de fotones de luz, que son capaces de originar una emisión fluorescente con el regreso al estado fundamental (Figura 24). Se observa una gran diferencia entre los tránsitos electrónicos de absorción y aquellos que son emisivos. Esto es habitual ya que no todos los electrones excitados retornan al estado fundamental con emisión de luz visible.

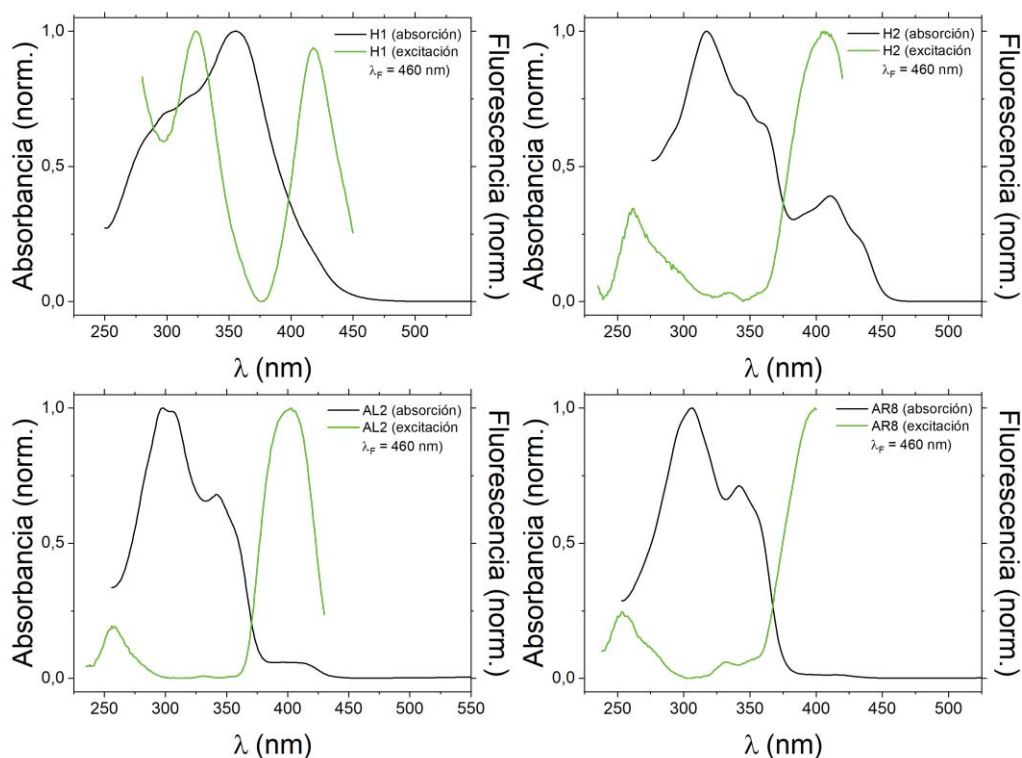


Figura 24. Representación conjunta de los espectros de absorción UV-Vis y excitación ($\lambda_F = 460$ nm) obtenidos para los distintos compuestos estudiados. Aquellas bandas de absorbanca que coinciden en posición con una banda de excitación se corresponden con las transiciones electrónicas capaces de causar fluorescencia.

4.2.2.2. Compuestos en estado sólido.

Pese a que la mayoría de propiedades fotofísicas de especies moleculares, entre las que se incluyen los espectros de emisión y absorción, suelen determinarse en condiciones de disolución diluida, es interesante el estudio comparativo con el estado sólido para analizar y comprender mejor los fenómenos de ACQ y AIE. Además, los fluoróforos en estado sólido presentan muchas aplicaciones tecnológicas, especialmente optoelectrónicas (desarrollo de OLEDs) y biológicas (sondas luminiscentes).

Previamente a la realización de los experimentos de fotoluminiscencia, se comprueba de forma orientativa la emisión de las especies bajo una lámpara UV (365 nm). Los sólidos AL2 y AR8 presentan una intensa fluorescencia, mientras que los compuestos H1 y H2 no presentan una emisión en estado sólido que se pueda detectar a simple vista (Figura 25). La exhibición de emisión fluorescente tanto en disolución como en estado cristalino no es una característica muy frecuente ya que, como se comenta en el apartado "Introducción", las especies altamente fluorogénicas en disolución suelen

convertirse en no emisivs en estado sólido como consecuencia de las interacciones intermoleculares.

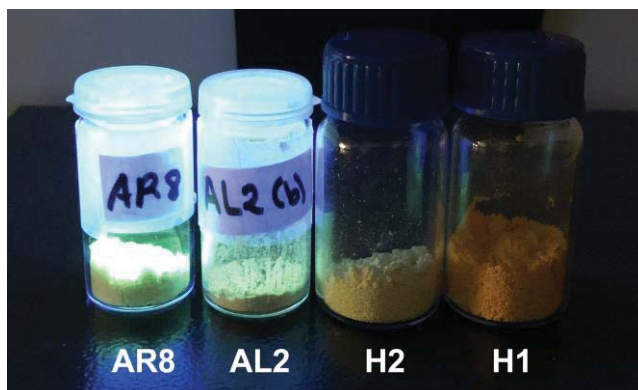


Figura 25. Fotografía de los compuestos sólidos H1, H2, AL2 y AR8 tomada en el laboratorio bajo condiciones de temperatura ambiente e iluminación con lámpara ultravioleta. Se observa una clara diferencia entre las especies no emisivs, H1 y H2, y las especies con fluorescencia, AL2 y AR8, siendo esta última la que presenta una emisión verde-azulada más intensa.

A continuación, se recogen los espectros de emisión fluorescente de los compuestos AL2 y AR8 en estado sólido realizados a longitudes de onda λ_F entre 400 y 750 nm (Figura 26). A diferencia de lo que se aprecia en sus homólogos en disolución diluida, ninguno de estos espectros muestra una dependencia de la posición de las bandas de emisión en función de la longitud de onda a la que se excita la molécula. Se observa un incremento en la intensidad de la fluorescencia a medida que λ_E aumenta hasta los 370 nm, valor a partir del cual la intensidad disminuye.

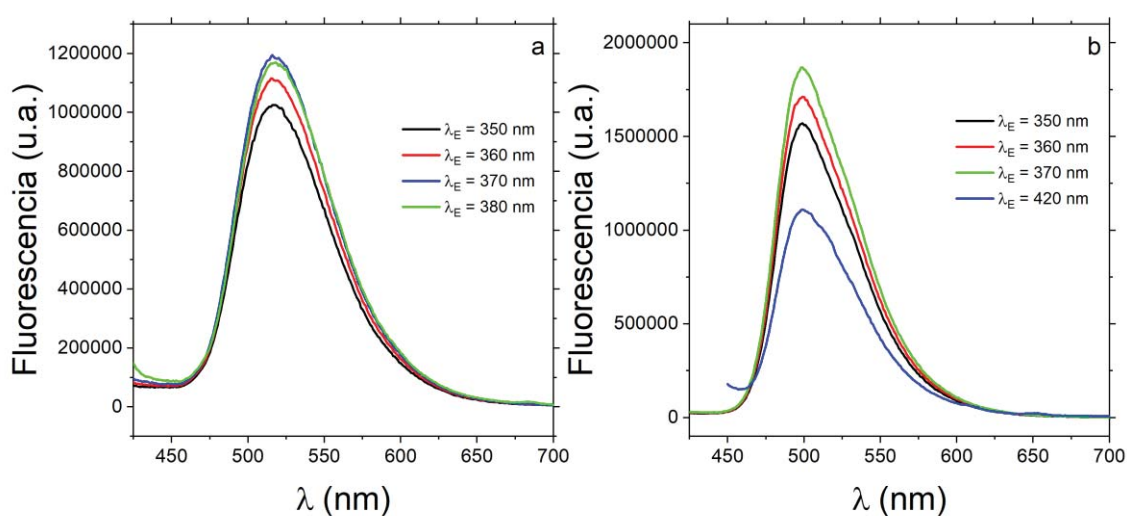


Figura 26. Espectros de emisión del compuesto (a) AL2 y (b) AR8 en estado sólido a distintos valores de longitud de onda de excitación (λ_E). Todos los máximos de fluorescencia se encuentran a valores prácticamente idénticos de λ_F independientemente del valor de λ_E empleado.

La fluorescencia observada en todas las especies emisivas es de color verde-azulado. No obstante, para conocer con mayor exactitud el color de las distintas emisiones se realiza un tratamiento de los datos de fluorescencia con el software *ColorCalculator* de OSRAM (resultados recogidos en el Anexo 7.6).

Al igual que en disolución, la superposición de los espectros normalizados de absorbancia y emisión permite obtener el desplazamiento de Stokes de los compuestos fluorescentes en estado sólido (Figura 27). El valor de desplazamiento de Stokes para los derivados de hidrazona AL2 y AR8 es 143 y 105 nm, respectivamente. De nuevo, como era de esperar, el máximo de la banda de fluorescencia aparece a longitudes de onda superiores al máximo de absorción.

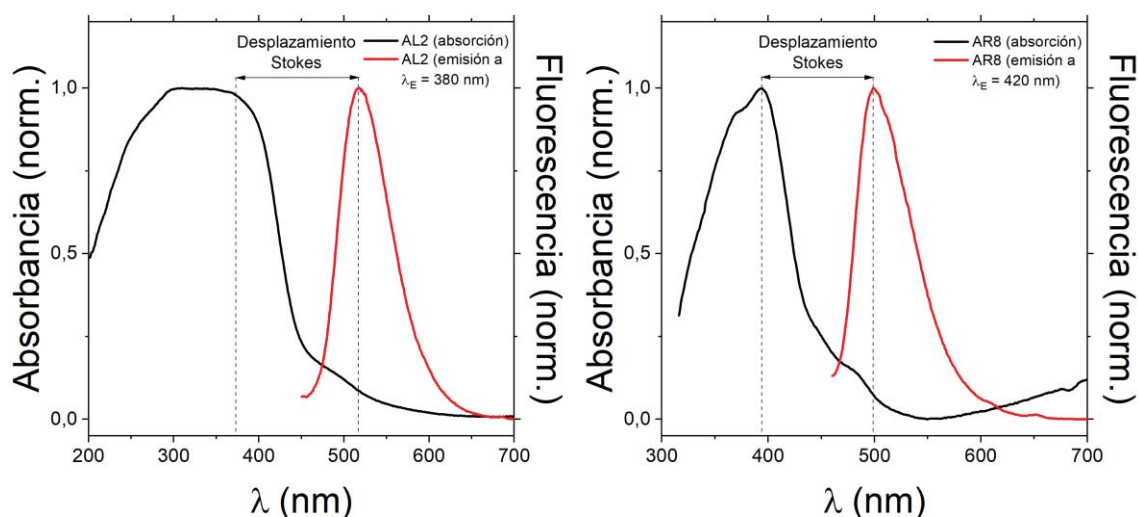


Figura 27. Representación conjunta de los espectros de absorción UV-Vis y emisión fluorescente obtenidos para los compuestos AL2 ($\lambda_E = 380$ nm) y AR8 ($\lambda_E = 420$ nm). La separación entre el máximo de emisión y el máximo de la primera absorción corresponde al desplazamiento de Stokes de la molécula.

Por último, el estudio comparativo entre los espectros de emisión fluorescente obtenidos para las especies AL2 y AR8 en metanol y estado sólido (Figura 28), muestra cómo la banda emisión en estado sólido presenta un ligero efecto batocrómico en comparación con la disolución. Esto es debido a que la agregación de las especies, con el consiguiente incremento de las interacciones intermoleculares, reduce la diferencia de energía entre los niveles HOMO y LUMO, resultando en un desplazamiento del máximo de fluorescencia hacia regiones de mayor longitud de onda.

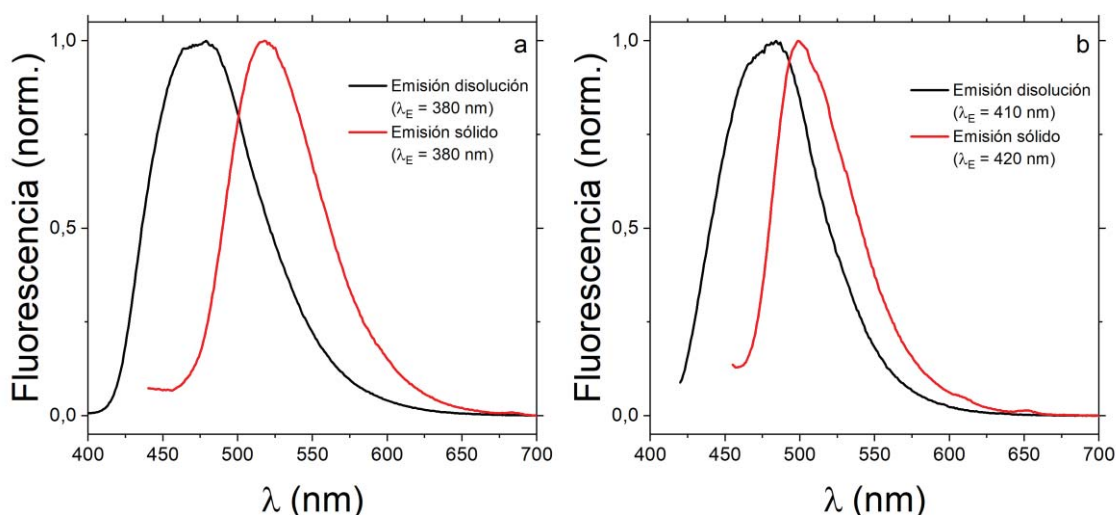


Figura 28. Representación comparativa de los espectros de fluorescencia en disolución y estado sólido del compuesto (a) AL2 y (b) AR8. El máximo de la banda de emisión aparece en ambos casos a longitudes ligeramente superiores para las especies es fase cristalina.

4.3. Estudios de interacción con el ADN.

4.3.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.

A continuación se evalúan los cambios observados en las propiedades de absorción de la especie AR8 tras la adición de cantidades crecientes de ctADN. La constante de unión (K_b) y energía libre de Gibbs (ΔG) del proceso de interacción se calculan utilizando las ecuaciones (4) y (5), respectivamente.

El espectro de absorción de AR8 presenta dos máximos situados a 292 y 382 nm (Figura 29). A medida que aumenta la concentración de ADN en el medio, la absorbancia de la banda en torno a 292 nm disminuye gradualmente, resultando en un efecto hipocrómico. Por otra parte, también se observa un sutil desplazamiento batocrómico de 4 nm en el máximo de absorción, desde 292 nm hasta 296 nm. Ambos efectos son inapreciables en la banda que se encuentra en torno a los 382 nm.

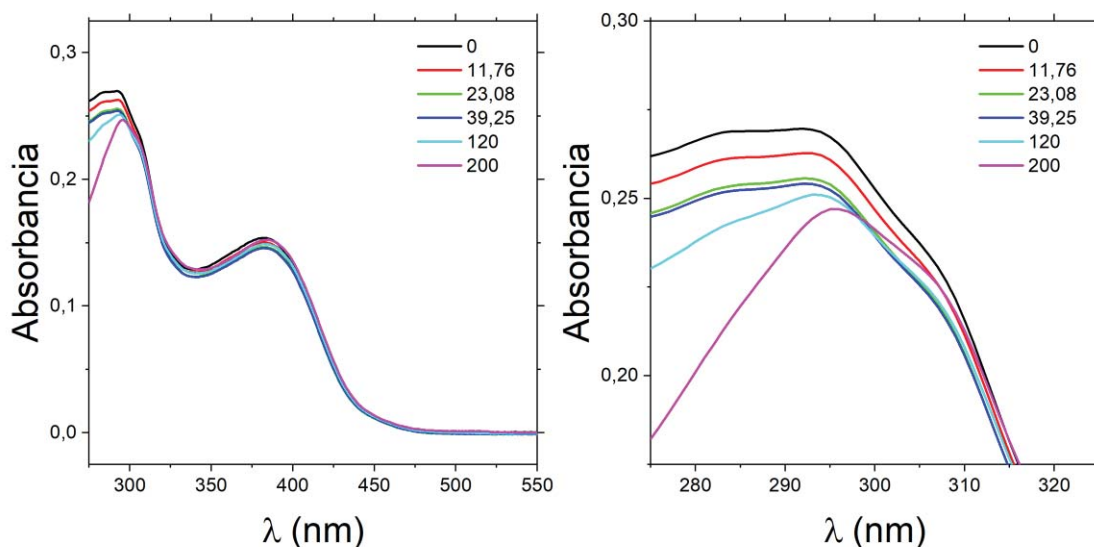


Figura 29. Espectros de absorción UV-Vis del compuesto AR8 (20 μM) a distintas concentraciones de ctADN.

Como ya se ha señalado anteriormente, la aparición de efectos hipocrómico y batocrómico suele ser indicativo de unión por intercalación entre los pares de bases del ADN como resultado de interacciones de apilamiento π - π . Sin embargo, un “corrimiento al rojo” de la $\lambda_{m\acute{a}x}$ tan pequeño como el observado en el presente caso está más acorde con mecanismos de unión al surco, por lo que es posible que se produzca este tipo de interacción o una combinación de ambas.^{30,66,74} Los valores de K_b obtenidos respaldan esta hipótesis.

Los resultados de absorbancia recogidos a $\lambda = 295 \text{ nm}$ son utilizados para representar la recta $[\text{ADN}] / (\varepsilon_A - \varepsilon_f)$ frente $[\text{ADN}]$, de acuerdo con la ecuación (4) (Figura 30). La constante de unión K_b para el compuesto AR8 resulta ser $4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, inferior a las reportadas para intercaladores clásicos como el bromuro de etidio o el $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DPPZ}]^{2+}$, cuyas constantes son del orden de 10^6 – 10^7 M^{-1} . El valor de K_b obtenido es comparable al observado en la literatura para compuestos que interaccionan con el ADN mediante unión a los surcos.^{66,74,75}

A mayores, se calcula la energía libre de Gibbs (ΔG) según la ecuación (5). El valor de la energía libre ($\Delta G = -26.56 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) es negativo, lo que indica que la interacción entre AR8 y el ctADN es espontánea.

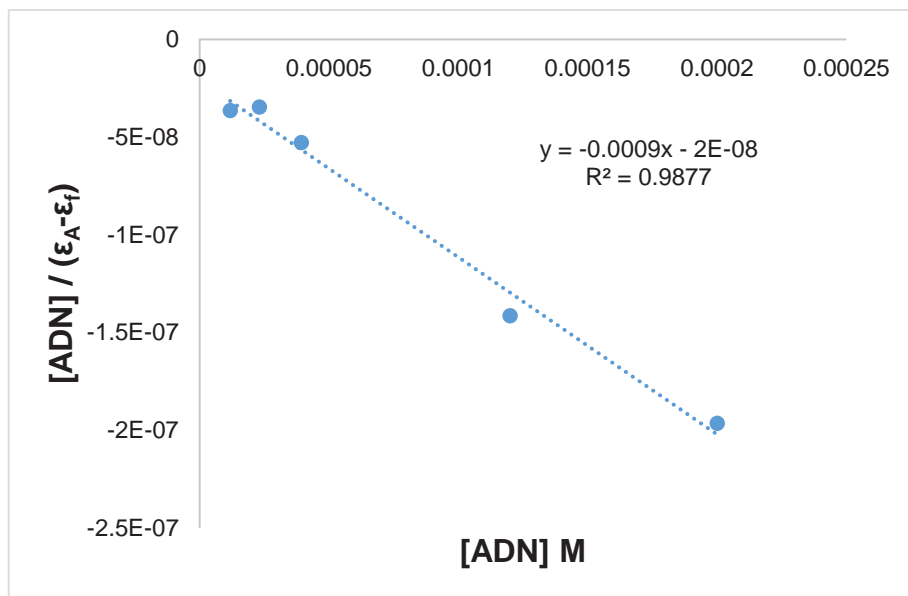


Figura 30. Ajuste lineal de los valores de absorbancia obtenidos para el derivado AR8 ($\lambda = 295$ nm) a la ecuación (4).

4.3.2. Espectroscopia de fluorescencia UV-Vis.

Se analizan las variaciones observadas en las propiedades fluorescentes de la especie AR8 a distintas concentraciones de ctADN, con la intención de determinar el modo de unión de este compuesto. Las constantes de unión (K_b) y constante de “quenching” (K_{SV}) se calculan usando las ecuaciones (6) y (7), respectivamente.

El espectro de fluorescencia de AR8 (Figura 31) excitado a 400 nm, en un rango de 430 a 600 nm, presenta un máximo de emisión a 483 nm. Como puede observarse, el aumento sucesivo de la concentración de ADN en el medio resulta en una disminución de la intensidad de la emisión en el máximo. Esto permite confirmar que la unión entre AR8 y ctADN efectivamente existe y concuerda con el “quencheo” de la fluorescencia reportado para moléculas que interaccionan de forma no covalente con el ADN.³⁰ No obstante, la desactivación fluorescente en este caso es relativamente pequeña en comparación con la registrada en otros estudios de interacción fármaco-ADN mediante espectrofluorimetría.^{62,65,76}

Este descenso reducido de la emisión, junto con el ruido que presentan los espectros obtenidos, dificulta el cálculo fiable de las constantes K_b y K_{SV} . En consecuencia, los valores que se muestran a continuación deben ser considerados como una estimación de los valores reales.

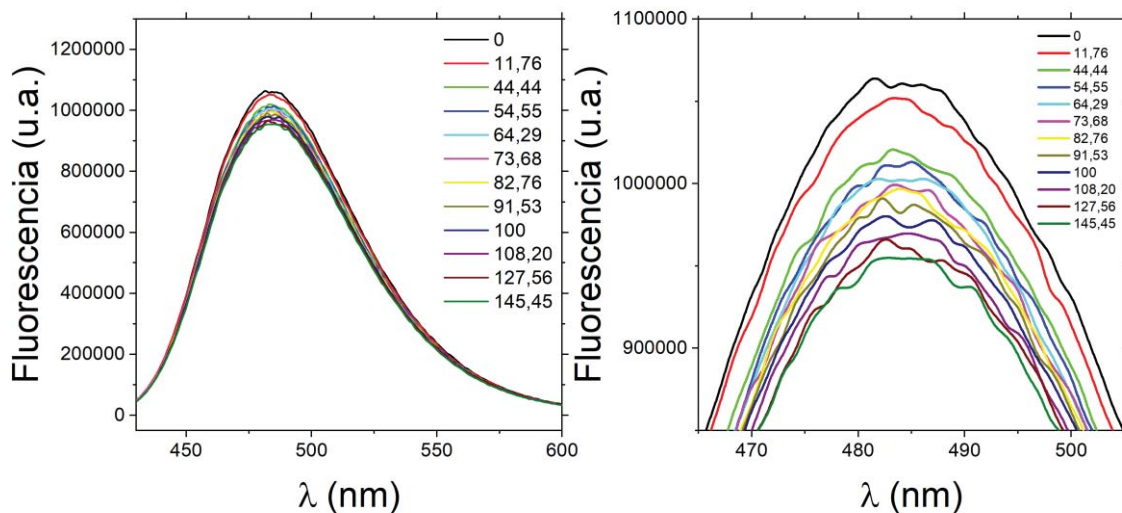


Figura 31. Espectros de fluorescencia del compuesto AR8 (10 μM) a distintas concentraciones de ctADN ($\lambda_E = 400 \text{ nm}$).

Los datos de fluorescencia recogidos a $\lambda_F = 486 \text{ nm}$ son utilizados para representar la recta $\log [(F_0 - F) / F]$ frente $\log [Q]$, de acuerdo con la ecuación (6) (Figura 32). La constante de unión K_b para el compuesto AR8 resulta ser $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, lo que se aproxima al valor obtenido anteriormente por espectroscopia de absorción UV-Vis. Además, el valor de n en torno a la unidad indica una relación molar 1:1 entre compuesto y ADN.

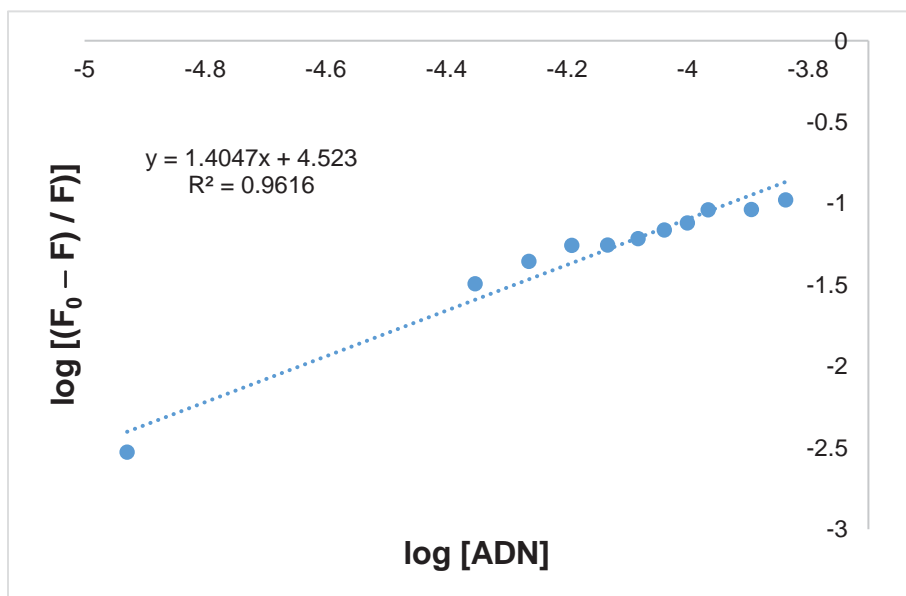


Figura 32. Ajuste lineal de los valores de fluorescencia del derivado AR8 ($\lambda_F = 486 \text{ nm}$) a la ecuación (6).

La constante de “quenching” K_{SV} se determina por regresión lineal de la representación F_0 / F frente $[Q]$, según la ecuación Stern-Volmer (7). La linealidad de la gráfica Stern-Volmer obtenida a partir de los resultados de fluorescencia (Figura 33), sugiere la existencia de un único tipo de “quenching” bajo las condiciones en las que se realiza el experimento. De forma general, los fenómenos de “quenching” se clasifican en dinámico y estático. El “quenching” dinámico se produce cuando el fluoróforo en estado excitado es desactivado por colisión con otra molécula presente en el medio, mientras que el “quenching” estático se origina en el estado fundamental como resultado de la formación de un complejo no emisor entre el compuesto fluorogénico y el “quencher”.⁶⁵ Tanto la constante de “quenching” dinámico como estático son completamente dependientes de la temperatura. El valor de K_{SV} estimado para el compuesto AR8 es 759 M^{-1} .

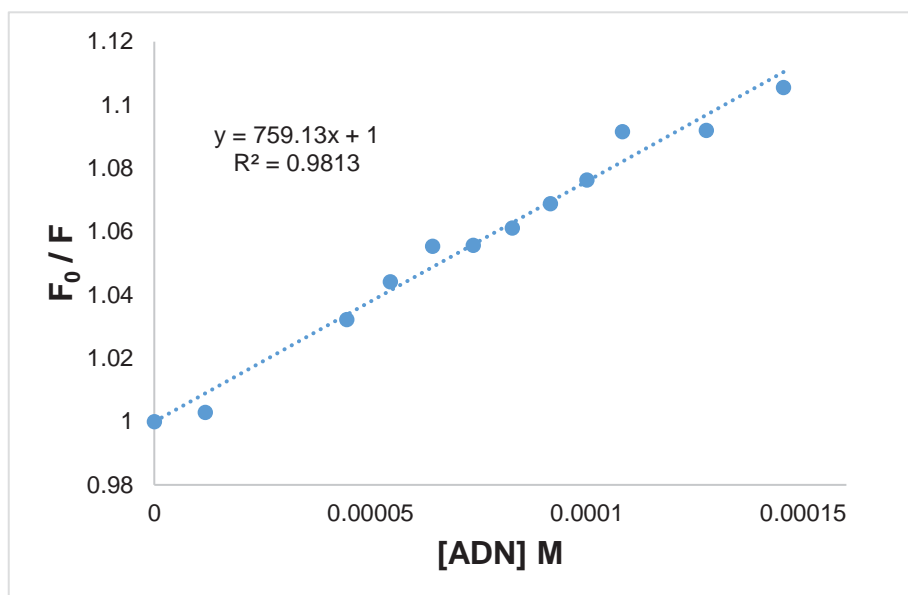


Figura 33. Ajuste de los resultados de fluorescencia del compuesto AR8 ($\lambda_f = 486 \text{ nm}$) a la ecuación Stern-Volmer (7).

5. CONCLUSIONES.

En los últimos años, los derivados hidrazida-hidrazona han despertado gran interés en la química médica al poseer en su estructura un grupo azometino conectado con un grupo carbonilo, lo que les confiere múltiples aplicaciones biológicas y farmacéuticas y los convierte en importantes agentes quelantes para la formación de complejos con metales de transición.

Los resultados extraídos de las distintas técnicas de caracterización efectuadas confirman que la ruta de síntesis escogida resulta adecuada para la obtención de compuestos hidrazida-hidrazona derivados de piridoxal.

Las propiedades ópticas y fotofísicas de los compuestos en disolución y estado sólido se estudian por espectroscopia UV-Vis y espectroscopia de fluorescencia. La posición de los máximos de absorción está fuertemente influenciada por la estructura química de la parte hidrazida, siendo la extensión del sistema π -conjugado y la introducción de grupos dadores responsables de bandas a mayores longitudes de onda. Además, los espectros en estado agregado exhiben un acentuado efecto batocrómico, atribuido a interacciones intermoleculares π - π . Estas interacciones varían en función de los sustituyentes, como se observa en las estructuras obtenidas por DRX, y modifican la diferencia energética de los niveles HOMO-LUMO en la fase cristalina. En cuanto a las medidas de fluorescencia en disolución, la dependencia de la intensidad y posición de los máximos de emisión con la longitud de onda de excitación puede explicarse por la formación de excímeros, cuya banda aparece a menores energías que la de especies monoméricas. Solo dos de los compuestos aislados, AL2 y AR8, muestran fluorescencia también en su estado sólido.

Los estudios espectrofotométricos y espectrofluorimétricos de interacción de AR8 con el ADN reflejan hipocromismo y un ligero desplazamiento batocrómico en los espectros de absorción, así como el “quencheo” de la fluorescencia en los espectros de emisión, fenómenos acordes con mecanismos de unión no covalente. Las constantes de interacción obtenidas por ambas técnicas son del orden de 10^4 M^{-1} , comparables con las reportadas en la literatura para moléculas que se unen a los surcos del ADN e inferiores a las de intercaladores clásicos como el bromuro de etidio (10^6 – 10^7 M^{-1}). Esto sugiere que la interacción más favorable es la originada en el surco. Adicionalmente, la linealidad obtenida en la representación Stern-Volmer denota un solo tipo de “quenching” actuando sobre las moléculas de AR8.

Futuros ensayos de citotoxicidad y estudios de modulación de la fluorescencia en estado sólido podrían reforzar aún más el potencial terapéutico y tecnológico que presentan este tipo de compuestos.

CONCLUSIONES.

Nos últimos anos, os derivados hidrazida-hidrazona despertaron gran interese na química médica ao posuír na súa estrutura un grupo azometino conectado cun grupo carbonilo, o que lles confire múltiples aplicacións biolóxicas e farmacéuticas e convérteos en importantes axentes quelantes para a formación de complexos con metais de transición.

Os resultados extraídos das distintas técnicas de caracterización efectuadas confirman que a ruta de síntese escollida resulta adecuada para a obtención de compostos hidrazida-hidrazona derivados de piridoxal.

As propiedades ópticas e fotofísicas dos compostos en disolución e estado sólido estúdanse por espectroscopia UV-Vis e espectroscopia de fluorescencia. A posición dos máximos de absorción está fortemente influenciada pola estrutura química da parte hidrazida, sendo a extensión do sistema π -conjugado e a introdución de grupos dadores responsables de bandas a maiores lonxitudes de onda. Ademais, os espectros en estado agregado exhiben un acentuado efecto batocrómico, atribuído a interaccións intermoleculares π - π . Estas interaccións varían en función dos substituíntes, como se observa nas estruturas obtidas por DRX, e modifican a diferenza enerxética dos niveis HOMO- LUMO na fase cristalina. En canto ás medidas de fluorescencia en disolución, a dependencia da intensidade e posición dos máximos de emisión coa lonxitude de onda de excitación pode explicarse pola formación de excímeros, cunha banda que aparece a menores enerxías que a de especies monoméricas. Só dous dos compostos illados, AL2 e AR8, mostran fluorescencia tamén no seu estado sólido.

Os estudos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos de interacción de AR8 co ADN reflicten hipocromismo e un lixeiro desprazamento batocrómico nos espectros de absorción, así como a desactivación da fluorescencia nos espectros de emisión, fenómenos acordes con mecanismos de unión non covalente. As constantes de interacción obtidas por ambas as técnicas son da orde de 10^4 M^{-1} , comparables coas reportadas na literatura para moléculas que se unen aos surcos do ADN e inferiores ás de intercaladores clásicos como o bromuro de etidio (10^6 – 10^7 M^{-1}). Isto suxire que a interacción máis favorable é a orixinada no suco. Adicionalmente, a linealidade obtida na representación Stern-Volmer denota un só tipo de “quenching” actuando sobre as moléculas de AR8.

Futuros ensaios de citotoxicidade e estudos de modulación da fluorescencia en estado sólido poderían reforzar aínda máis o potencial terapéutico e tecnolóxico que presentan este tipo de compostos.

CONCLUSIONS.

In recent years, hydrazide-hydrazone derivatives have aroused great interest in medicinal chemistry as they possess in their structure an azomethine group connected with a carbonyl group, which confers them multiple biological and pharmaceutical applications and makes them important chelating agents for the formation of complexes with transition metals.

The results obtained from the different characterization techniques confirm that the synthesis route chosen is suitable for obtaining pyridoxal-derived hydrazide-hydrazone compounds.

Optical and photophysical properties of the compounds in solution and solid state are studied by UV-Vis spectroscopy and fluorescence spectroscopy. The position of the absorption maxima is strongly influenced by the chemical structure of the hydrazide part, with the extension of the π -conjugated system and the introduction of donor groups being responsible for bands at longer wavelengths. In addition, the spectra in the aggregated state exhibit an accentuated bathochromic effect, attributed to intermolecular π - π interactions. These interactions vary depending on the substituents, as observed in the structures obtained by XRD, and modify the energy difference of the HOMO-LUMO levels in the crystalline phase. As for the fluorescence measurements in solution, the dependence of the intensity and position of the emission maxima on the excitation wavelength can be explained by the formation of excimers, whose band appears at lower energies than that of monomeric species. Only two of the isolated compounds, AL2 and AR8, show fluorescence also in their solid state.

Spectrophotometric and spectrofluorimetric studies of AR8 interaction with DNA reflect hypochromism and a slight bathochromic shift in the absorption spectra, as well as quenching of fluorescence in the emission spectra, which is consistent with non-covalent binding mechanisms. The binding constant values obtained by both techniques are of the order of 10^4 M^{-1} , comparable to those reported in the literature for molecules that interact with DNA grooves and lower than those of classical intercalators such as ethidium bromide (10^6 – 10^7 M^{-1}). This suggests that the most favorable interaction with DNA is through groove binding. Additionally, the linearity of Stern-Volmer plot denotes a single type of quenching acting on the AR8 molecules.

Future cytotoxicity assays and solid-state fluorescence modulation studies could further reinforce the therapeutic and technological potential of these promising compounds.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- (1) Fuertes Villadangos, M.; Pérez Martín, J. Química Bioinorgánica. Un Ciencia Interdisciplinar En Desarrollo. *Encuentros Multidisciplinares* **2000**, 2 (5), 1–5.
- (2) Bertini, I.; B. Gray, H.; J. Lippard, S.; Selverstone Valentine, J. Bioinorganic Chemistry. *Dalton Trans.* **2013**, 42 (9), 3027-3028. <https://doi.org/10.1039/c2dt90214a>.
- (3) Cohen, S. M. New Approaches for Medicinal Applications of Bioinorganic Chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11 (2), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.012>.
- (4) Kajal, A.; Bala, S.; Sharma, N.; Kamboj, S.; Saini, V. Therapeutic Potential of Hydrazones as Anti-Inflammatory Agents. *Int. J. Med. Chem.* **2014**, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/761030>.
- (5) Padmini, K.; Preethi, P. J.; Divya, M.; Rohini, P.; Lohita, M.; Swetha, K.; Kaladar, P. A Review on Biological Importance of Hydrazones. *Int. J. Pharma Res. Rev. IJPRR* **2013**, 2 (8), 43–58.
- (6) Salgin-Gökşen, U.; Gökhan-Kelekçi, N.; Göktaş, Ö.; Köysal, Y.; Kiliç, E.; Işık, Ş.; Aktay, G.; Özalp, M. 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-Triazole-5(4H)-Thiones, 1,3,4-Thiadiazoles and Hydrazones Containing 5-Methyl-2-Benzoxazolinones: Synthesis, Analgesic-Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities. *Bioorganic Med. Chem.* **2007**, 15 (17), 5738–5751. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.06.006>.
- (7) Asif, M.; Husain, A. Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antiplatelet Profile of Hydrazones Containing Synthetic Molecules. *J. Appl. Chem.* **2013**, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/247203>.
- (8) Belkheiri, N.; Bouguerne, B.; Bedos-Belval, F.; Duran, H.; Bernis, C.; Salvayre, R.; Nègre-Salvayre, A.; Baltas, M. Synthesis and Antioxidant Activity Evaluation of a Syringic Hydrazones Family. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45 (7), 3019–3026. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.03.031>.

- (9) Kumar, S.; Bawa, S.; Drabu, S.; Kumar, R.; Machawal, L. Synthesis and in Vivo Anticonvulsant Evaluation of 2-Chloroquinolinyl Hydrazone Derivatives. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **2010**, *67* (5), 567–573.
- (10) Popiołek, Ł. Hydrazide–Hydrazones as Potential Antimicrobial Agents: Overview of the Literature since 2010. *Med. Chem. Res.* **2017**, *26* (2), 287–301. <https://doi.org/10.1007/s00044-016-1756-y>.
- (11) Mahajan, A.; Kremer, L.; Louw, S.; Guéradel, Y.; Chibale, K.; Biot, C. Synthesis and in Vitro Antitubercular Activity of Ferrocene-Based Hydrazones. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (10), 2866–2868. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.03.082>.
- (12) Mashayekhi, V.; Tehrani, K. H. M. E.; Amidi, S.; Kobarfard, F. Synthesis of Novel Indole Hydrazone Derivatives and Evaluation of Their Antiplatelet Aggregation Activity. *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61* (2), 144–150. <https://doi.org/10.1248/cpb.c12-00597>.
- (13) Vicini, P.; Incerti, M.; La Colla, P.; Loddo, R. Anti-HIV Evaluation of Benzo[d]isothiazole Hydrazones. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44* (4), 1801–1807. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.05.030>.
- (14) Li, L. Y.; Peng, J. Di; Zhou, W.; Qiao, H.; Deng, X.; Li, Z. H.; Li, J. D.; Fu, Y. D.; Li, S.; Sun, K.; Liu, H. M.; Zhao, W. Potent Hydrazone Derivatives Targeting Esophageal Cancer Cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *148*, 359–371. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.033>.
- (15) Maranhão, S. S. A.; Moura, A. F.; Oliveira, A. C. A.; Lima, D. J. B.; Barros-Nepomuceno, F. W. A.; Paier, C. R. K.; Pinheiro, A. C.; Nogueira, T. C. M.; de Souza, M. V. N.; Pessoa, C. Synthesis of PJOV56, a New Quinoxaliny-Hydrazone Derivative Able to Induce Autophagy and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells, and Related Compounds. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2020**, *30* (2). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126851>.
- (16) Xia, Y.; Fan, C. D.; Zhao, B. X.; Zhao, J.; Shin, D. S.; Miao, J. Y. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Novel 1-Arylmethyl-3-Aryl-1H-Pyrazole-5-Carbohydrazone Hydrazone Derivatives as Potential Agents against A549 Lung Cancer Cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43* (11), 2347–2353. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.01.021>.

- (17) Bingul, M.; Tan, O.; Gardner, C. R.; Sutton, S. K.; Arndt, G. M.; Marshall, G. M.; Cheung, B. B.; Kumar, N.; Black, D. S. C. Synthesis, Characterization and Anti-Cancer Activity of Hydrazone Derivatives Incorporating a Quinoline Moiety. *Molecules* **2016**, *21* (7). <https://doi.org/10.3390/molecules21070916>.
- (18) Patil, S.; Kuman, M. M.; Palvai, S.; Sengupta, P.; Basu, S. Impairing Powerhouse in Colon Cancer Cells by Hydrazone-Hydrazone-Based Small Molecule. *ACS Omega* **2018**, *3* (2), 1470–1481. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01512>.
- (19) Liu, W. Y.; Li, H. Y.; Zhao, B. X.; Shin, D. S.; Lian, S.; Miao, J. Y. Synthesis of Novel Ribavirin Hydrazone Derivatives and Anti-Proliferative Activity against A549 Lung Cancer Cells. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344* (11), 1270–1275. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.017>.
- (20) Dandawate, P.; Khan, E.; Padhye, S.; Gaba, H.; Sinha, S.; Deshpande, J.; Venkateswara Swamy, K.; Khetmalas, M.; Ahmad, A.; Sarkar, F. H. Synthesis, Characterization, Molecular Docking and Cytotoxic Activity of Novel Plumbagin Hydrazones against Breast Cancer Cells. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (9), 3104–3108. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.03.060>.
- (21) Green, D. A.; Wong, S. J.; Chitambar, C. R.; Antholine, W. E.; Richardson, D. R. Inhibition of Malignant Cell Growth by 311, a Novel Iron Chelator of the Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazone Class: Effect on the R2 Subunit of Ribonucleotide Reductase. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7* (11), 3574–3579.
- (22) Gómez Ruiz, S. Evolución y Desarrollo de Complejos Metálicos Con Aplicación Potencial Como Agentes Antitumorales. *An. la Real Soc. Española Química* **2010**, *106* (1), 13–21.
- (23) Frezza, M.; Hindo, S.; Chen, D.; Davenport, A.; Schmitt, S.; Tomco, D.; Ping Dou, Q. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16* (16), 1813–1825. <https://doi.org/10.2174/138161210791209009>.
- (24) Sathyadevi, P.; Krishnamoorthy, P.; Jayanthi, E.; Butorac, R. R.; Cowley, A. H.; Dharmaraj, N. Studies on the Effect of Metal Ions of Hydrazone Complexes on Interaction with Nucleic Acids, Bovine Serum Albumin and Antioxidant Properties. *Inorganica Chim. Acta* **2012**, *384*, 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2011.11.033>.

- (25) Ott, I.; Gust, R. Non Platinum Metal Complexes as Anti-Cancer Drugs. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2007**, *340* (3), 117–126. <https://doi.org/10.1002/ardp.200600151>.
- (26) Benjamin Garbutcheon-Singh, K.; P. Grant, M.; W. Harper, B.; M. Krause-Heuer, A.; Manohar, M.; Orkey, N.; R. Aldrich-Wright, J. Transition Metal Based Anticancer Drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11* (5), 521–542. <https://doi.org/10.2174/156802611794785226>.
- (27) Krishnamoorthy, P.; Sathyadevi, P.; Cowley, A. H.; Butorac, R. R.; Dharmaraj, N. Evaluation of DNA Binding, DNA Cleavage, Protein Binding and in Vitro Cytotoxic Activities of Bivalent Transition Metal Hydrazone Complexes. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (8), 3376–3387. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.001>.
- (28) Krishnamoorthy, P.; Sathyadevi, P.; Senthilkumar, K.; Muthiah, P. T.; Ramesh, R.; Dharmaraj, N. Copper(I) Hydrazone Complexes: Synthesis, Structure, DNA Binding, Radical Scavenging and Computational Studies. *Inorg. Chem. Commun.* **2011**, *14* (9), 1318–1322. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2011.05.004>.
- (29) Wu, L. M.; Teng, H. B.; Ke, X. B.; Xu, W. J.; Su, J. T.; Liang, S. C.; Hu, X. M. Copper(II) Complexes of Salicylaldehyde Hydrazones: Synthesis, Structure, and DNA Interaction. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4* (9), 2198–2209. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790177>.
- (30) Sirajuddin, M.; Ali, S.; Badshah, A. Drug-DNA Interactions and Their Study by UV-Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2013**, *124*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>.
- (31) Sirajuddin, M.; Ali, S.; Badshah, A. Drug-DNA Interactions and Their Study by UV-Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2013**, *124*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>.
- (32) Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and Applications. *Wiley-VCH* **2001**, *8*.
- (33) Noomarm, U.; Clegg, R. M. Fluorescence Lifetimes: Fundamentals and Interpretations. *Photosynth. Res.* **2009**, *101* (2–3), 181–194. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9457-8>.

- (34) Popov, L. D.; Orekhovskii, V. S.; Revinskii, Y. V.; Shepelenko, E. N.; Borodkin, S. A.; Koretskii, I. V. Luminescence and Photochemical Properties of Hydrazones of Aromatic Aldehydes. *Russ. J. Gen. Chem.* **2017**, *87* (5), 945–951. <https://doi.org/10.1134/S1070363217050097>.
- (35) Mani, K. S.; Rajamanikandan, R.; Murugesapandian, B.; Shankar, R.; Sivaraman, G.; Ilanchelian, M.; Rajendran, S. P. Coumarin Based Hydrazone as an ICT-Based Fluorescence Chemosensor for the Detection of Cu²⁺ Ions and the Application in HeLa Cells. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, *214*, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.02.020>.
- (36) Guo, D.; Wu, P.; Tan, H.; Xia, L.; Zhou, W. Synthesis and Luminescence Properties of Novel 4-(N-Carbazole Methyl) Benzoyl Hydrazone Schiff Bases. *J. Lumin.* **2011**, *131* (7), 1272–1276. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2011.03.023>.
- (37) Babiak, S.; Testa, A. C. Fluorescence Lifetime Study of Aminopyridines. *J. Phys. Chem.* **1976**, *80* (17), 1882–1885. <https://doi.org/10.1021/j100558a015>.
- (38) Hua, C. J.; Zhang, K.; Xin, M.; Ying, T.; Gao, J. R.; Jia, J. H.; Li, Y. J. High Quantum Yield and PH Sensitive Fluorescence Dyes Based on Coumarin Derivatives: Fluorescence Characteristics and Theoretical Study. *RSC Adv.* **2016**, *6* (54), 49221–49227. <https://doi.org/10.1039/c6ra05996a>.
- (39) Hong, Y.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z. Aggregation-Induced Emission. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (11), 5361–5388. <https://doi.org/10.1039/c1cs15113d>.
- (40) Ma, X.; Sun, R.; Cheng, J.; Liu, J.; Gou, F.; Xiang, H.; Zhou, X. Fluorescence Aggregation-Caused Quenching versus Aggregation-Induced Emission: A Visual Teaching Technology for Undergraduate Chemistry Students. *J. Chem. Educ.* **2016**, *93* (2), 345–350. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.5b00483>.
- (41) Anthony, S. P. Organic Solid-State Fluorescence: Strategies for Generating Switchable and Tunable Fluorescent Materials. *Chempluschem* **2012**, *77* (7), 518–531. <https://doi.org/10.1002/cplu.201200073>.
- (42) Luo, J.; Xie, Z.; Xie, Z.; Lam, J. W. Y.; Cheng, L.; Chen, H.; Qiu, C.; Kwok, H. S.; Zhan, X.; Liu, Y.; Zhu, D.; Tang, B. Z. Aggregation-Induced Emission of 1-Methyl-1,2,3,4,5-Pentaphenylsilole. *Chem. Commun.* **2001**, *18*, 1740–1741. <https://doi.org/10.1039/b105159h>.

- (43) Shirai, K.; Matsuoka, M.; Fukunishi, K. Fluorescence Quenching by Intermolecular π - π Interactions of 2,5-Bis(N,N-Dialkylamino)-3,6-Dicyanopyrazines. *Dye. Pigment.* **1999**, *42* (1), 95–101. [https://doi.org/10.1016/S0143-7208\(99\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0143-7208(99)00013-3).
- (44) Cicoira, F.; Santato, C. Organic Light Emitting Field Effect Transistors: Advances and Perspectives. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17* (17), 3421–3434. <https://doi.org/10.1002/adfm.200700174>.
- (45) Tang, C. W.; Vanslyke, S. A. Organic Electroluminescent Diodes. *Appl. Phys. Lett.* **1987**, *51* (12), 913–915. <https://doi.org/10.1063/1.98799>.
- (46) Jiang, Y.; Liu, Y. Y.; Liu, X.; Lin, H.; Gao, K.; Lai, W. Y.; Huang, W. Organic Solid-State Lasers: A Materials View and Future Development. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (16), 5885–5944. <https://doi.org/10.1039/d0cs00037j>.
- (47) Ooyama, Y.; Yoshikawa, S.; Watanabe, S.; Yoshida, K. Molecular Design of Novel Non-Planar Heteropolycyclic Fluorophores with Bulky Substituents: Convenient Synthesis and Solid-State Fluorescence Characterization. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (18), 3406–3409. <https://doi.org/10.1039/b607891e>.
- (48) Kubota, Y.; Uehara, J.; Funabiki, K.; Ebihara, M.; Matsui, M. Strategy for the Increasing the Solid-State Fluorescence Intensity of Pyrromethene-BF₂ Complexes. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (47), 6195–6198. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.09.106>.
- (49) Ng, A. C. H.; Li, X. Y.; Ng, D. K. P. Synthesis and Photophysical Properties of Nonaggregated Phthalocyanines Bearing Dendritic Substituents. *Macromolecules* **1999**, *32* (16), 5292–5298. <https://doi.org/10.1021/ma990367s>.
- (50) Briñas, R. P.; Troxler, T.; Hochstrasser, R. M.; Vinogradov, S. A. Phosphorescent Oxygen Sensor with Dendritic Protection and Two-Photon Absorbing Antenna. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (33), 11851–11862. <https://doi.org/10.1021/ja052947c>.
- (51) Zhao, C. H.; Wakamiya, A.; Inukai, Y.; Yamaguchi, S. Highly Emissive Organic Solids Containing 2,5-Diboryl-1,4-Phenylene Unit. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (50), 15934–15935. <https://doi.org/10.1021/ja0637550>.
- (52) Xie, Z.; Yang, B.; Li, F.; Cheng, G.; Liu, L.; Yang, G.; Xu, H.; Ye, L.; Hanif, M.; Liu, S.; Ma, D.; Ma, Y. Cross Dipole Stacking in the Crystal of Distyrylbenzene

- Derivative: The Approach toward High Solid-State Luminescence Efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (41), 14152–14153. <https://doi.org/10.1021/ja054661d>.
- (53) Sheldrick, G. M. Crystal Structure Refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr.* **2015**, *C71*, 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>.
- (54) Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. OLEX2: A Complete Structure Solution, Refinement and Analysis Program. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42* (2), 339–341. <https://doi.org/10.1107/S0021889808042726>.
- (55) Péré, E.; Cardy, H.; Cairon, O.; Simon, M.; Lacombe, S. Quantitative Assessment of Organic Compounds Adsorbed on Silica Gel by FTIR and UV-VIS Spectroscopies: The Contribution of Diffuse Reflectance Spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **2001**, *25* (2), 163–175. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(00\)00113-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(00)00113-2).
- (56) Weckhuysen, B. M.; Schoonheydt, R. A. Recent Progress in Diffuse Reflectance Spectroscopy of Supported Metal Oxide Catalysts. *Catal. Today* **1999**, *49* (4), 441–451. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(98\)00458-1](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(98)00458-1).
- (57) Torrent, J.; Barrón, V. Diffuse Reflectance Spectroscopy. *Methods of Soil Analysis: Mineralogical methods* **2008**, *5*, 367–385. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.5.c13>.
- (58) Morales, A. E. Use of Diffuse Reflectance Spectroscopy for Optical Characterization of Un-Supported Nanostructures. *Rev. Mex. Física* **2007**, *53* (5), 18–22.
- (59) Costa, J. C. S.; Taveira, R. J. S.; Lima, C. F. R. A. C.; Mendes, A.; Santos, L. M. N. B. F. Optical Band Gaps of Organic Semiconductor Materials. *Opt. Mater. (Amst)*. **2016**, *58*, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2016.03.041>.
- (60) Tauc, J.; Grigorovici, R.; Vancu, A. Optical Properties and Electronic Structure of Amorphous Germanium. *Phys. Status Solidi* **1966**, *15* (2), 627–637. <https://doi.org/10.1002/9781118437865.ch16>.
- (61) Makuła, P.; Pacia, M.; Macyk, W. How To Correctly Determine the Band Gap Energy of Modified Semiconductor Photocatalysts Based on UV-Vis Spectra.

Journal of Physical Chemistry Letters **2018**, *9* (23), 6814–6817.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.8b02892>.

- (62) Kumar, M.; Kaushik, M.; Chaudhary, S.; Kukreti, S. Spectroscopic Studies of the Binding Interactions of Phenothiazinium Dyes (Thionine Acetate, Azure A and Azure B) with Calf-Thymus DNA. *J. Drug Metab. Toxicol.* **2016**, *7* (3).
<https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000214>.
- (63) Qiao, C.; Bi, S.; Sun, Y.; Song, D.; Zhang, H.; Zhou, W. Study of Interactions of Anthraquinones with DNA Using Ethidium Bromide as a Fluorescence Probe. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2008**, *70* (1), 136–143.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.07.038>.
- (64) Zhang, G.; Hu, X.; Fu, P. Spectroscopic Studies on the Interaction between Carbaryl and Calf Thymus DNA with the Use of Ethidium Bromide as a Fluorescence Probe. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2012**, *108*, 53–61.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.12.011>.
- (65) Thakor, K. P.; Lunagariya, M. V.; Bhatt, B. S.; Patel, M. N. Fluorescence and Absorption Studies of DNA–Pd(II) Complex Interaction: Synthesis, Spectroanalytical Investigations and Biological Activities. *Luminescence* **2019**, *34* (1), 113–124. <https://doi.org/10.1002/bio.3587>.
- (66) Xu, Z. H.; Chen, F. J.; Xi, P. X.; Liu, X. H.; Zeng, Z. Z. Synthesis, Characterization, and DNA-Binding Properties of the Cobalt(II) and Nickel(II) Complexes with Salicylaldehyde 2-Phenylquinoline-4-Carboylhydrazone. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2008**, *196* (1), 77–83.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.11.017>.
- (67) Arantes, C.; Scholz, M.; Schmidt, R.; Dehm, V.; Rocco, M. L. M.; Schöll, A.; Reinert, F.; Würthner, F. Comparative Analysis of the Energy Levels of Planar and Core-Twisted Perylene Bisimides in Solution and Solid State by UV/VIS, CV, and UPS/IPES. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **2012**, *108* (3), 629–637.
<https://doi.org/10.1007/s00339-012-6941-3>.
- (68) Oltean, M.; Calborean, A.; Mile, G.; Vidrighin, M.; Iosin, M.; Leopold, L.; Maniu, D.; Leopold, N.; Chiş, V. Absorption Spectra of PTCDI: A Combined UV-Vis and TD-DFT Study. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, *97*, 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.07.056>.

- (69) Galić, N.; Rubčić, M.; Magdić, K.; Cindrić, M.; Tomišić, V. Solution and Solid-State Studies of Complexation of Transition-Metal Cations and Al(III) by Aroylhydrazones Derived from Nicotinic Acid Hydrazide. *Inorganica Chim. Acta* **2011**, *366* (1), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2010.10.017>.
- (70) Bozkurt, E.; Sıcak, Y.; Oruç-Emre, E. E.; İyidoğan, A. K.; Öztürk, M. Design and Bioevaluation of Novel Hydrazide-Hydrazones Derived from 4-Acetyl-N-Substituted Benzenesulfonamide. *Russ. J. Bioorganic Chem.* **2020**, *46* (5), 702–714. <https://doi.org/10.1134/S1068162020050052>.
- (71) Lu, Y. H.; Lu, Y. W.; Wu, C. L.; Shao, Q.; Chen, X. L.; Bimbong, R. N. B. UV-Visible Spectroscopic Study of the Salicylaldehyde Benzoylhydrazone and Its Cobalt Complexes. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2006**, *65* (3–4), 695–701. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.12.032>.
- (72) Förster, T. Excimers. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1969**, *8* (5), 333–343. <https://doi.org/10.1002/anie.196903331>.
- (73) Birks, J. B.; Christophorou, L. G. Excimer Fluorescence Spectra of Pyrene Derivatives. *Spectrochim. Acta* **1963**, *19* (2), 401–410. [https://doi.org/10.1016/0371-1951\(63\)80051-x](https://doi.org/10.1016/0371-1951(63)80051-x).
- (74) Vaidyanathan, V. G.; Nair, B. U. Photooxidation of DNA by a Cobalt(II) Tridentate Complex. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *94* (1–2), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00620-7](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00620-7).
- (75) Fu, X. B.; Liu, D. D.; Lin, Y.; Hu, W.; Mao, Z. W.; Le, X. Y. Water-Soluble DNA Minor Groove Binders as Potential Chemotherapeutic Agents: Synthesis, Characterization, DNA Binding and Cleavage, Antioxidation, Cytotoxicity and HSA Interactions. *Dalt. Trans.* **2014**, *43* (23), 8721–8737. <https://doi.org/10.1039/c3dt53577k>.
- (76) Qin, Y.; Zhang, Y.; Yan, S.; Ye, L. A Comparison Study on the Interaction of Hyperoside and Bovine Serum Albumin with Tachiya Model and Stern-Volmer Equation. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2010**, *75* (5), 1506–1510. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.02.007>.

7. ANEXOS.

7.1. Caracterización estructural del compuesto H1.

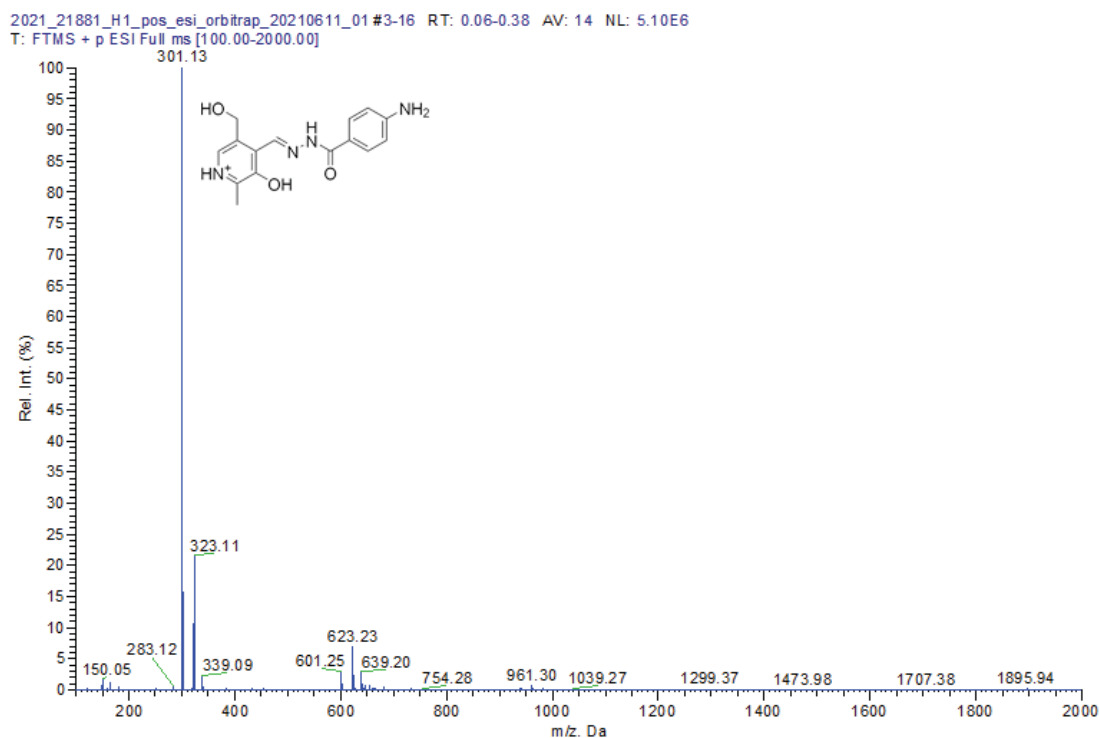


Figura 34. Espectro de masas ESI⁺ del compuesto H1.

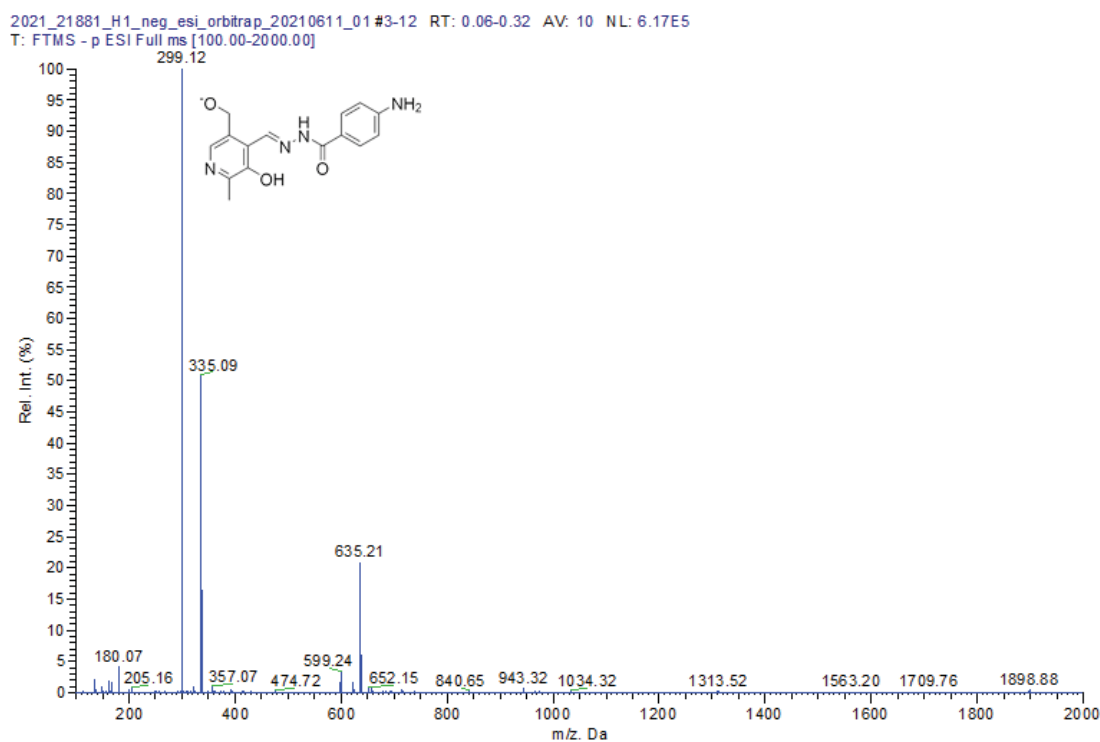


Figura 35. Espectro de masas ESI⁻ del compuesto H1.

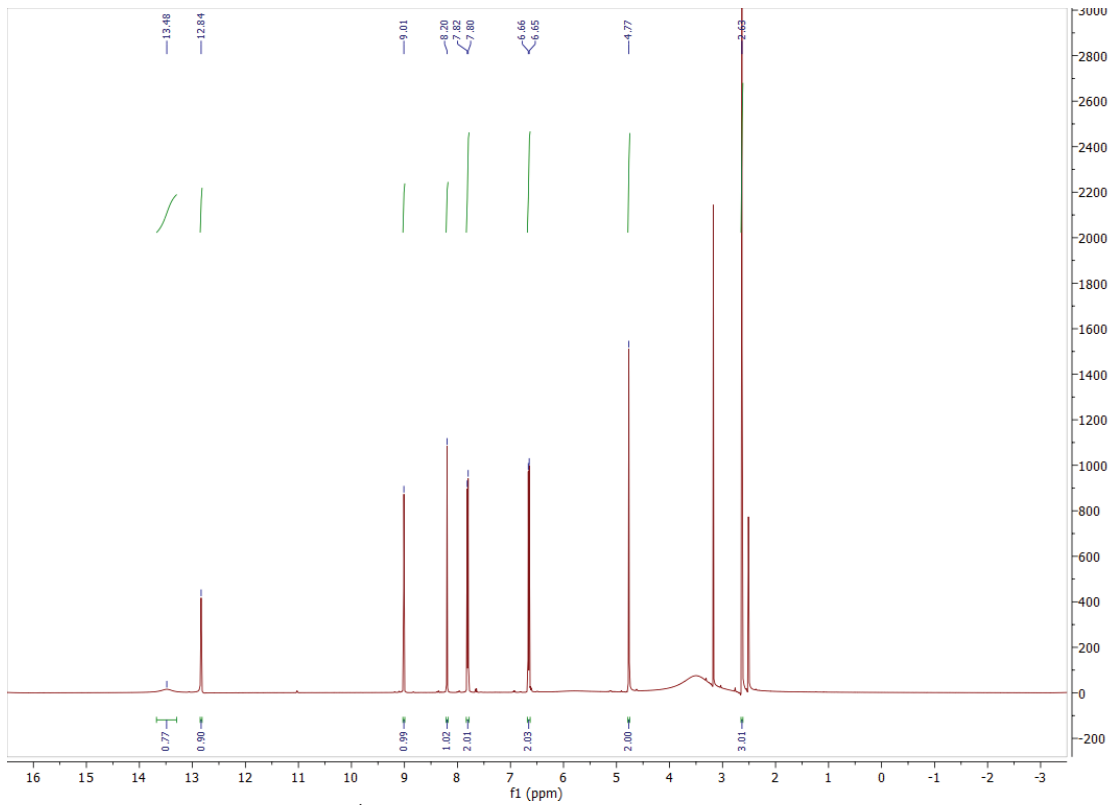


Figura 36. Espectro RMN ^1H del compuesto H1.

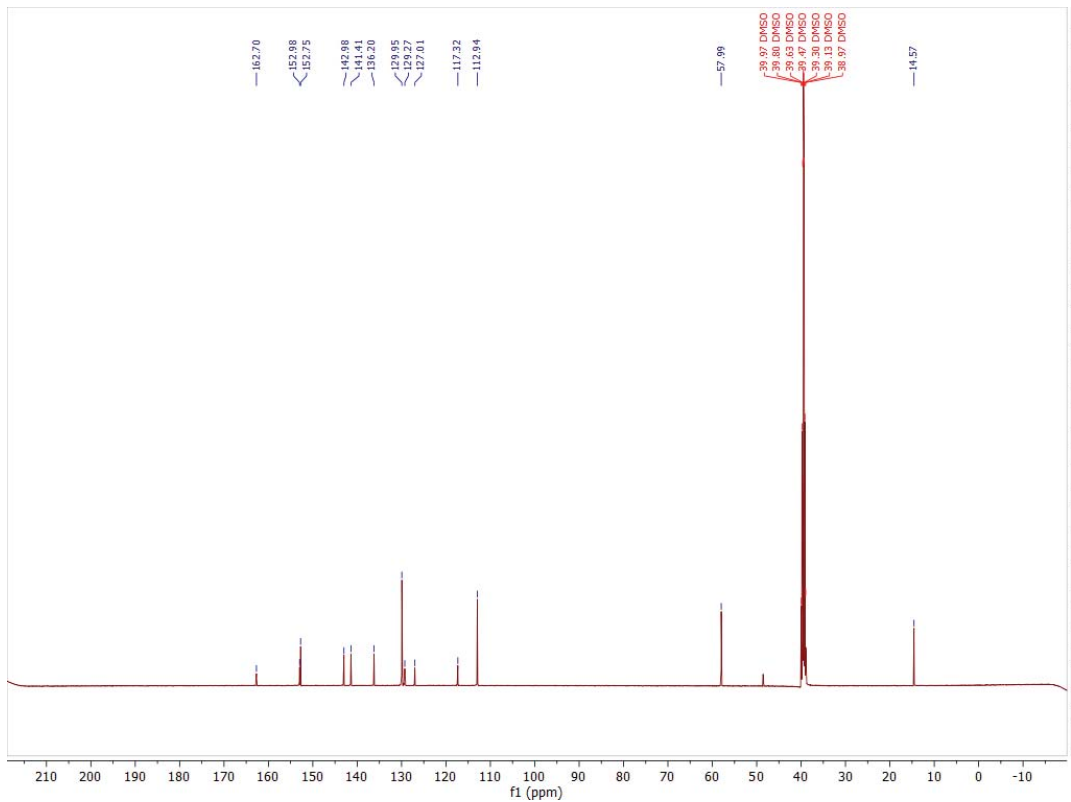


Figura 37. Espectro RMN ^{13}C del compuesto H1.

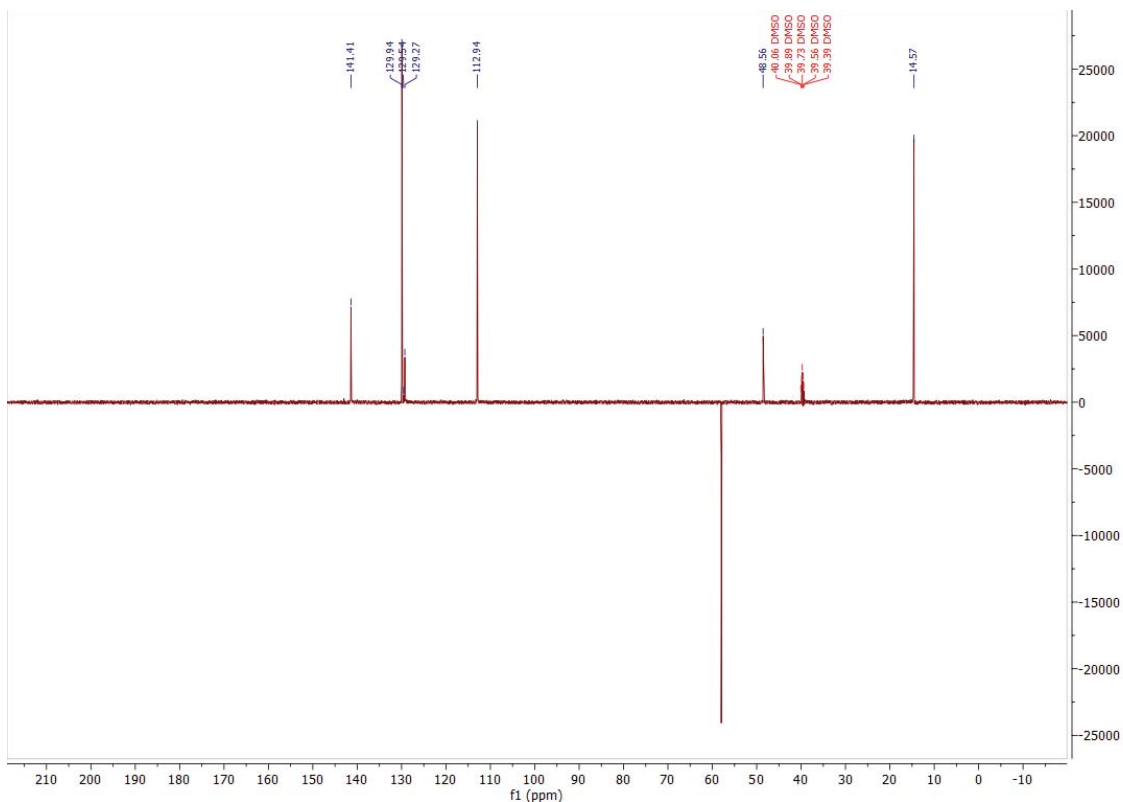


Figura 38. Espectro DEPT del compuesto H1.

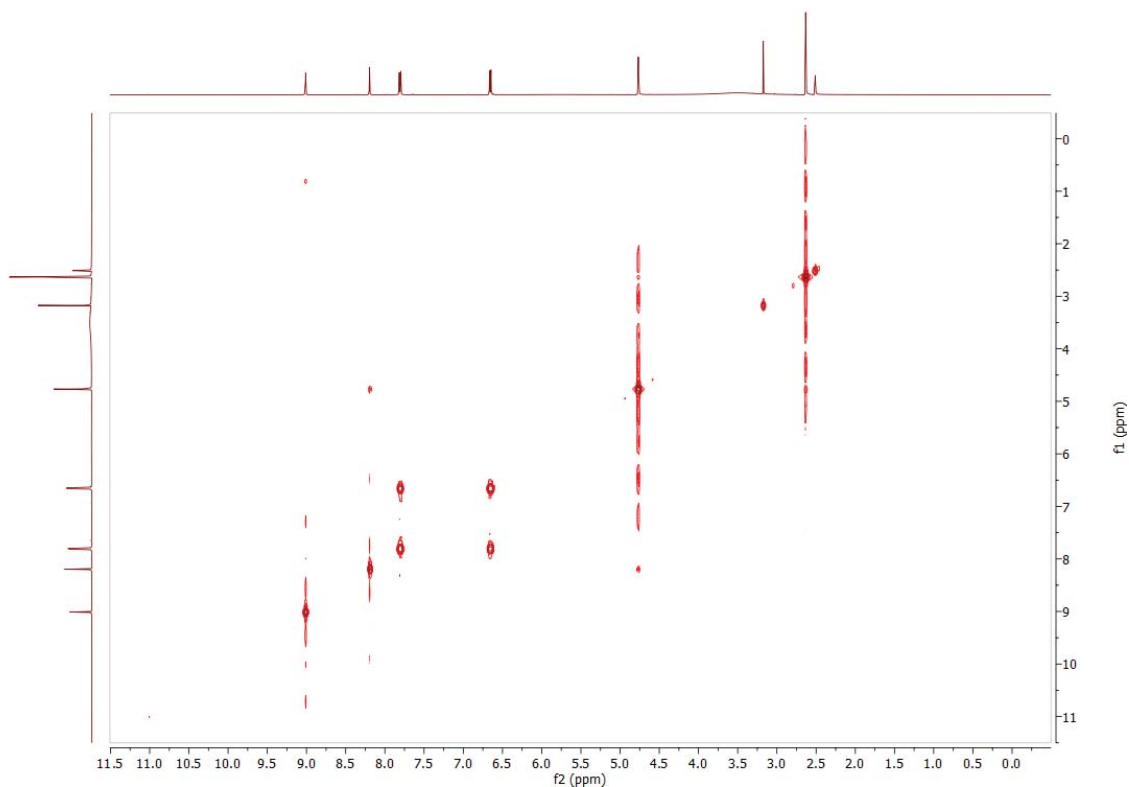


Figura 39. COSY del compuesto H1. El espectro muestra interacciones entre los hidrógenos del grupo piridoxal: Ar-CH₂-OH (4.77 ppm) y 6-H_{Ar}-piridoxal (8.20 ppm). También se observan interacciones entre 3-H_{Ar}-benz, 5-H_{Ar}-benz (6.66 ppm) y 2-H_{Ar}-benz, 6-H_{Ar}-benz (7.81 ppm) del grupo aminobenzoico.

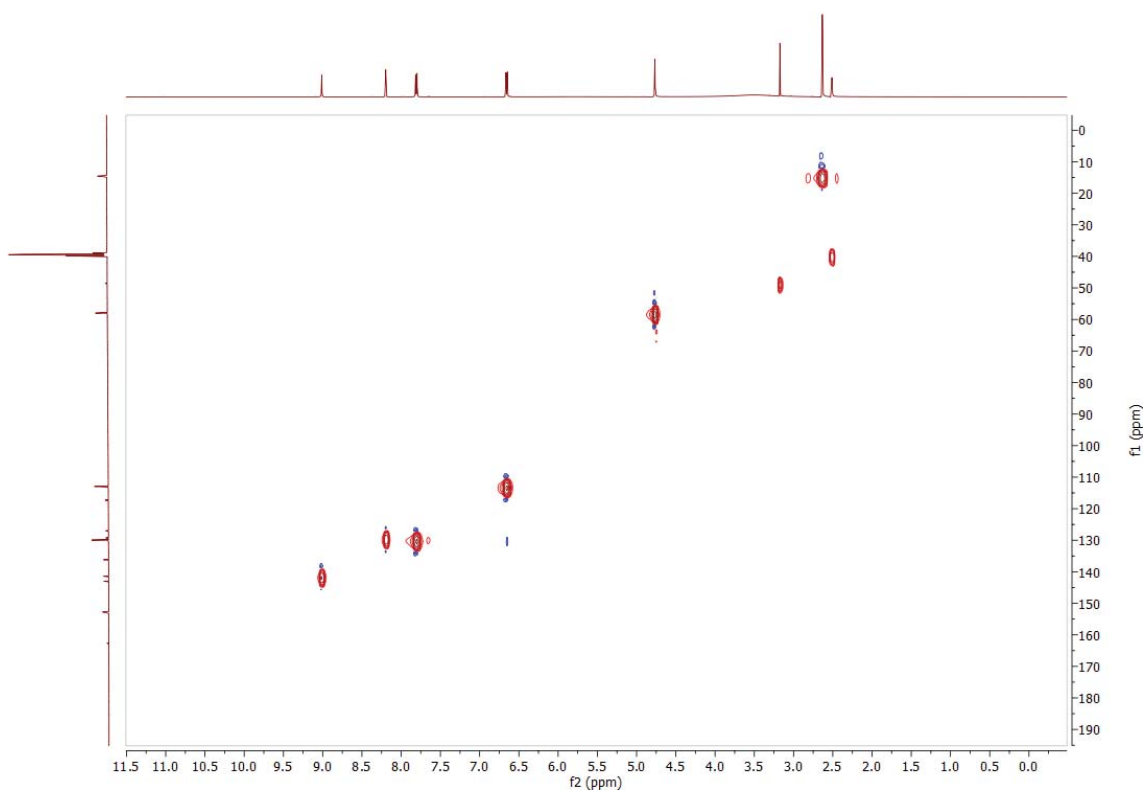


Figura 40. HSQC del compuesto H1. El espectro muestra las interacciones entre hidrógenos y carbonos a un enlace de distancia: Ar-CH₃ (^1H : 2.63 y ^{13}C : 14.57 ppm), Ar-CH₂-OH (^1H : 4.77 y ^{13}C : 57.99 ppm), 3-HC_{Ar-benz} y 5-HC_{Ar-benz} (^1H : 6.66 y ^{13}C : 112.94 ppm), 2-HC_{Ar-benz} y 6-HC_{Ar-benz} (^1H : 7.81 y ^{13}C : 129.95 ppm), 6-HC_{Ar-piridoxal} (^1H : 8.20 y ^{13}C : 129.27 ppm) y -CH=N (^1H : 9.01 y ^{13}C : 141.41 ppm).

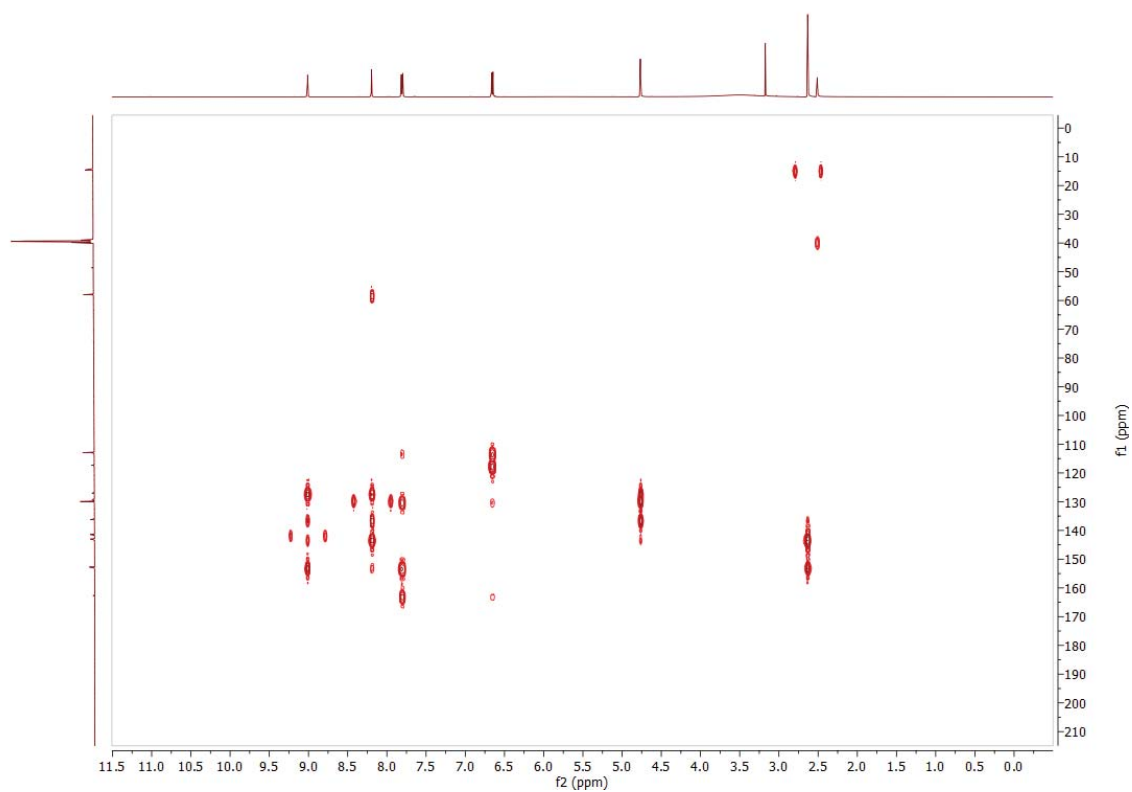


Figura 41. HMBC del compuesto H1. El espectro muestra interacciones entre hidrógenos y carbonos a dos enlaces de distancia: H del CH₃ (2.63 ppm) con C_{Ar-CH₃} (142.98 ppm) y a tres enlaces de distancia: H del CH₃ (2.63 ppm) con C_{Ar-OH} (152.98 ppm), H del CH₂ (4.77 ppm) con 6-C_{piridoxal} (129.27 ppm) y H del CH₂ (4.77 ppm) con C_{Ar-CH=N} (136.20 ppm). El resto de relaciones observadas se describen en la Figura 42.

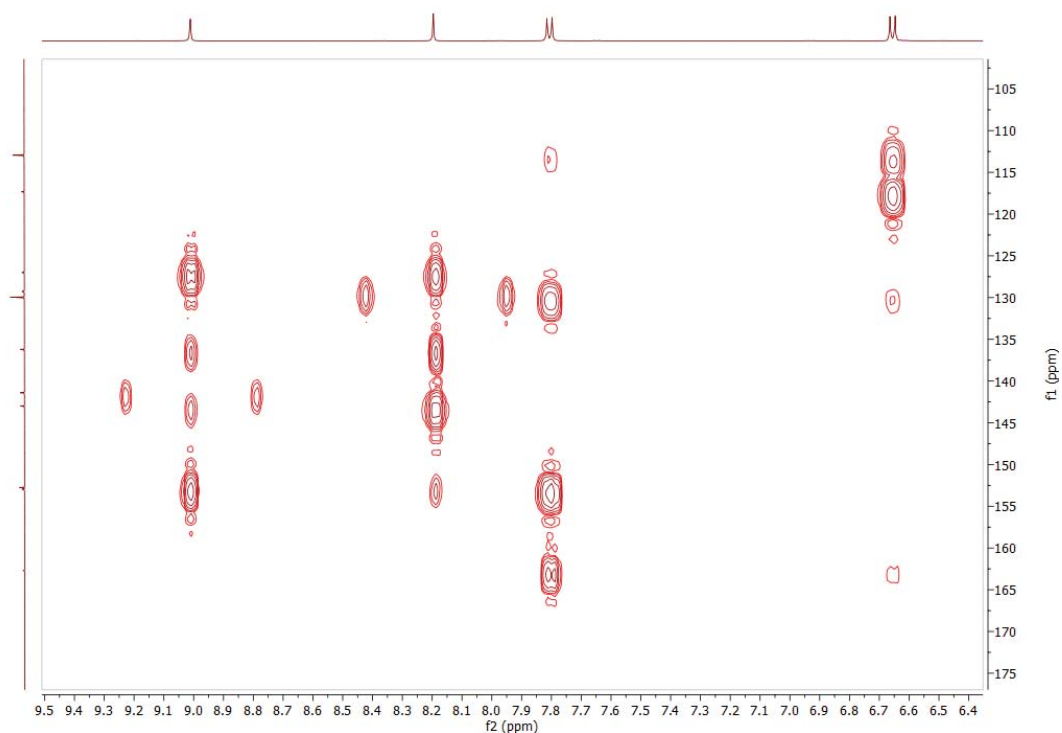


Figura 42. Zoom realizado al HMBC del compuesto H1. El espectro muestra interacciones entre hidrógenos y carbonos a dos enlaces de distancia: 3- $H_{Ar-benz}$ y 5- $H_{Ar-benz}$ (6.66 ppm) con 2- $C_{Ar-benz}$ y 6- $C_{Ar-benz}$ (129.95 ppm), 2- $H_{Ar-benz}$ y 6- $H_{Ar-benz}$ (7.81 ppm) con 3- $C_{Ar-benz}$ y 5- $C_{Ar-benz}$ (112.94 ppm), 6- $H_{Ar-piridoxal}$ (8.20 ppm) con C_{Ar-CH_2-OH} (127.01 ppm) y H del HC=N (9.01 ppm) con $C_{Ar-CH=N}$ (136.20 ppm). El espectro también muestra las interacciones a tres enlaces de distancia: 3- $H_{Ar-benz}$ y 5- $H_{Ar-benz}$ (6.66 ppm) con $C_{Ar-C=O}$ (117.32 ppm), 2- $H_{Ar-benz}$ y 6- $H_{Ar-benz}$ (7.81 ppm) con C_{Ar-NH_2} (152.75 ppm), 2- $H_{Ar-benz}$ y 6- $H_{Ar-benz}$ (7.81 ppm) con el C del C=O (162.70 ppm), 6- $H_{Ar-piridoxal}$ (8.20 ppm) con el C del Ar- CH_2-OH (57.99 ppm), 6- $H_{Ar-piridoxal}$ (8.20 ppm) con $C_{Ar-CH=N}$ (136.20 ppm), 6- $H_{Ar-piridoxal}$ (8.20 ppm) con C_{Ar-CH_3} (142.98 ppm), H del HC=N (9.01 ppm) con C_{Ar-CH_2-OH} (127.01 ppm) y H del HC=N (9.01 ppm) con C_{Ar-OH} (152.98 ppm).

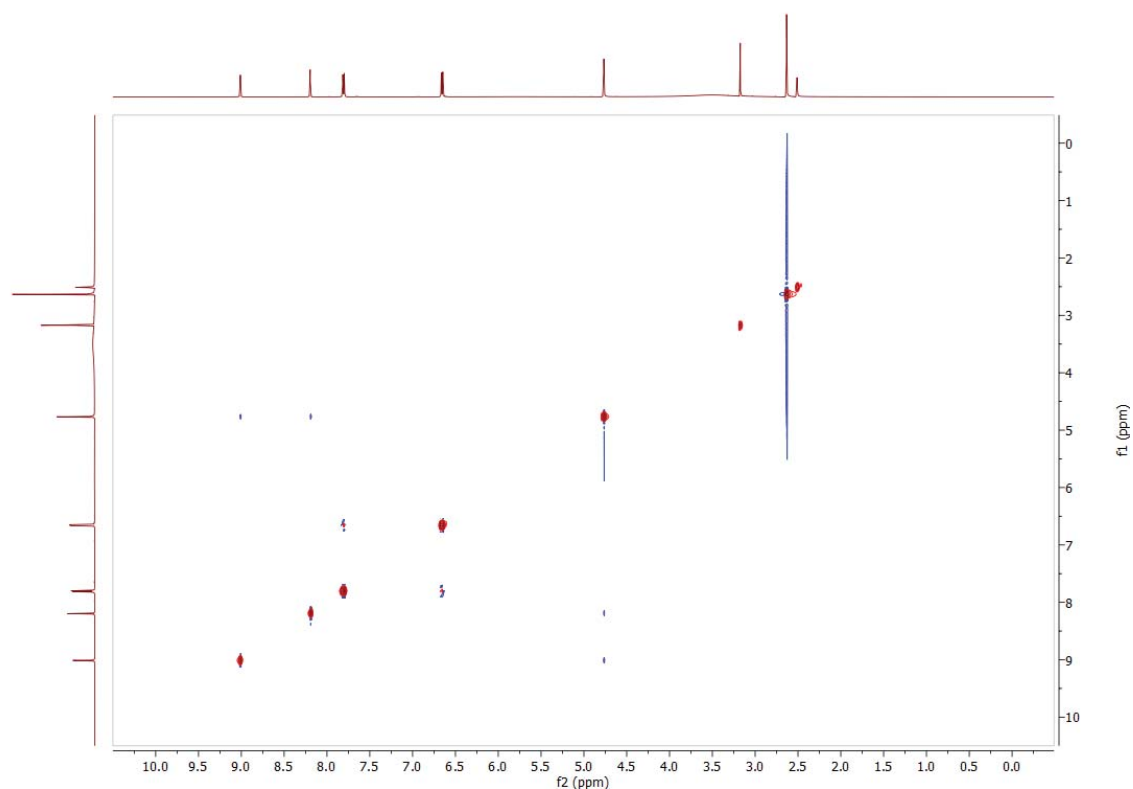


Figura 43. NOESY del compuesto H1. El espectro muestra interacciones entre los hidrógenos del grupo Ar-CH₂-OH (4.77 ppm) y los hidrógenos 6-H_{Ar-piridoxal} (8.20 ppm) y -HC=N (9.01 ppm). Además, se observan interacciones entre 3-H_{Ar-benz}, 5-H_{Ar-benz} (6.66 ppm) y 2-H_{Ar-benz}, 6-H_{Ar-benz} (7.81 ppm). Las interacciones se corresponden a hidrógenos próximos en el espacio.

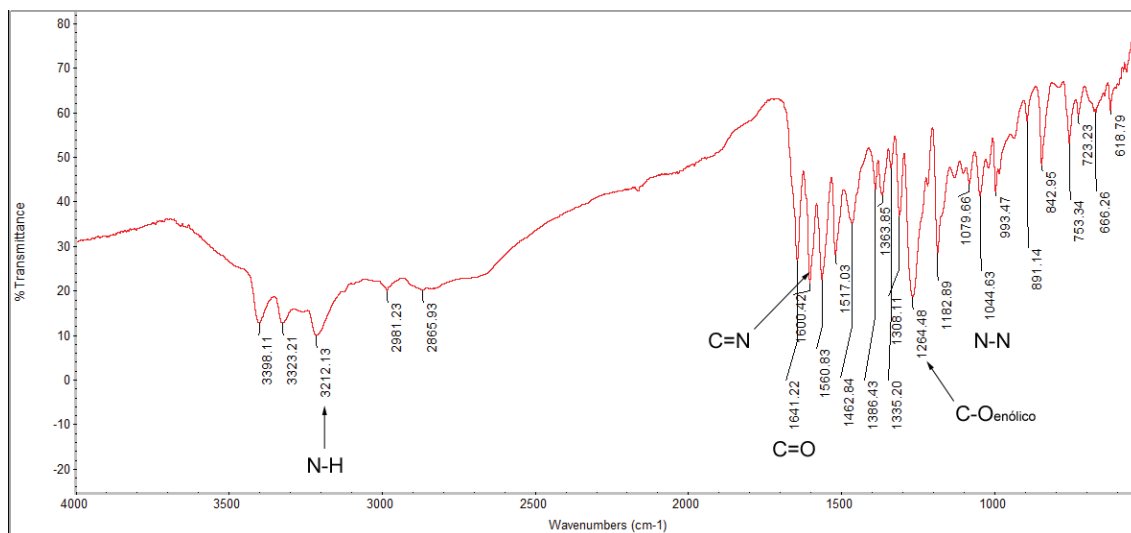


Figura 44. Espectro de infrarrojo del compuesto H1.

7.2. Caracterización estructural del compuesto H2.

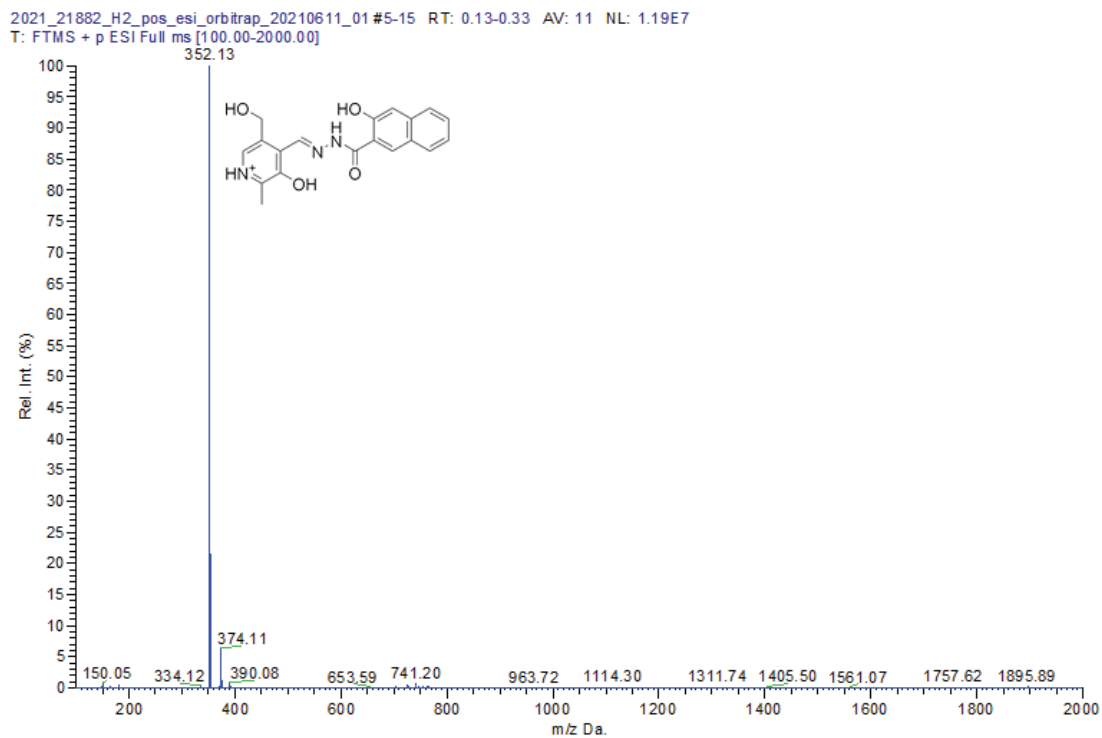


Figura 45. Espectro de masas ESI⁺ del compuesto H2.

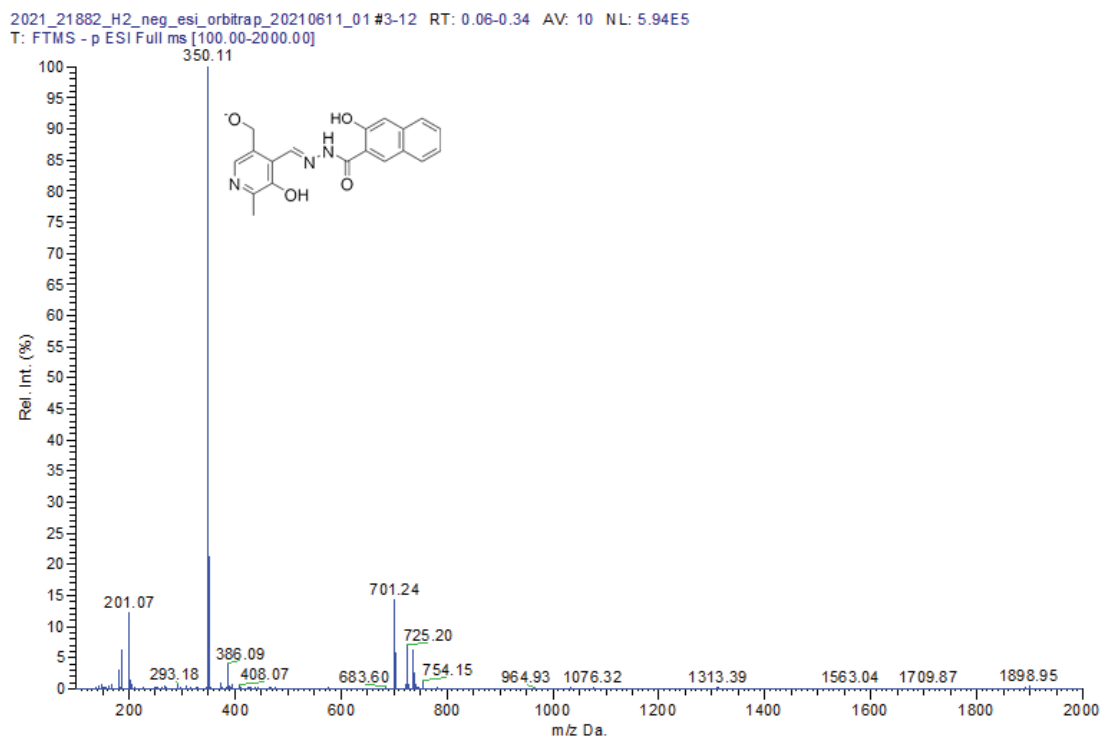


Figura 46. Espectro de masas ESI⁻ del compuesto H2.

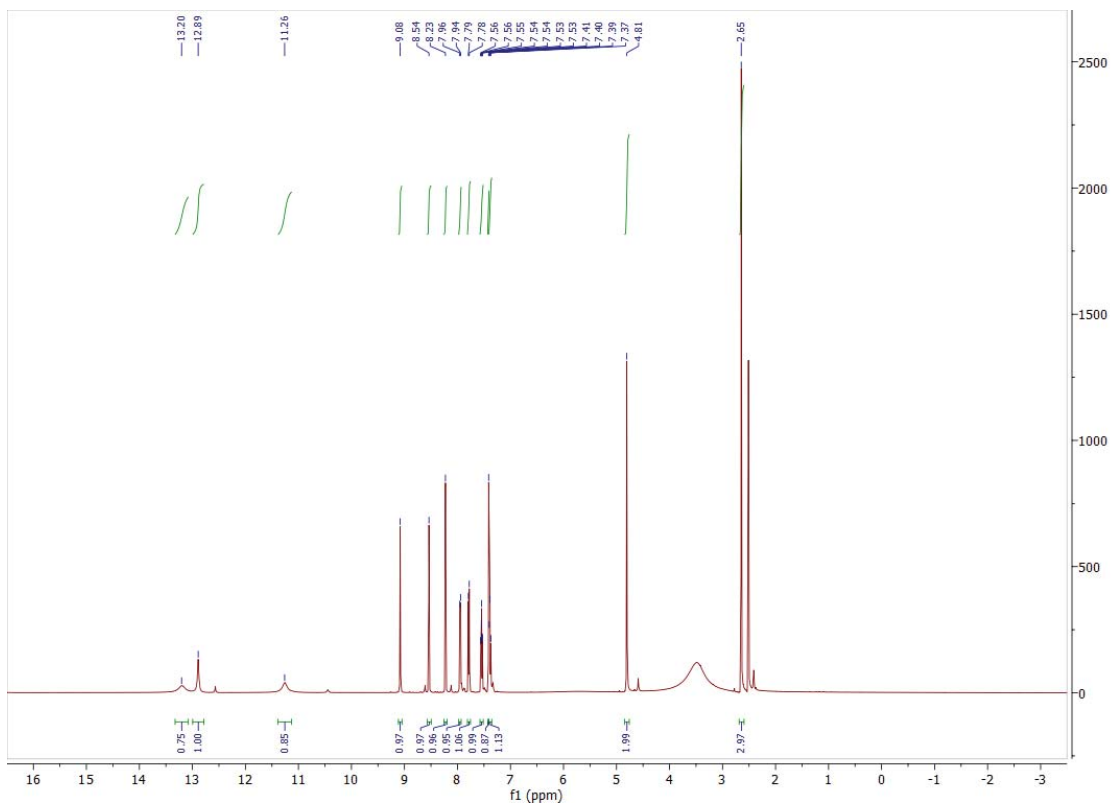


Figura 47. Espectro RMN ^1H del compuesto H2.

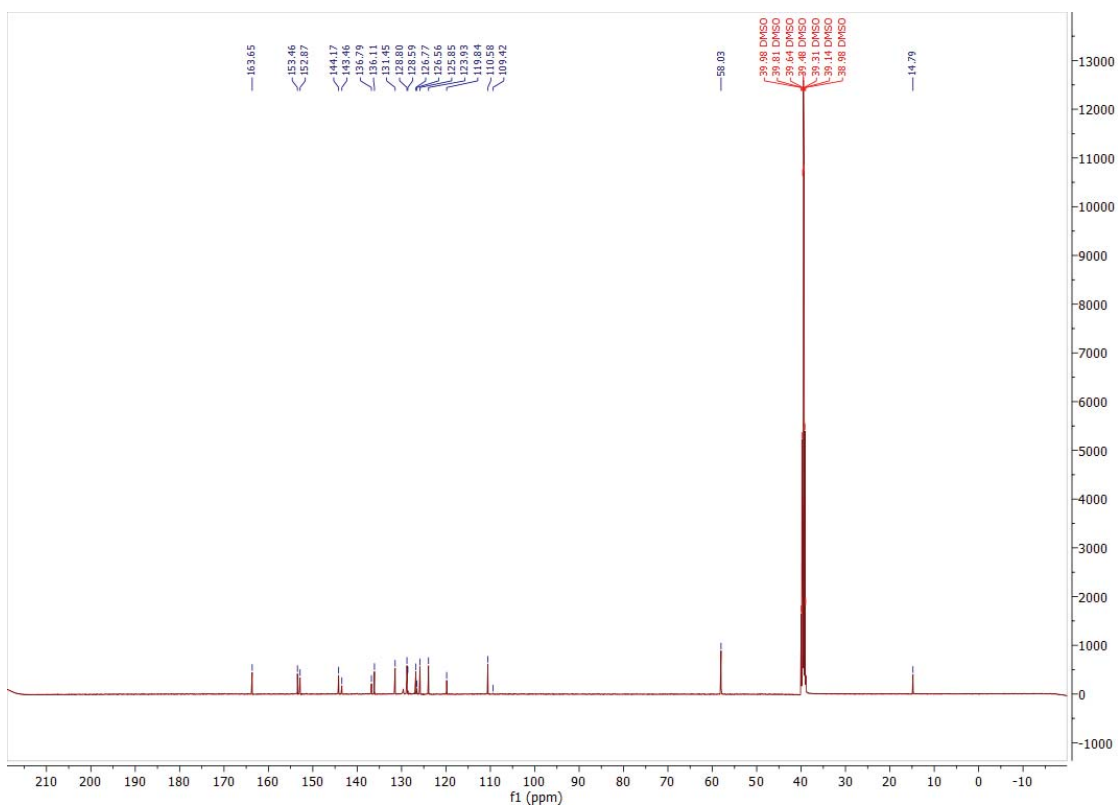


Figura 48. Espectro RMN ^{13}C del compuesto H2.

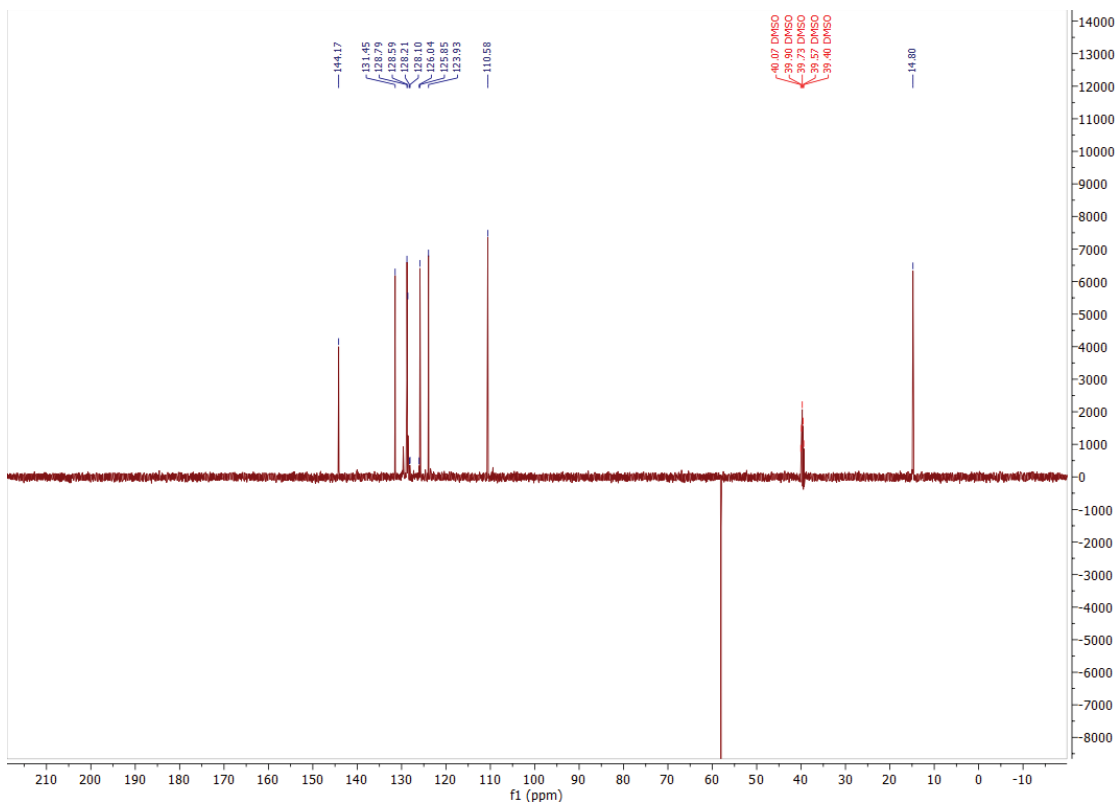


Figura 49. Espectro DEPT del compuesto H2.

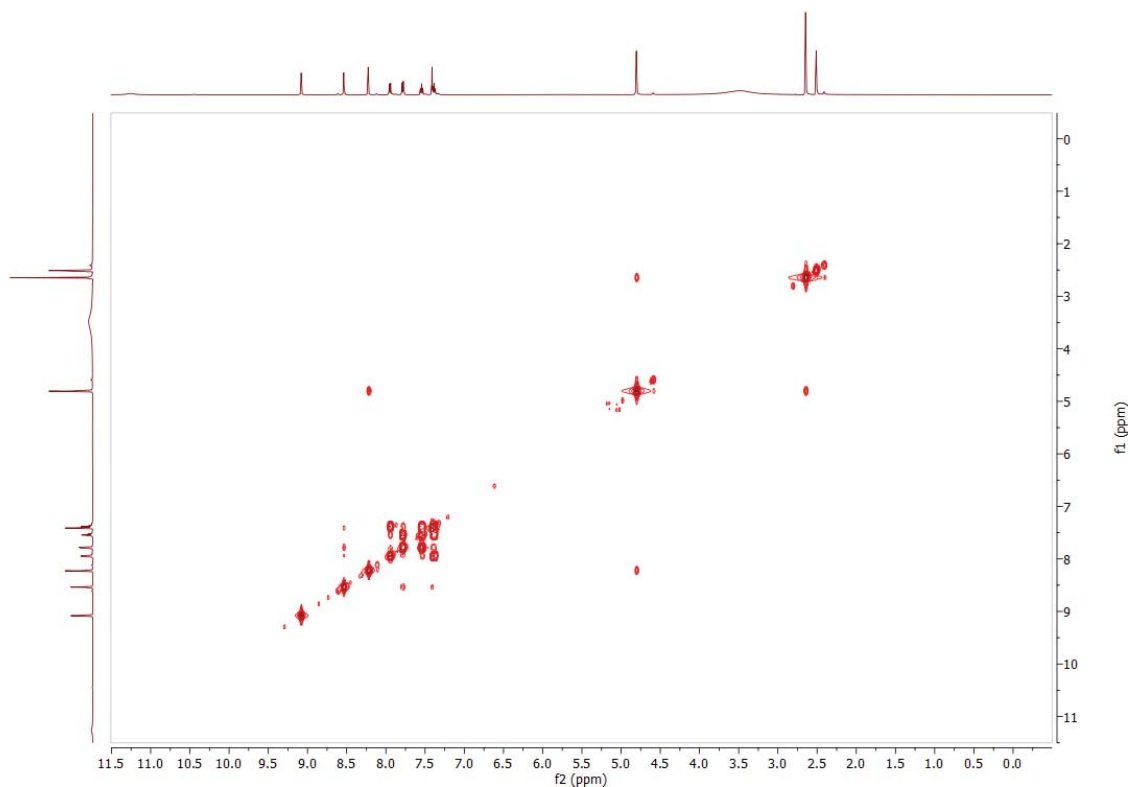


Figura 50. COSY del compuesto H2. El espectro muestra interacciones entre los hidrógenos de los grupos Ar-CH_3 (2.65 ppm) y $\text{Ar-CH}_2\text{-OH}$ (4.81 ppm) del residuo piridoxal. Además, se observan interacciones entre $6\text{-H}_{\text{Ar-piridoxal}}$ (8.23 ppm) y $\text{Ar-CH}_2\text{-OH}$ (4.81 ppm). Las relaciones entre los hidrógenos del grupo hidroxinaftaleno se describen en la Figura 51.

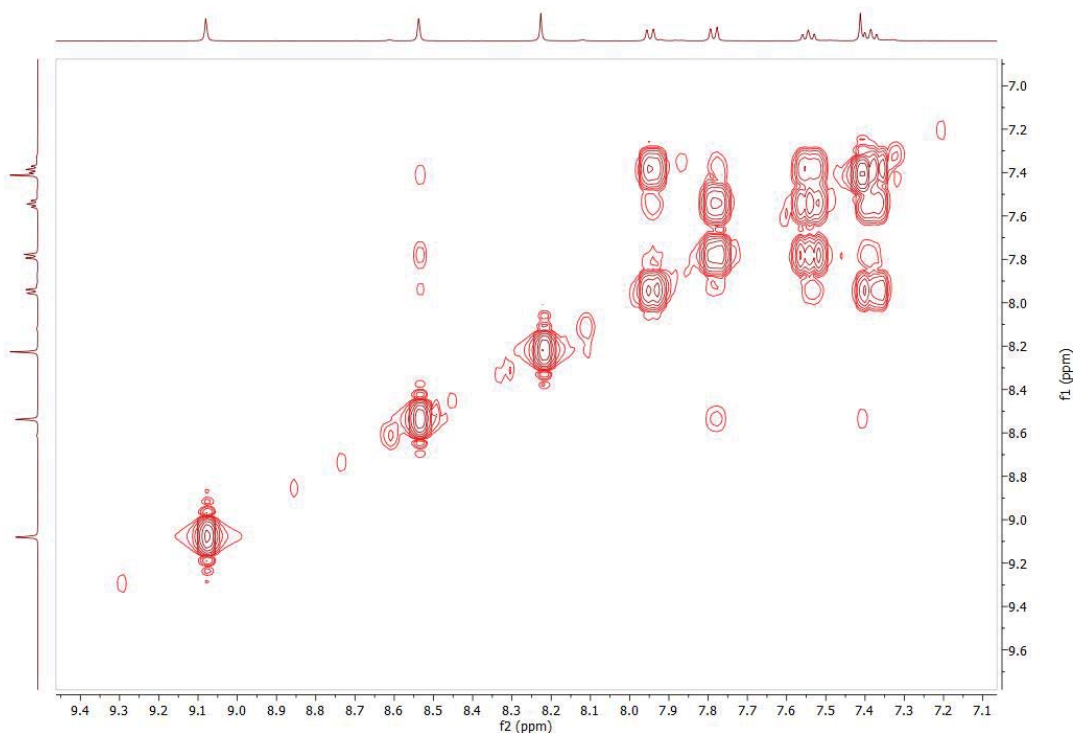


Figura 51. Zoom realizado al COSY del compuesto H2. El espectro muestra múltiples interacciones entre los hidrógenos del grupo hidroxinaftaleno: 5-H (7.39 ppm) con 6-H (7.95 ppm), 5-H (7.39 ppm) con 7-H (7.79 ppm), 5-H (7.39 ppm) con 8-H (7.54 ppm), 8-H (7.54 ppm) con 6-H (7.95 ppm), 8-H (7.54 ppm) con 7-H (7.79 ppm), 1-H (8.54 ppm) con 4-H (7.41 ppm) y 1-H (8.54 ppm) con 7-H (7.79 ppm).

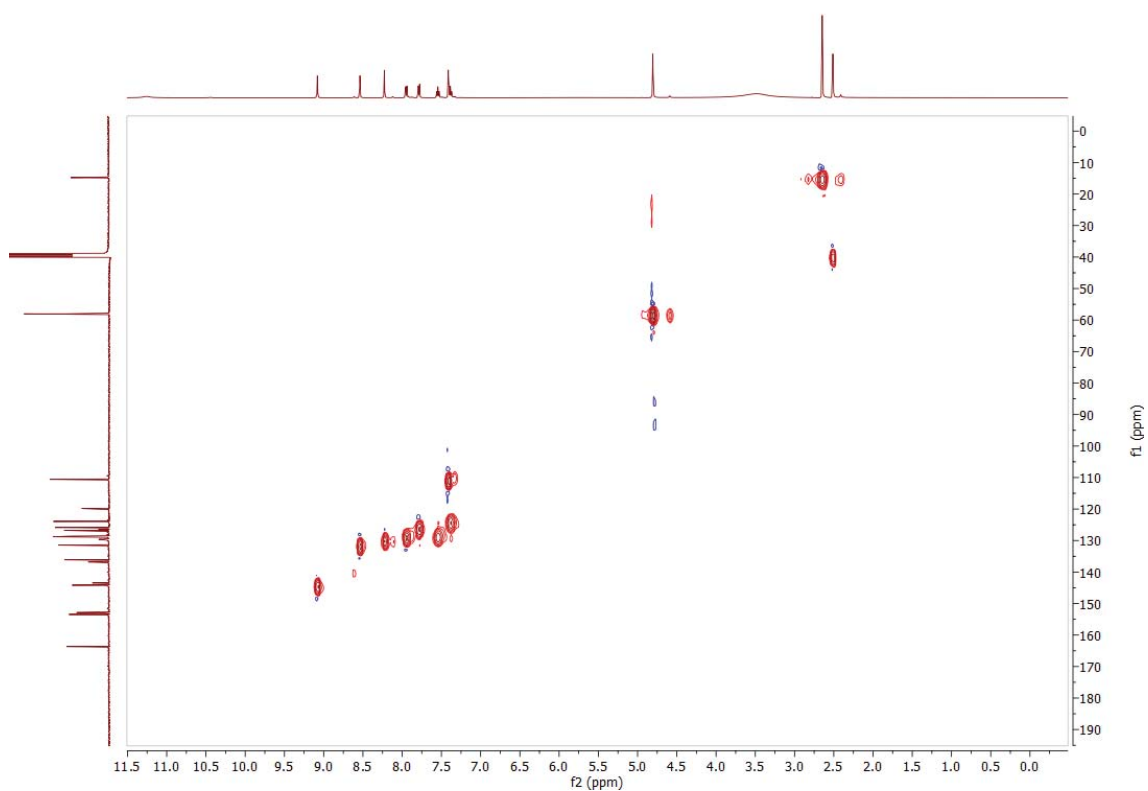


Figura 52. HSQC del compuesto H2. El espectro muestra las interacciones entre hidrógenos y carbonos a un enlace de distancia: Ar-CH₃ (¹H: 2.65 y ¹³C: 14.79 ppm), Ar-CH₂-OH (¹H: 4.81 y ¹³C: 58.03 ppm), 5-HC_{Ar-naft} (¹H: 7.39 y ¹³C: 123.93 ppm), 4-HC_{Ar-naft} (¹H: 7.41 y ¹³C: 110.58 ppm), 8-HC_{Ar-naft} (¹H: 7.54 y ¹³C: 128.80 ppm), 7-HC_{Ar-naft} (¹H: 7.79 y ¹³C: 125.85 ppm), 6-HC_{Ar-naft} (¹H: 7.95 y ¹³C: 128.59 ppm), 6-HC_{Ar-piridoxal} (¹H: 8.23 y ¹³C: 131.45 ppm), 1-HC_{Ar-naft} (¹H: 8.54 y ¹³C: 126.56 ppm) y -CH=N (¹H: 9.08 y ¹³C: 144.17 ppm).

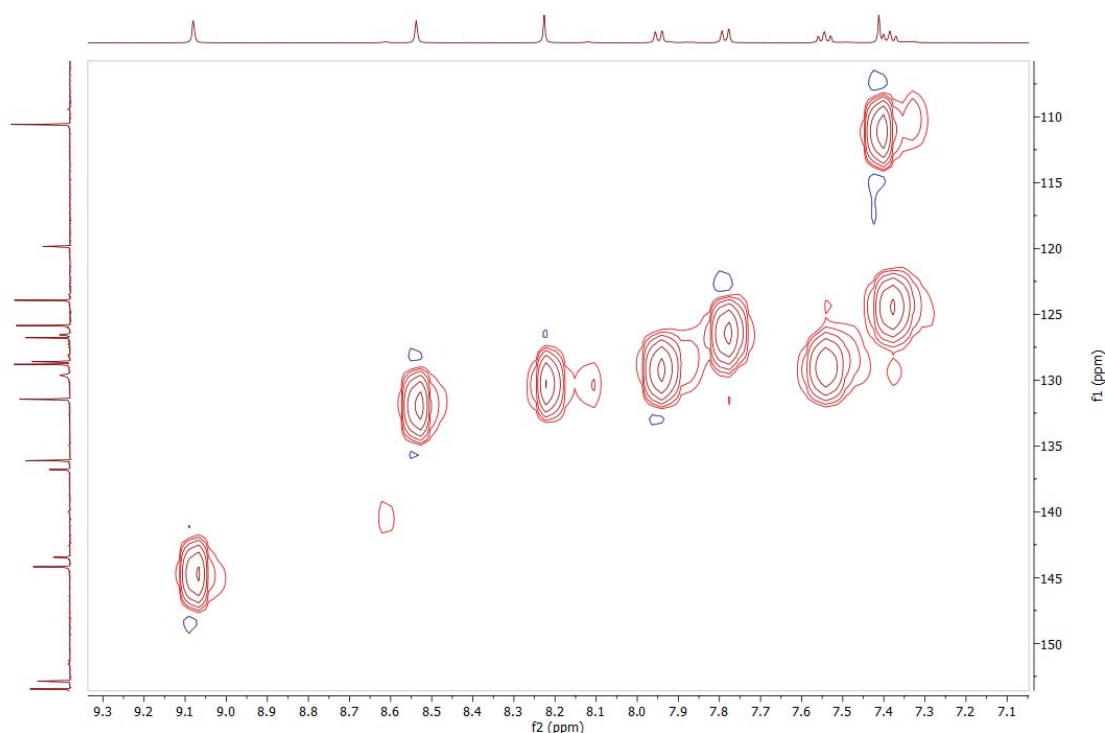


Figura 53. Zoom realizado al HSQC del compuesto H2 en la zona correspondiente al grupo hidroxinaftaleno.

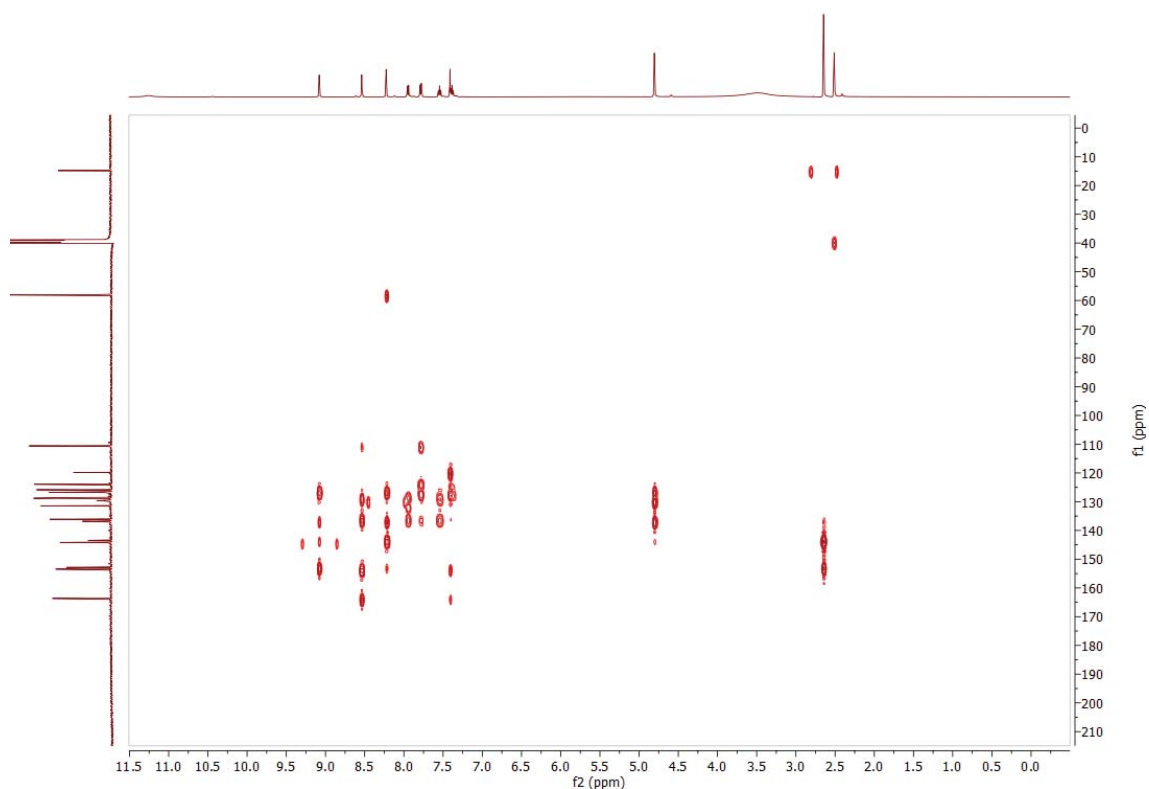


Figura 54. HMBC del compuesto H2. El espectro muestra las interacciones entre hidrógenos y carbonos a dos y tres enlaces de distancia: H del CH₃ (2.65 ppm) con C_{Ar-CH₃} (143.46 ppm), H del CH₃ (2.65 ppm) con C_{piridoxal-OH} (152.87 ppm), H del CH₂ (4.81 ppm) con C_{Ar-CH₂-OH} (126.77 ppm), H del CH₂ (4.81 ppm) con C_{Ar-CH=N} (136.79 ppm) y 6-H_{Ar-piridoxal} (8.23 ppm) con Ar-CH₂-OH (58.03 ppm). El resto de relaciones observadas se describen en la Figura 55.

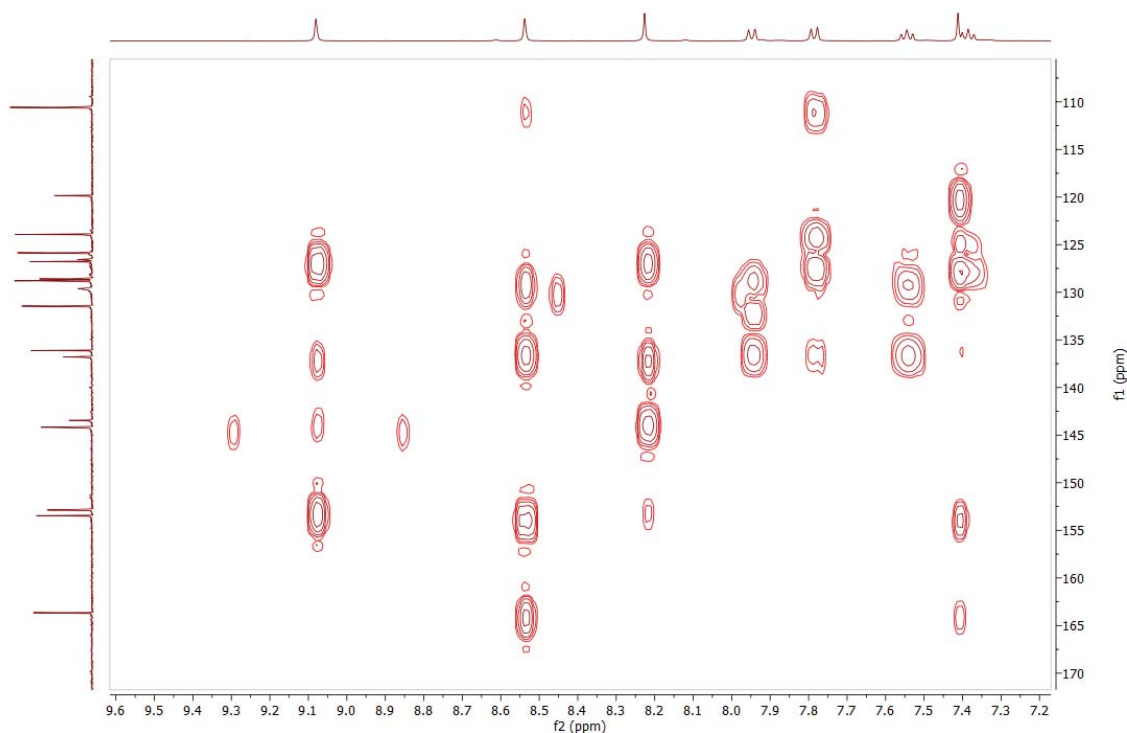


Figura 55. Zoom realizado al HMBC del compuesto H2. El espectro muestra interacciones entre hidrógenos y carbonos a dos enlaces de distancia: 5- $H_{Ar-naft}$ (7.39 ppm) con 6- $C_{Ar-naft}$ (128.59 ppm), 4- $H_{Ar-naft}$ (7.41 ppm) con $C_{Ar-naft}$ (136.11 ppm), 4- $H_{Ar-naft}$ (7.41 ppm) con $C_{Ar-naft-OH}$ (153.46 ppm), 8- $H_{Ar-naft}$ (7.54 ppm) con 7- $C_{Ar-naft}$ (125.85 ppm), 7- $H_{Ar-naft}$ (7.79 ppm) con 6- $C_{Ar-naft}$ (128.59 ppm), 6- $H_{Ar-piridoxal}$ (8.23 ppm) con C_{Ar-CH_2-OH} (126.77 ppm) y el H del HC=N (9.08 ppm) con $C_{Ar-CH=N}$ (136.79 ppm). El espectro también muestra las interacciones a tres enlaces de distancia: 5- $H_{Ar-naft}$ (7.39 ppm) con 7- $C_{Ar-naft}$ (125.85 ppm), 4- $H_{Ar-naft}$ (7.41 ppm) con $C_{Ar-C=O}$ (119.84 ppm), 4- $H_{Ar-naft}$ (7.41 ppm) con 5- $C_{Ar-naft}$ (123.93 ppm), 8- $H_{Ar-naft}$ (7.54 ppm) con 6- $C_{Ar-naft}$ (128.59 ppm), 8- $H_{Ar-naft}$ (7.54 ppm) con $C_{Ar-naft}$ (136.11 ppm), 7- $H_{Ar-naft}$ (7.79 ppm) con 5- $C_{Ar-naft}$ (123.93 ppm), 6- $H_{Ar-naft}$ (7.95 ppm) con 8- $C_{Ar-naft}$ (128.80 ppm), 6- $H_{Ar-naft}$ (7.95 ppm) con $C_{Ar-naft}$ (136.11 ppm), 6- $H_{Ar-piridoxal}$ (8.23 ppm) con $C_{Ar-CH=N}$ (136.79 ppm), 6- $H_{Ar-piridoxal}$ (8.23 ppm) con C_{Ar-CH_3} (143.46 ppm), 1- $H_{Ar-naft}$ (8.54 ppm) con 8- $C_{Ar-naft}$ (128.80 ppm), 1- $H_{Ar-naft}$ (8.54 ppm) con $C_{Ar-naft}$ (136.11 ppm), 1- $H_{Ar-naft}$ (8.54 ppm) con $C_{Ar-naft-OH}$ (153.46 ppm), 1- $H_{Ar-naft}$ (8.54 ppm) con C=O (163.65 ppm), H del HC=N (9.08 ppm) con C_{Ar-CH_2-OH} (126.77 ppm) y H del HC=N (9.08 ppm) con $C_{piridoxal-OH}$ (152.87 ppm).

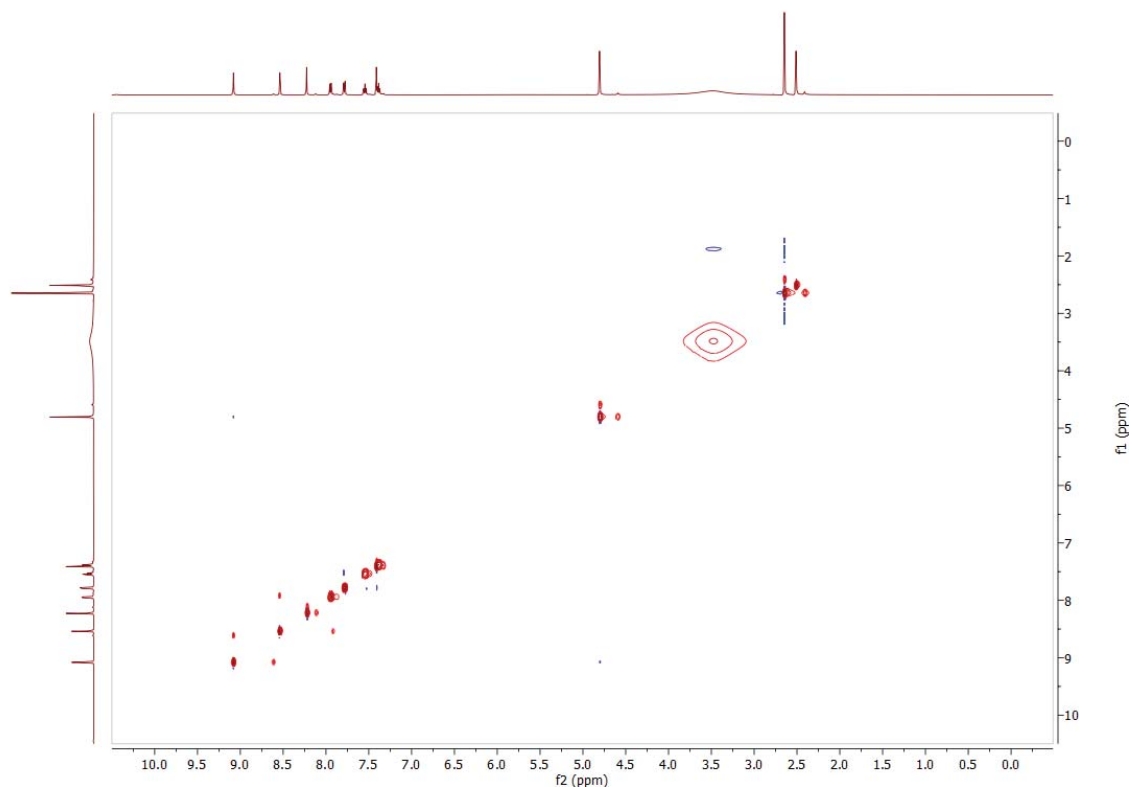


Figura 56. NOESY del compuesto H2. El espectro muestra interacciones entre los hidrógenos de los grupos Ar-CH₂-OH (4.81 ppm) y -HC=N (9.08 ppm). Además, se observan interacciones entre 8-H_{Ar-naft} (7.54 ppm) y 7-H_{Ar-naft} (7.79 ppm) y 6-H_{Ar-naft} (7.95 ppm) y 1-H_{Ar-naft} (8.54 ppm). Las interacciones se corresponden a hidrógenos próximos en el espacio.

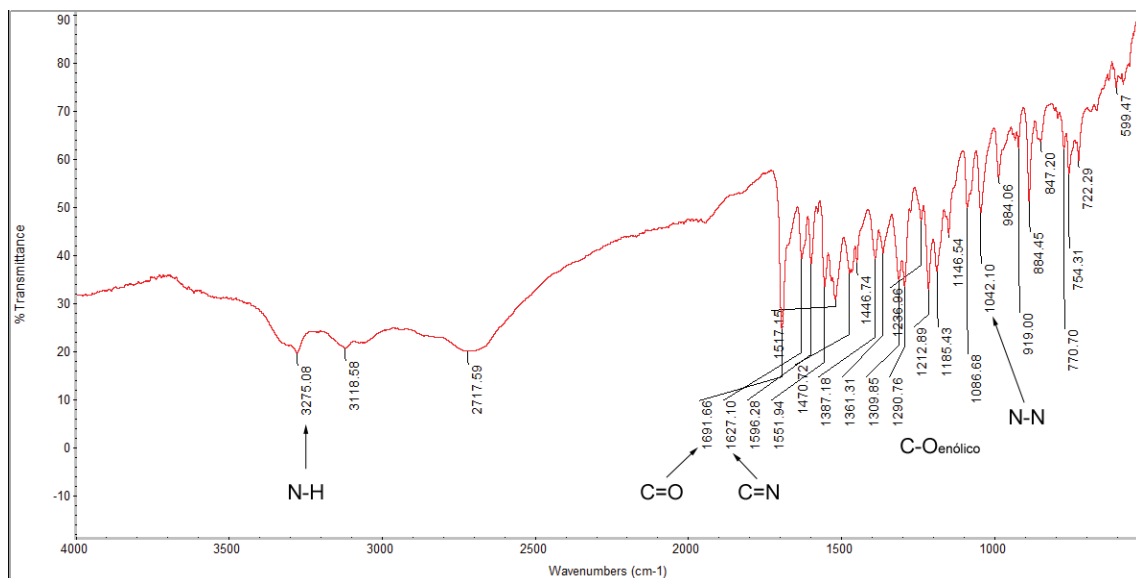


Figura 57. Espectro de infrarrojo del compuesto H2.

7.3. Caracterización estructural del compuesto AL2.

2021_03840_AL2-c_pos_esi_orbitrap_20210217_01#7-19 RT: 0.18-0.40 AV: 13 NL: 2.45E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

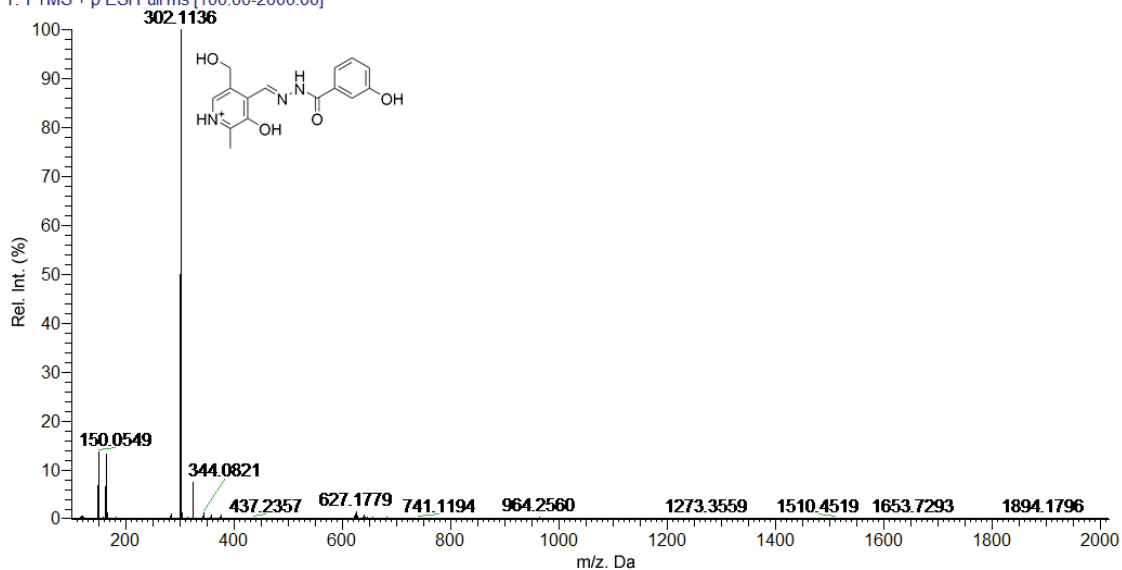


Figura 58. Espectro de masas ESI⁺ del compuesto AL2.

2021_03840_AL2-c_neg_esi_orbitrap_20210217_01#4-14 RT: 0.10-0.36 AV: 11 NL: 1.92E6
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]

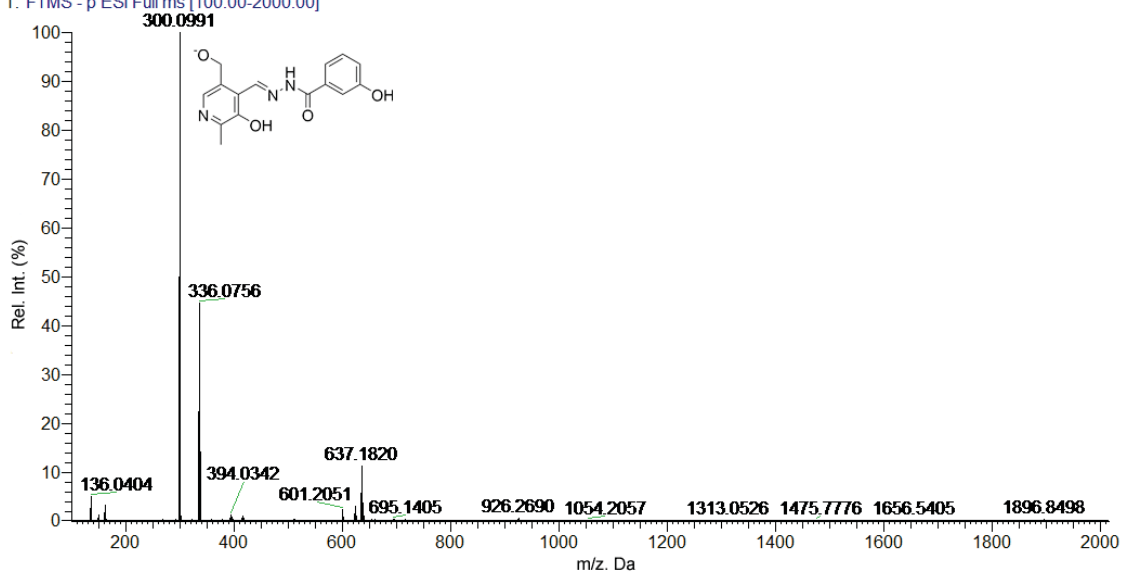


Figura 59. Espectro de masas ESI⁻ del compuesto AL2.

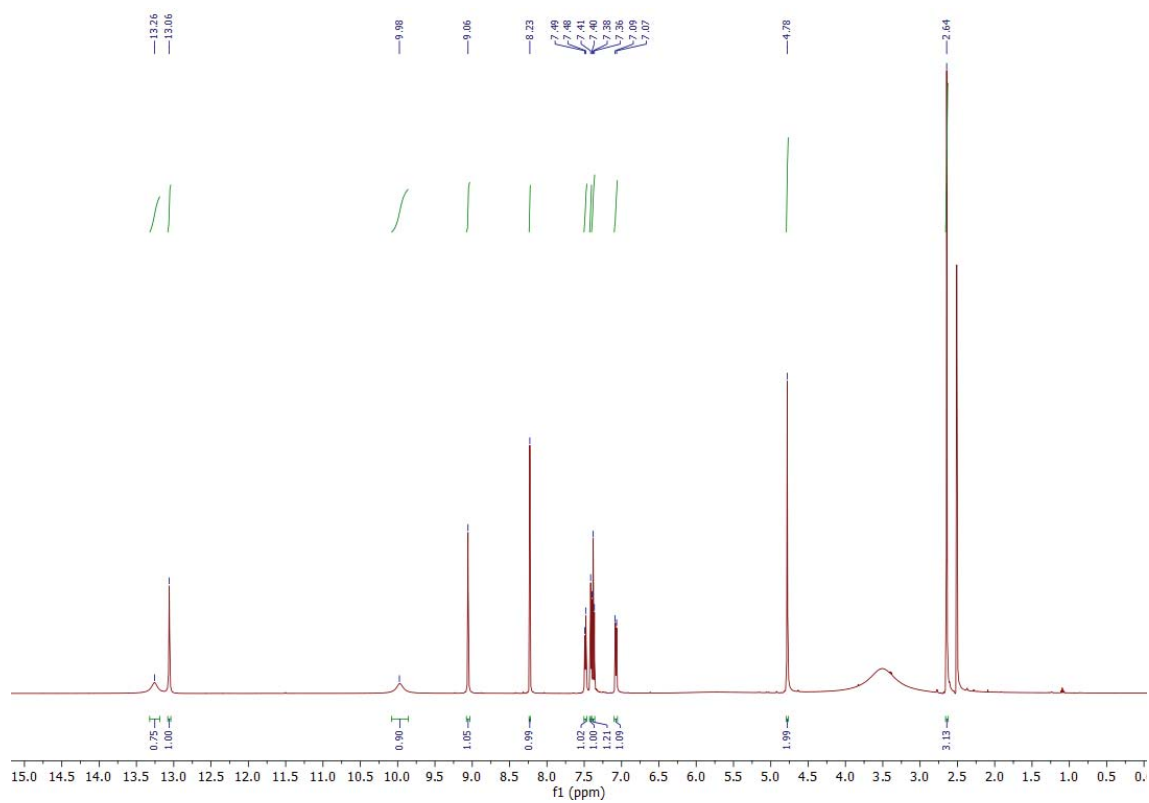


Figura 60. Espectro RMN ^1H del compuesto AL2.

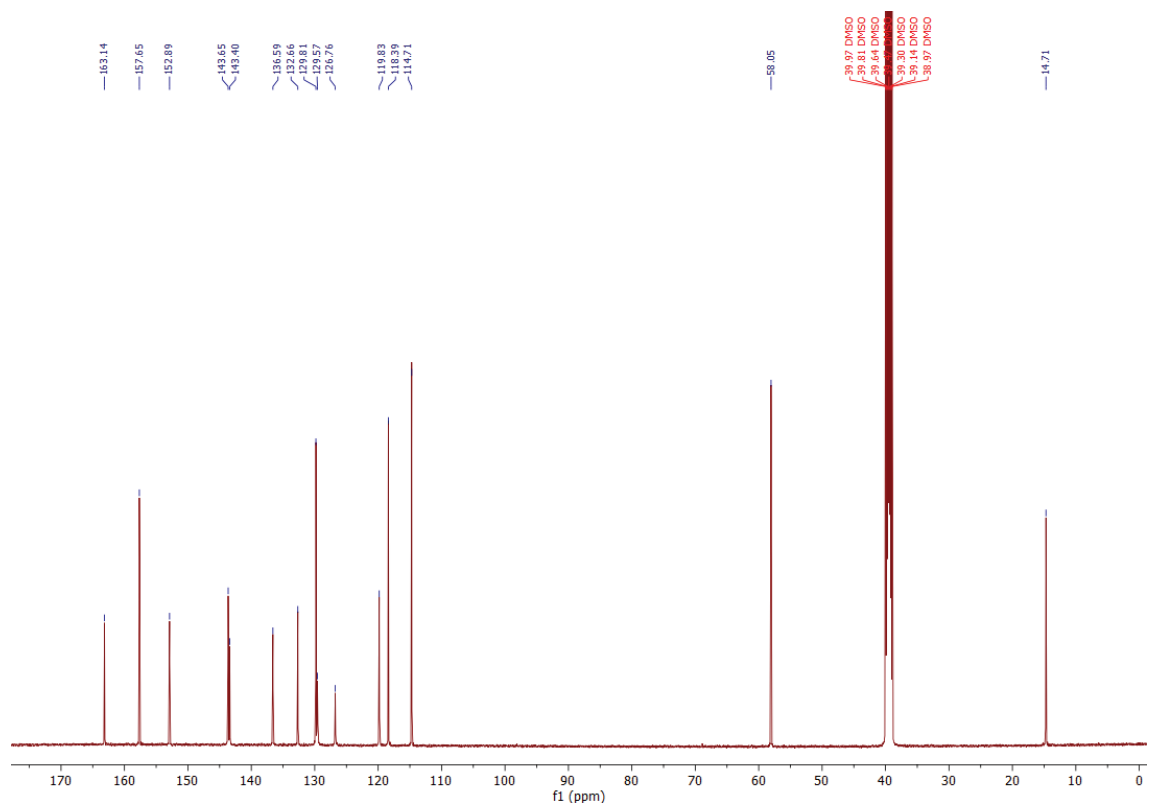


Figura 61. Espectro RMN ^{13}C del compuesto AL2.

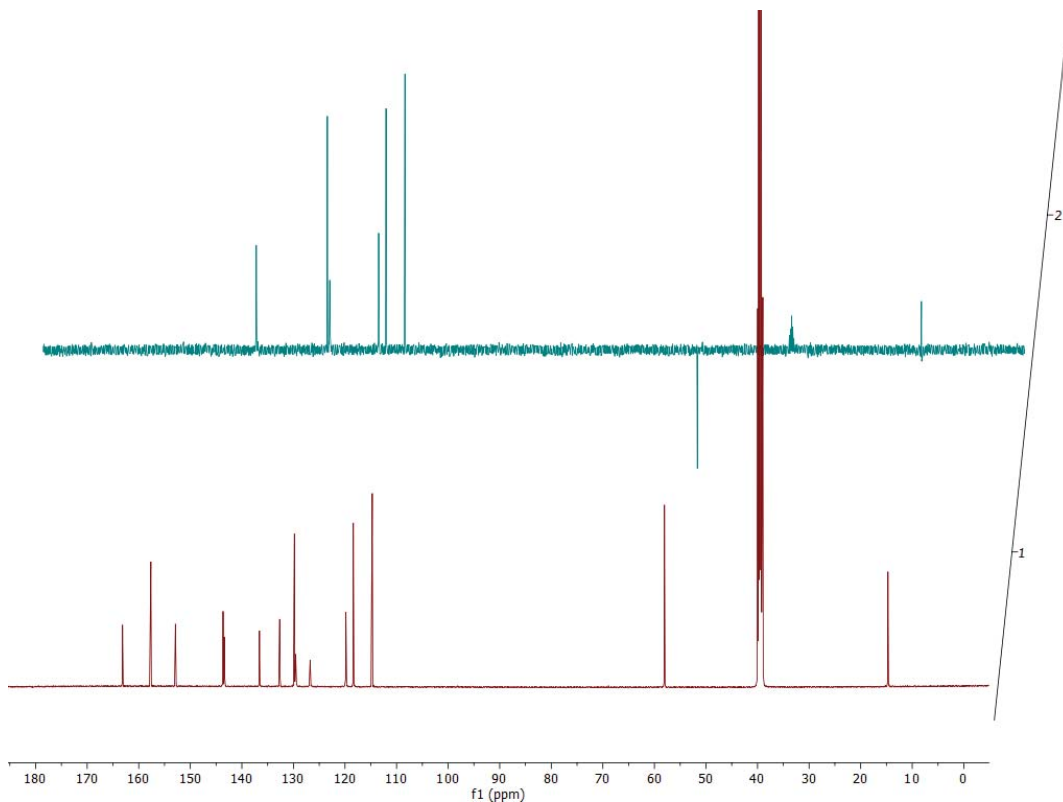


Figura 62. Espectro DEPT del compuesto AL2.

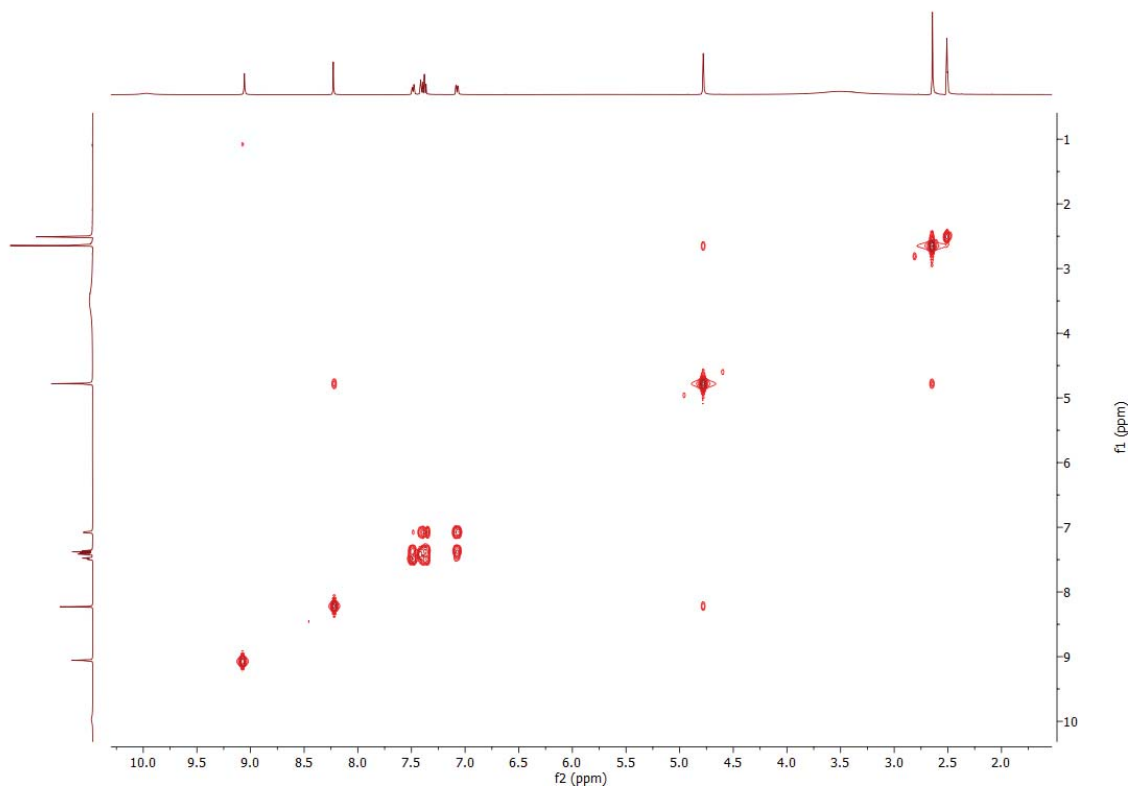


Figura 63. COSY del compuesto AL2. El espectro muestra interacciones entre los hidrógenos del grupo piridoxal: 6-H_{Ar-piridoxal} (8.23 ppm) y Ar-CH₂-OH (4.78 ppm). También se observan interacciones entre Ar-CH₃ (2.64 ppm) y Ar-CH₂-OH (4.78 ppm). Las relaciones entre los hidrógenos del grupo hidroxibenzoico se describen en la Figura 64.

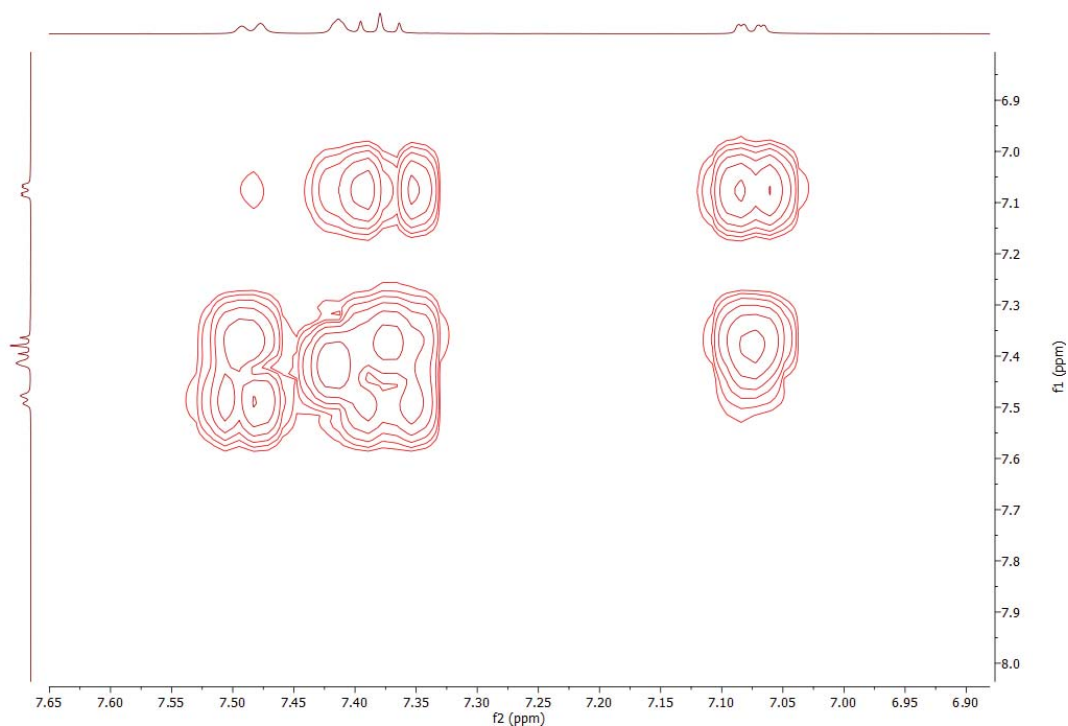


Figura 64. Zoom realizado al COSY del compuesto AL2. El espectro muestra múltiples interacciones entre los hidrógenos del grupo hidroxibenzoico. 4-H (7.41 ppm) con 2-H (7.08 ppm), 4-H (7.41 ppm) con 5-H (7.38 ppm), 4-H (7.41 ppm) con 6-H (7.49 ppm) y 5-H (7.38 ppm) con 6-H (7.49 ppm).

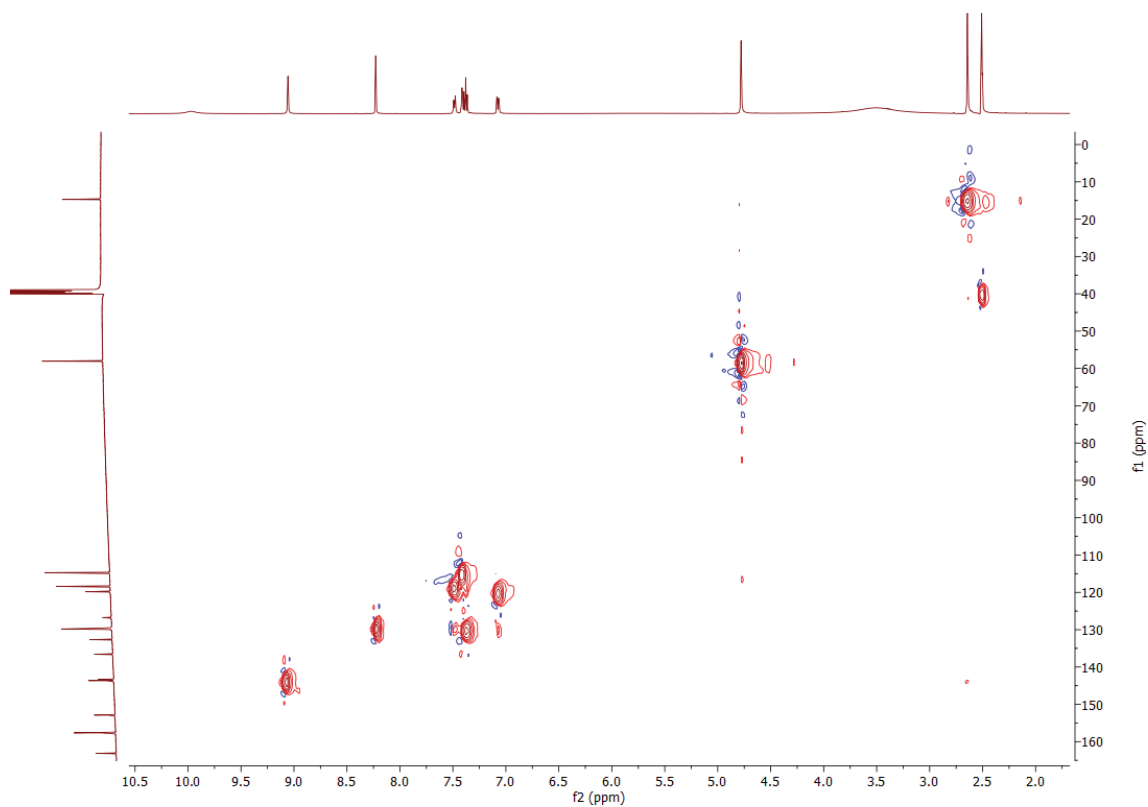


Figura 65. HSQC del compuesto AL2. El espectro muestra las interacciones entre hidrógenos y carbonos a un enlace de distancia: Ar-CH₃ (¹H: 2.64 y ¹³C: 14.71 ppm), Ar-CH₂-OH (¹H: 4.78 y ¹³C: 58.05 ppm), 2-HC_{Ar-benz} (¹H: 7.08 y ¹³C: 114.71 ppm), 5-HC_{Ar-benz} (¹H: 7.38 y ¹³C: 129.81 ppm), 4-HC_{Ar-benz} (¹H: 7.41 y ¹³C: 119.83 ppm), 6-HC_{Ar-benz} (¹H: 7.49 y ¹³C: 118.39 ppm), 6-HC_{Ar-piridoxal} (¹H: 8.23 y ¹³C: 129.57 ppm) y -CH=N (¹H: 9.06 y ¹³C: 143.65 ppm).

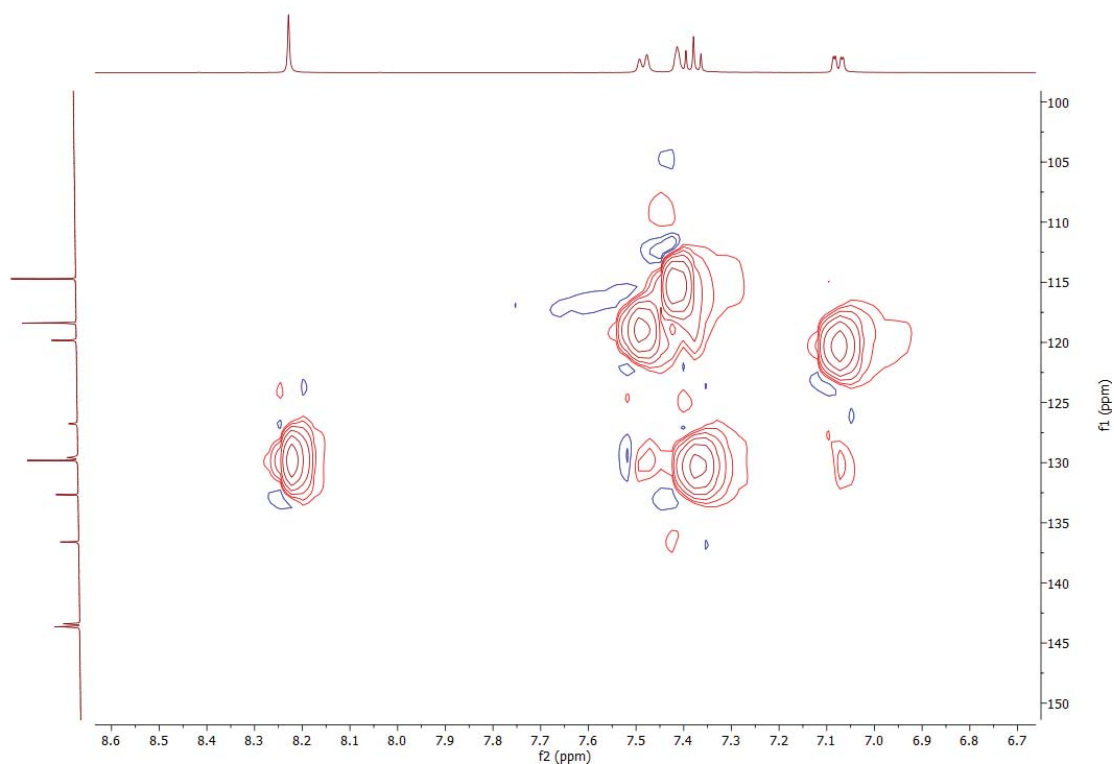


Figura 66. Zoom realizado al HSQC del compuesto AL2 en la zona correspondiente al grupo hidroxibenzoico.

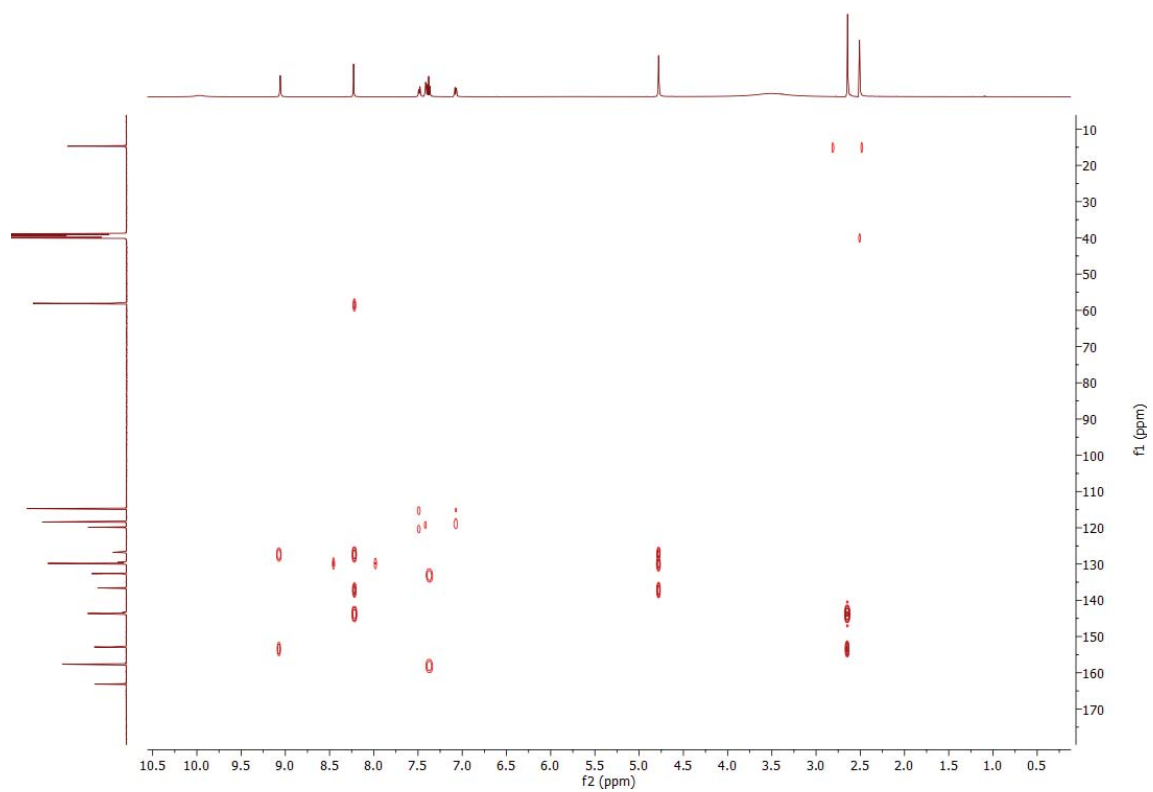


Figura 67. HMBC del compuesto AL2. El espectro muestra las interacciones entre hidrógenos y carbonos a dos y tres enlaces de distancia. Las relaciones se describen en la Figura 68.

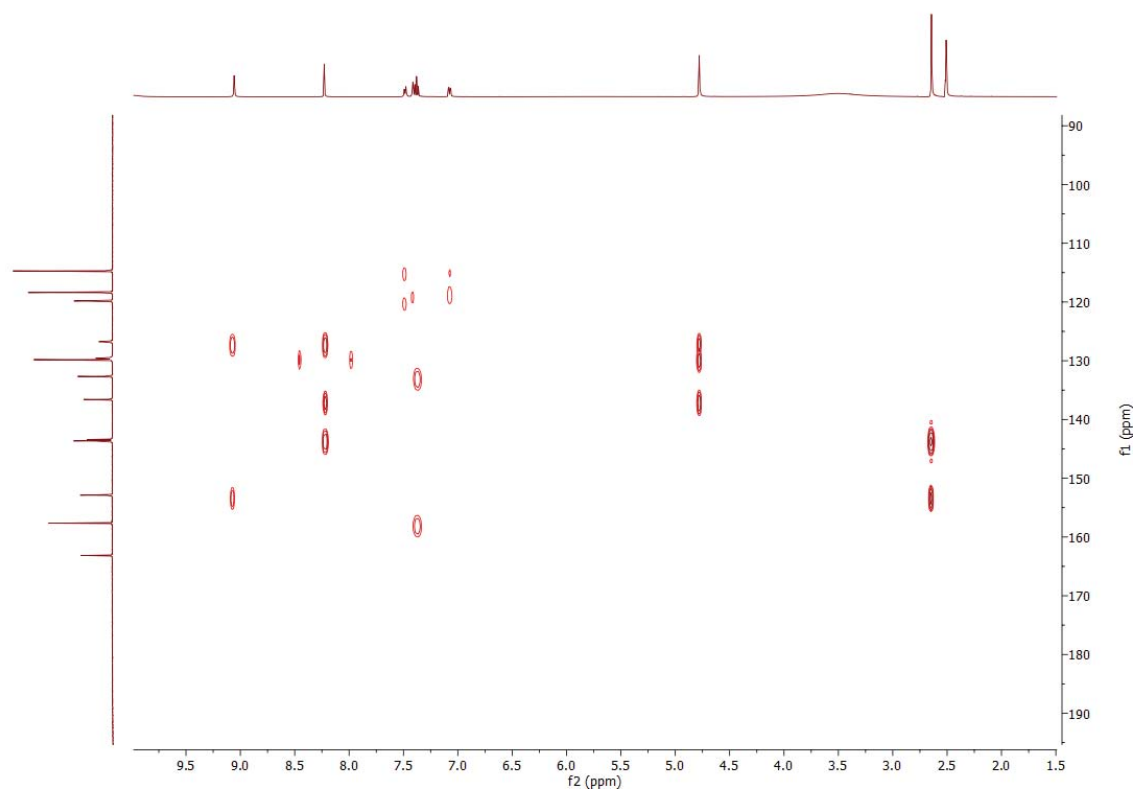


Figura 68. Zoom realizado al HMBC del compuesto AL2. El espectro muestra interacciones entre hidrógenos y carbonos a dos enlaces de distancia: H del CH₃ (2.64 ppm) con C_{Ar-CH₃} (143.40 ppm), H del CH₂ (4.78 ppm) con C_{Ar-CH₂-OH} (126.76 ppm) y 6-H_{Ar-piridoxal} (8.23 ppm) con C_{Ar-CH₂-OH} (126.76 ppm). El espectro también muestra las interacciones a tres enlaces de distancia: H del CH₃ (2.64 ppm) con C_{Ar-OH} (152.89 ppm), H del CH₂ (4.78 ppm) con 6-C_{piridoxal} (129.57 ppm), H del CH₂ (4.78 ppm) con C_{Ar-CH=N} (136.59 ppm), 2-H_{Ar-benz} (7.08 ppm) con 6-C_{Ar-benz} (118.39 ppm), 5-H_{Ar-benz} (7.38 ppm) con C_{Ar-C=O} (132.66 ppm), 5-H_{Ar-benz} (7.38 ppm) con C_{Ar-benz-OH} (157.65 ppm), 4-H_{Ar-benz} (7.41 ppm) con 2-C_{Ar-benz} (114.71 ppm), 4-H_{Ar-benz} (7.41 ppm) con 6-C_{Ar-benz} (118.39 ppm), 6-H_{Ar-benz} (7.49 ppm) con 2-C_{Ar-benz} (114.71 ppm), 6-H_{Ar-benz} (7.49 ppm) con 4-C_{Ar-benz} (119.83 ppm), 6-H_{Ar-piridoxal} (8.23 ppm) con el C del Ar-CH₂-OH (58.05 ppm), 6-H_{Ar-piridoxal} (8.23 ppm) con C_{Ar-CH=N} (136.59 ppm), 6-H_{Ar-piridoxal} (8.23 ppm) con C_{Ar-CH₃} (143.40 ppm), H del HC=N (9.06 ppm) con C_{Ar-CH₂-OH} (126.76 ppm) y H del HC=N (9.06 ppm) con C_{piridoxal-OH} (152.89 ppm).

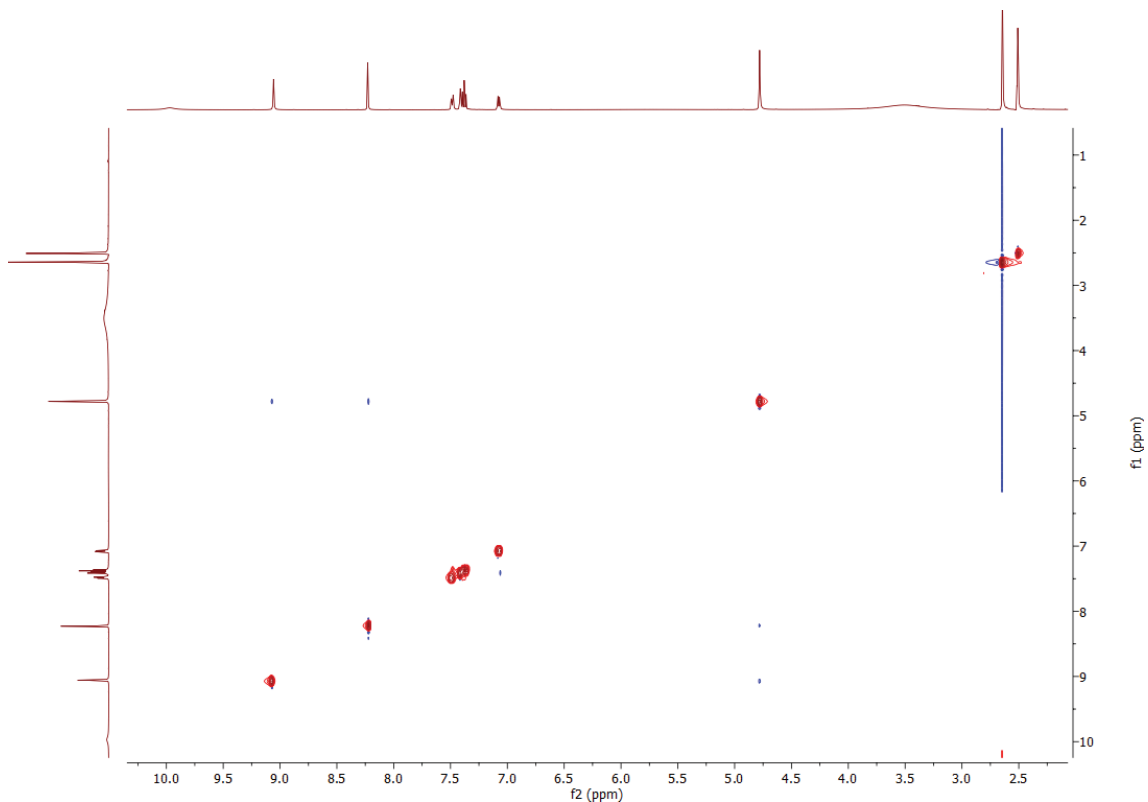


Figura 69. NOESY del compuesto AL2. El espectro muestra interacciones entre los hidrógenos del grupo Ar-CH₂-OH (4.78 ppm) y los hidrógenos -HC=N (9.06 ppm) y 6-H_{Ar-piridoxal} (8.23 ppm). Además, se observan interacciones entre 4-H_{Ar-benz} (7.41 ppm) y 5-H_{Ar-benz} (7.38 ppm). Las interacciones se corresponden a hidrógenos próximos en el espacio.

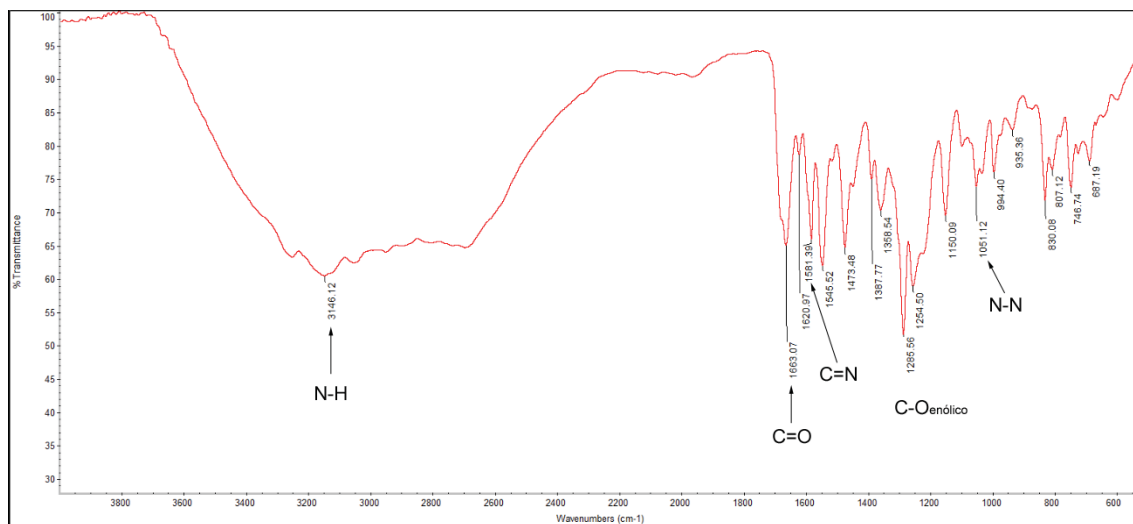


Figura 70. Espectro de infrarrojo del compuesto AL2.

7.4. Caracterización estructural del compuesto AR8.

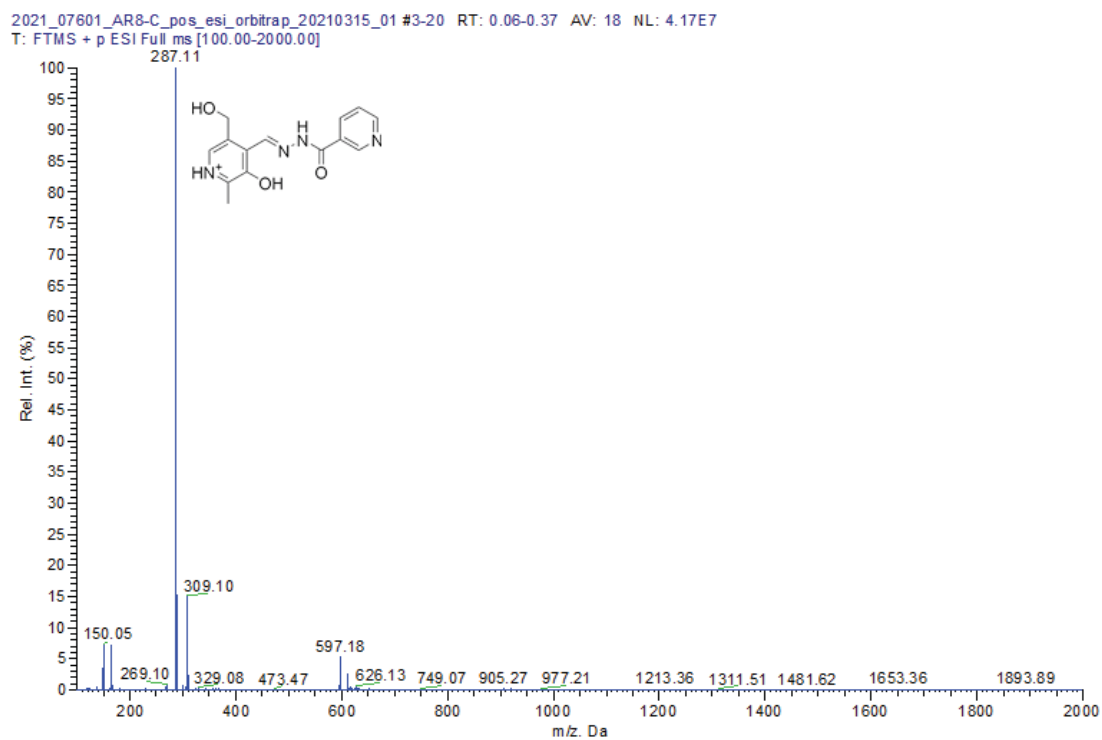


Figura 71. Espectro de masas ESI⁺ del compuesto AR8.

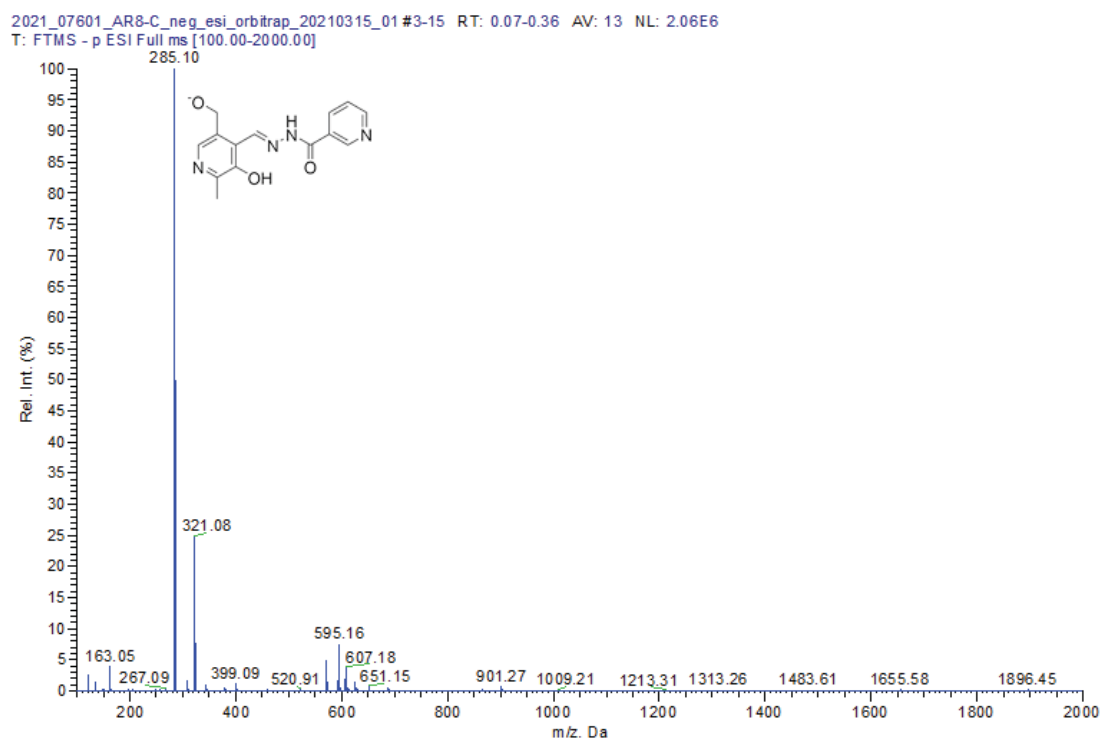


Figura 72. Espectro de masas ESI⁻ del compuesto AR8.

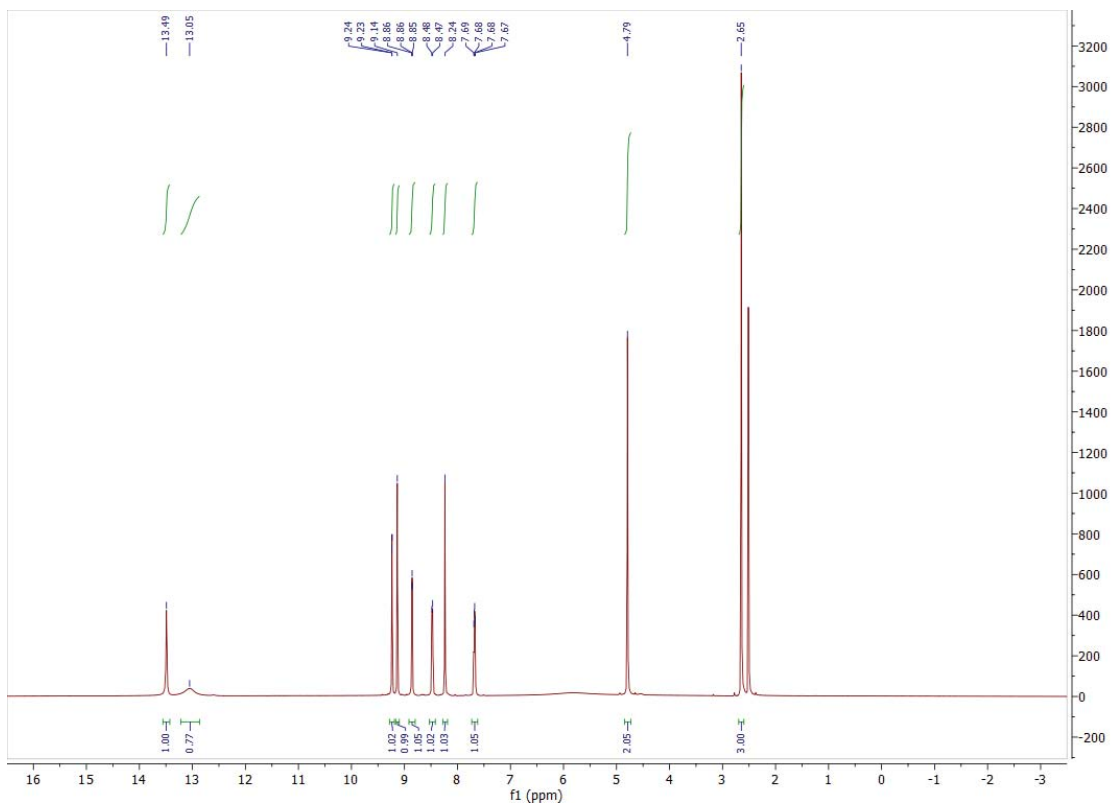


Figura 73. Espectro RMN ^1H del compuesto AR8.

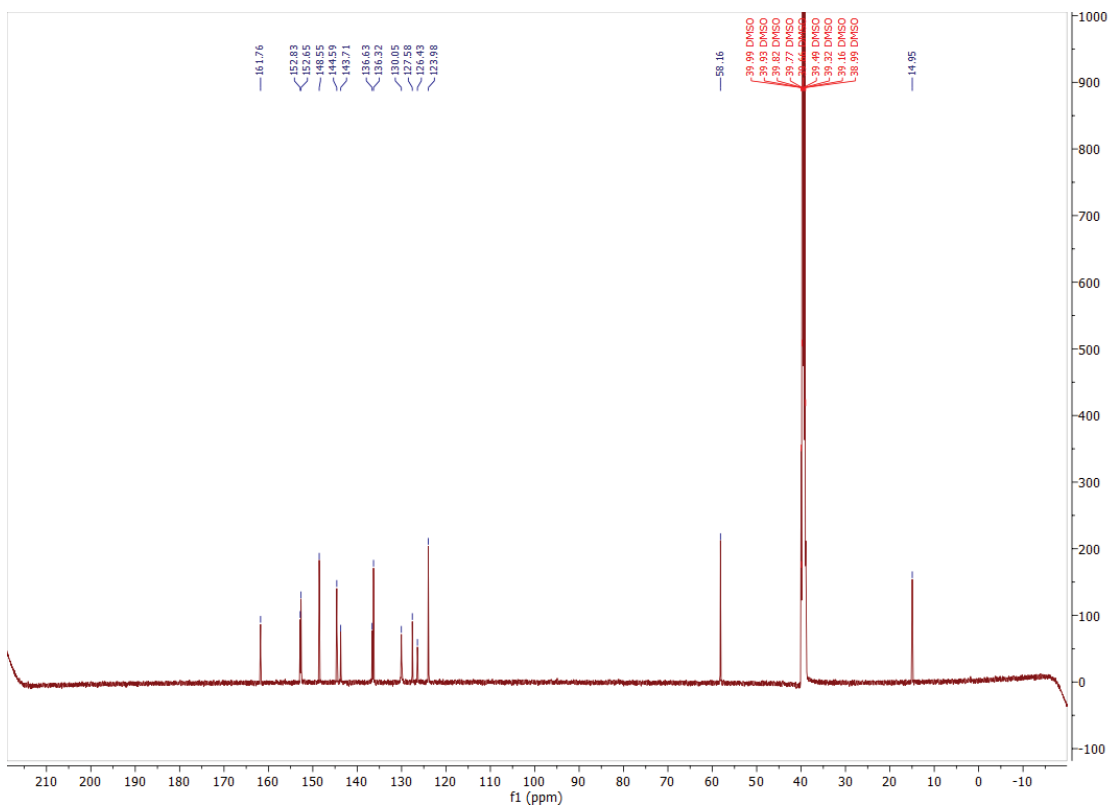


Figura 74. Espectro RMN ^{13}C del compuesto AR8.

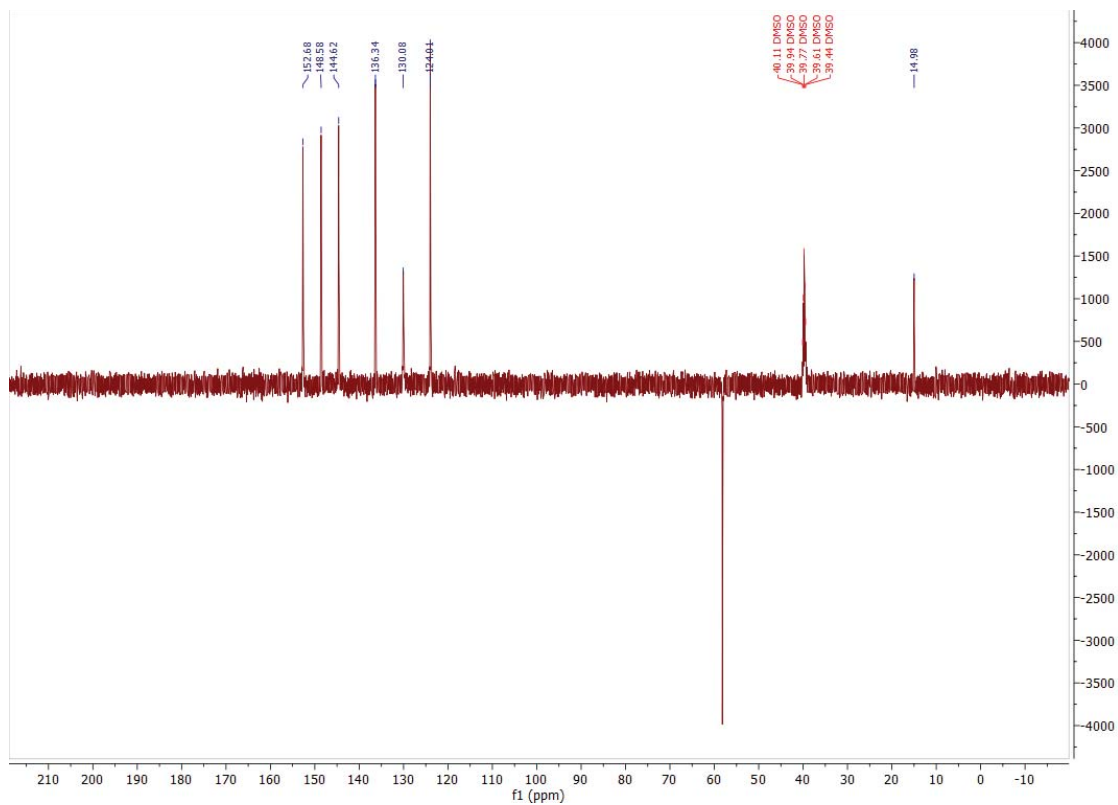


Figura 75. Espectro DEPT del compuesto AR8.

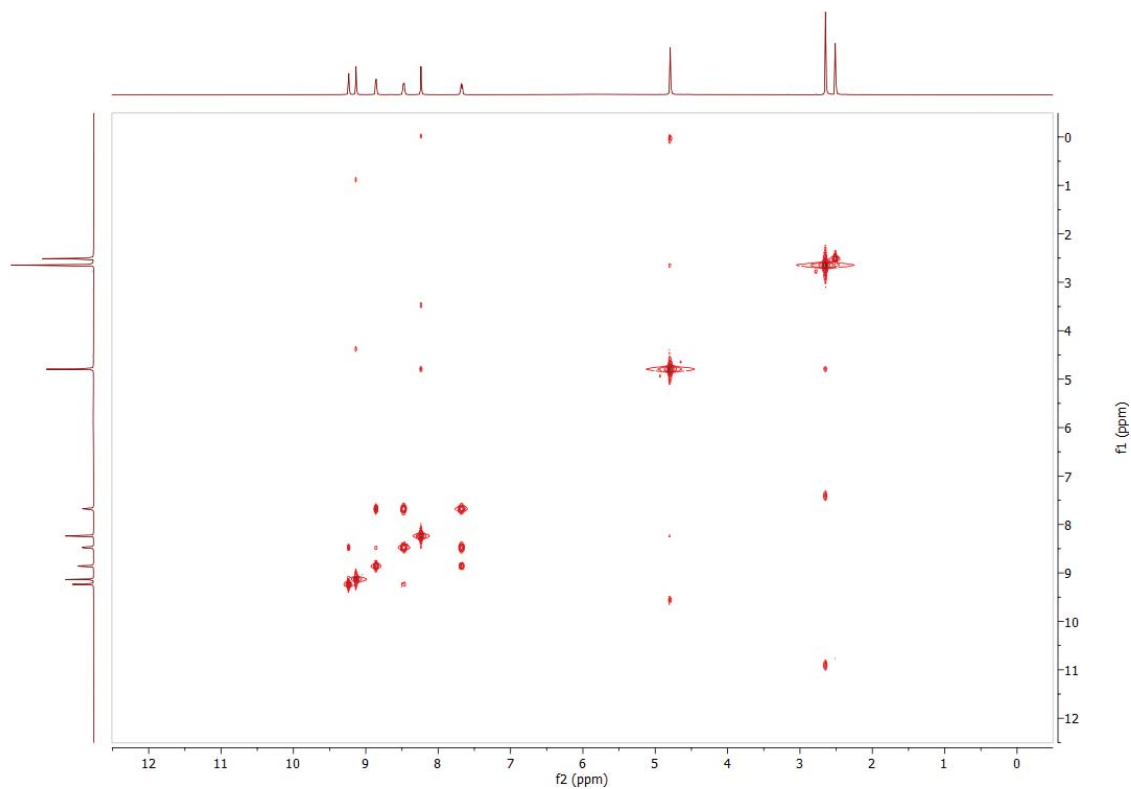


Figura 76. COSY del compuesto AR8. El espectro muestra interacciones entre los hidrógenos del grupo piridoxal: Ar-CH₃ (2.65 ppm) y Ar-CH₂-OH (4.79 ppm). También se observan interacciones entre Ar-CH₂-OH (4.79 ppm) y 6-H_{Ar-piridoxal} (8.24 ppm). Las relaciones entre los hidrógenos del grupo piridina se describen en la Figura 77.

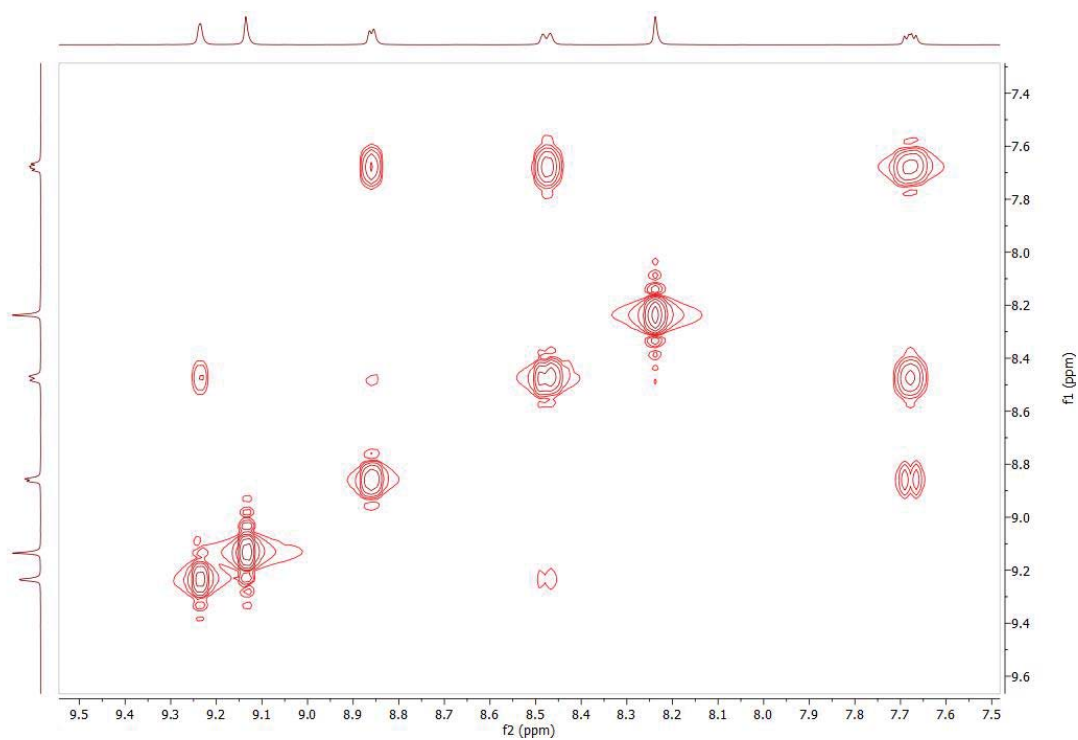


Figura 77. Zoom realizado al COSY del compuesto AR8. El espectro muestra múltiples interacciones entre los hidrógenos del grupo piridina. 5-H (7.68 ppm) con 4-H (8.48 ppm), 5-H (7.68 ppm) con 6-H (8.86 ppm) y 4-H (8.48 ppm) con 2-H (9.24 ppm).

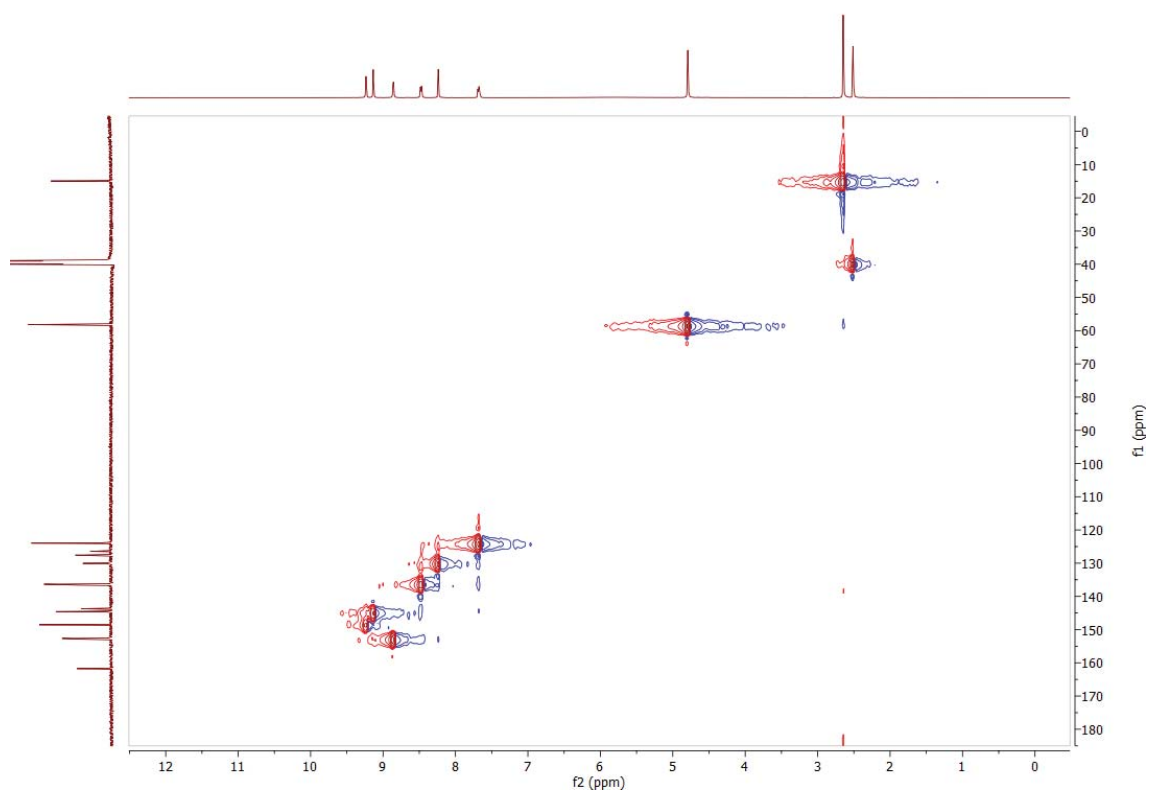


Figura 78. HSQC del compuesto AR8. El espectro muestra las interacciones entre hidrógenos y carbonos a un enlace de distancia: Ar-CH₃ (¹H: 2.65 y ¹³C: 14.95 ppm), Ar-CH₂-OH (¹H: 4.79 y ¹³C: 58.16 ppm), 5-HC_{Ar-py} (¹H: 7.68 y ¹³C: 123.98 ppm), 6-HC_{Ar-piridoxal} (¹H: 8.24 y ¹³C: 130.05 ppm), 4-HC_{Ar-py} (¹H: 8.48 y ¹³C: 136.32 ppm), 6-HC_{Ar-py} (¹H: 8.86 y ¹³C: 152.65 ppm), -CH=N (¹H: 9.14 y ¹³C: 144.59 ppm) y 2-HC_{Ar-py} (¹H: 9.24 y ¹³C: 148.55 ppm).

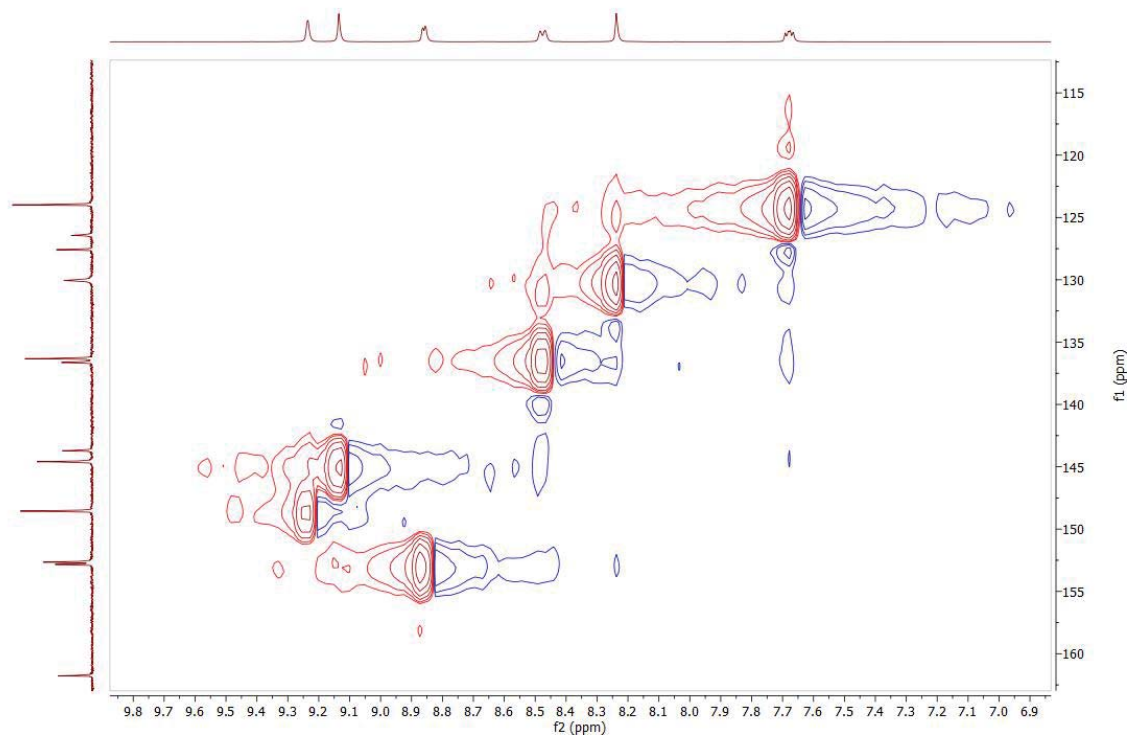


Figura 79. Zoom realizado al HSQC del compuesto AR8 en la zona correspondiente al grupo piridina.

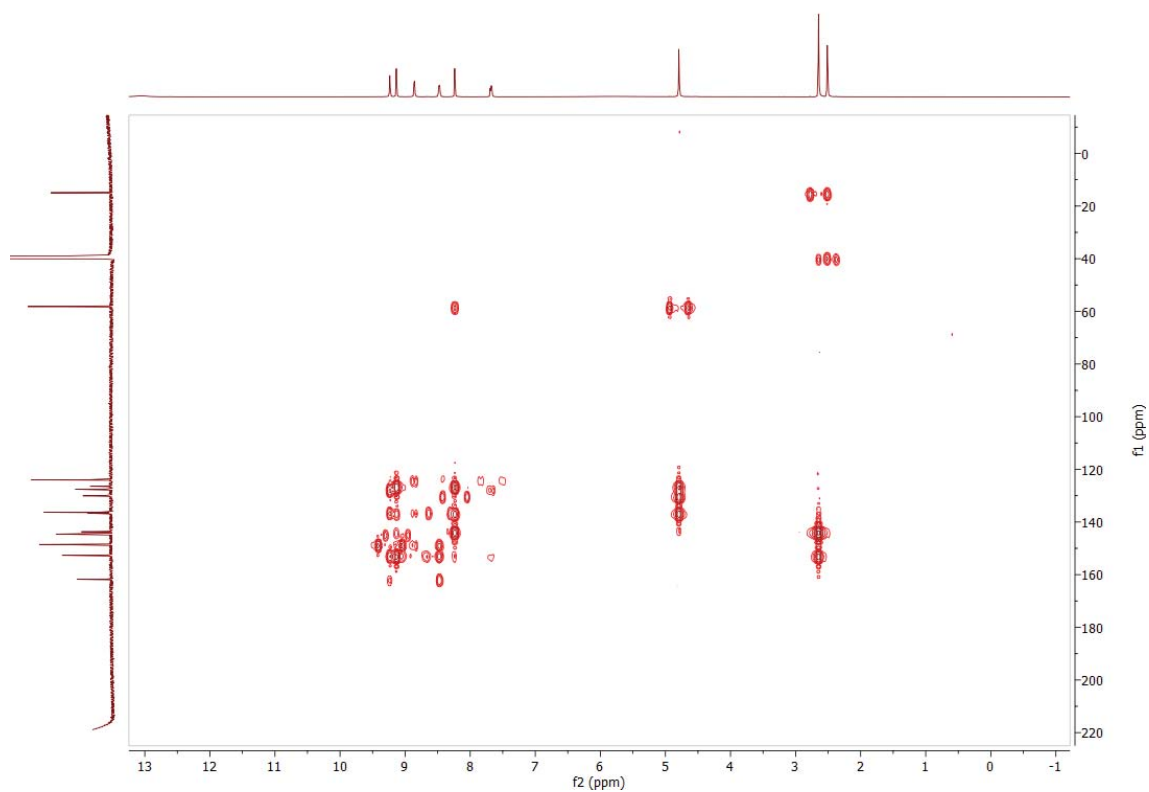


Figura 80. HMBC del compuesto AR8. El espectro muestra interacciones entre hidrógenos y carbonos a dos enlaces de distancia: H del CH₃ (2.65 ppm) con C_{Ar-CH₃} (143.71 ppm) y H del CH₂ (4.79 ppm) con C_{Ar-CH₂-OH} (126.43 ppm). El espectro también muestra las interacciones a tres enlaces de distancia: H del CH₃ (2.65 ppm) con C_{Ar-OH} (152.83 ppm), H del CH₂ (4.79 ppm) con 6-C_{piridoxal} (130.05 ppm) y H del CH₂ (4.79 ppm) con C_{Ar-CH=N} (136.63 ppm). El resto de relaciones observadas se describen en la Figura 81.

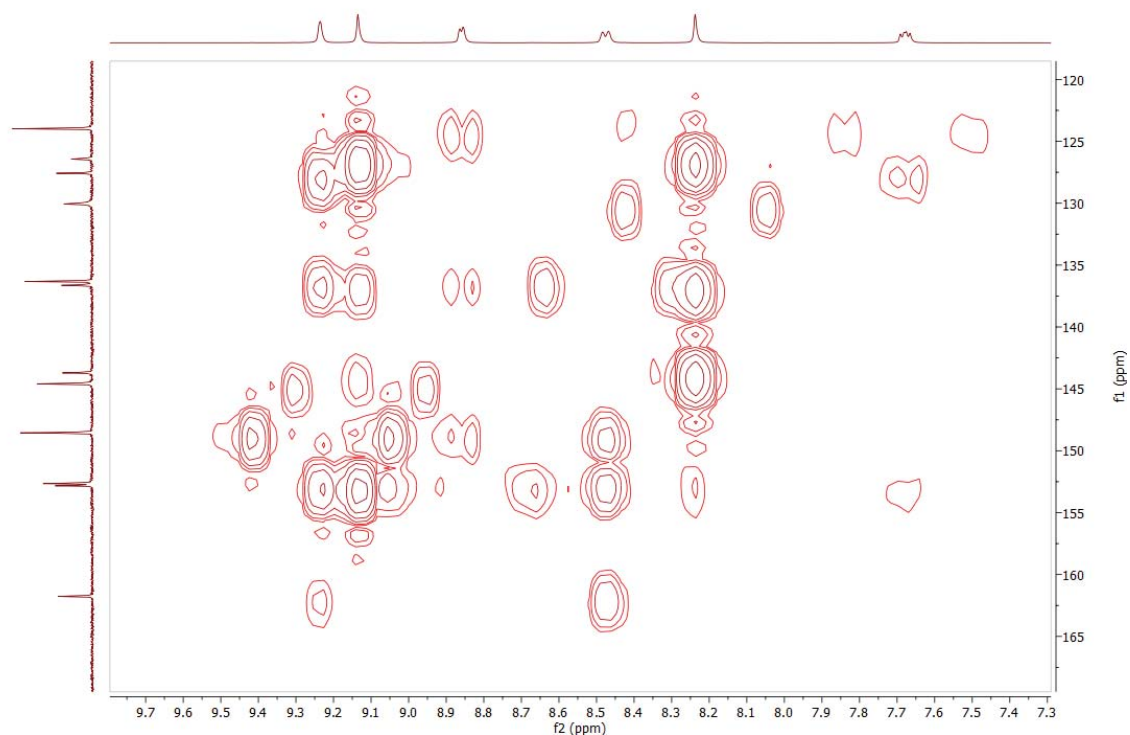


Figura 81. Zoom realizado al HMBC del compuesto AR8. El espectro muestra interacciones entre hidrógenos y carbonos a dos enlaces de distancia: 5- H_{Ar-py} (7.68 ppm) con 6- C_{Ar-py} (152.65 ppm), 6- $H_{Ar-piridoxal}$ (8.24 ppm) con C_{Ar-CH_2-OH} (126.43 ppm), 6- H_{Ar-py} (8.86 ppm) con 5- C_{Ar-py} (123.98 ppm), H del HC=N (9.14 ppm) con $C_{Ar-CH=N}$ (136.63 ppm) y 2- H_{Ar-py} (9.24 ppm) con $C_{Ar-C=O}$ (127.58 ppm). El espectro también muestra las interacciones a tres enlaces de distancia: 5- H_{Ar-py} (7.68 ppm) con $C_{Ar-C=O}$ (127.58 ppm), 6- $H_{Ar-piridoxal}$ (8.24 ppm) con el C del Ar- CH_2-OH (58.16 ppm), 6- $H_{Ar-piridoxal}$ (8.24 ppm) con $C_{Ar-CH=N}$ (136.63 ppm), 6- $H_{Ar-piridoxal}$ (8.24 ppm) con C_{Ar-CH_3} (143.71 ppm), 4- H_{Ar-py} (8.48 ppm) con 2- C_{Ar-py} (148.55 ppm), 4- H_{Ar-py} (8.48 ppm) con 6- C_{Ar-py} (152.65 ppm), 4- H_{Ar-py} (8.48 ppm) con el C del C=O (161.76 ppm), 6- H_{Ar-py} (8.86 ppm) con 4- C_{Ar-py} (136.32 ppm), 6- H_{Ar-py} (8.86 ppm) con 2- C_{Ar-py} (148.55 ppm), H del HC=N (9.14 ppm) con C_{Ar-CH_2-OH} (126.43 ppm), H del HC=N (9.14 ppm) con C_{Ar-OH} (152.83 ppm), 2- H_{Ar-py} (9.24 ppm) con 4- C_{Ar-py} (136.32 ppm) y 2- H_{Ar-py} (9.24 ppm) con 6- C_{Ar-py} (152.65 ppm).

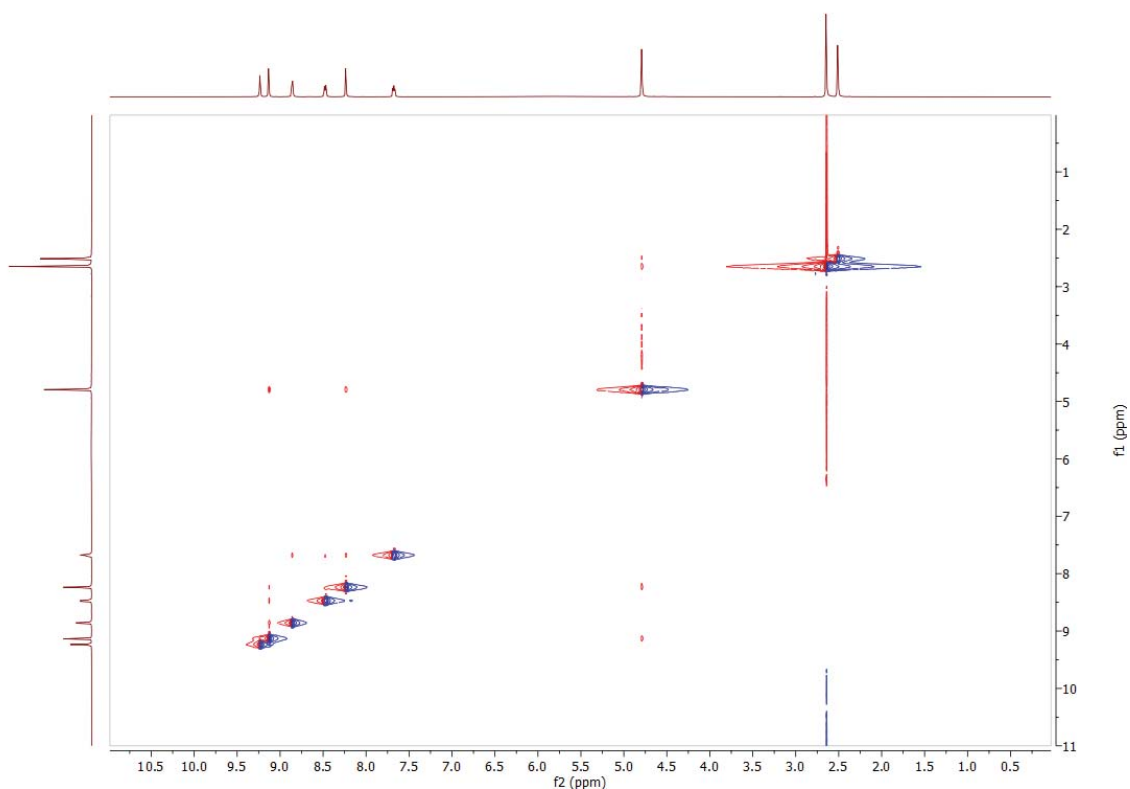


Figura 82. NOESY del compuesto AR8. El espectro muestra interacciones entre los hidrógenos del grupo Ar-CH₂-OH (4.79 ppm) y los hidrógenos 6-H_{Ar-piridoxal} (8.24 ppm) y -HC=N (9.14 ppm). Las interacciones se corresponden a hidrógenos próximos en el espacio.

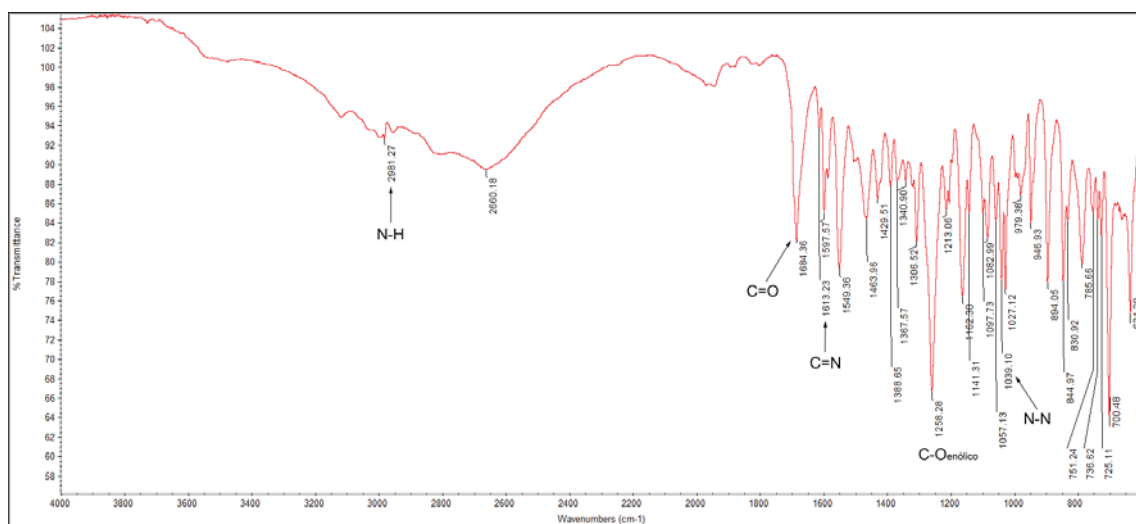


Figura 83. Espectro de infrarrojo del compuesto AR8.

7.5. Difracción de rayos X de monocristal.

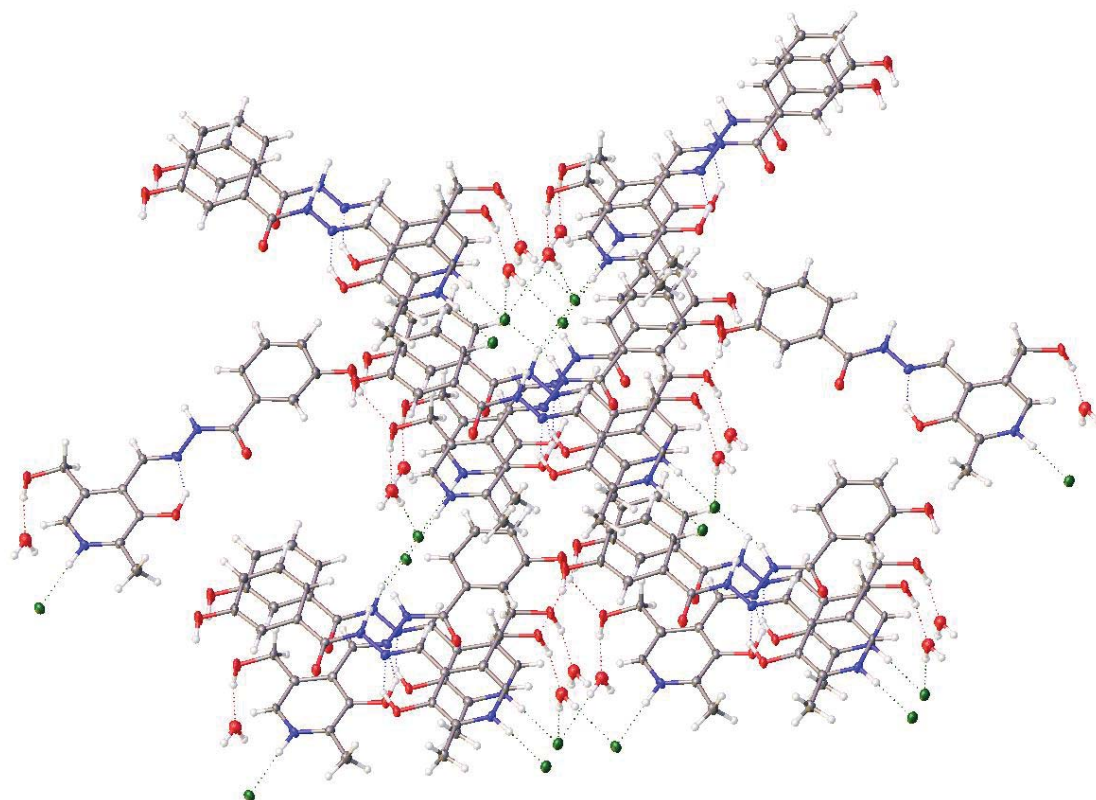


Figura 84. Diagrama de empaquetamiento cristalino del compuesto AL2 obtenido mediante el software OLEX2.

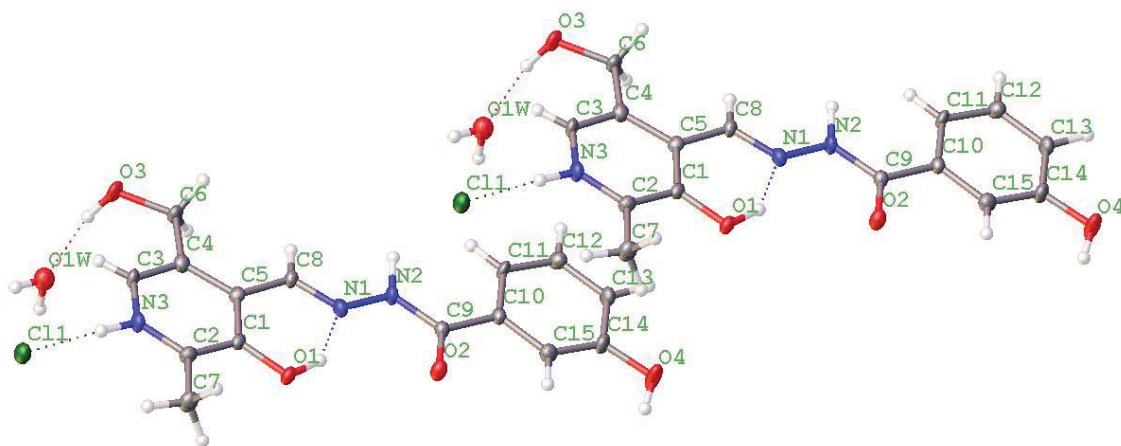


Figura 85. Interacciones π - π entre moléculas de AL2 adyacentes. La representación se obtiene mediante el software OLEX2 con los elipsoides térmicos al 50% de probabilidad.

Tabla 6. Datos cristalográficos y de refinamiento de la estructura de AL2.

Fórmula empírica	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O ₅
Peso molecular	355.77
Temperatura	100(2) K
Longitud de onda	0.71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	Cc
Dimensiones de la celda unidad	a = 15.7785(14) Å; α = 90.00° b = 13.6157(13) Å; β = 102.232(5)° c = 7.7543(7) Å; γ = 90.00°
Volumen	1628.1(3) Å ³
Z	4
Densidad calculada	1.451 Mg/cm ³
Coefficiente de absorción	0.266 mm ⁻¹
F(000)	744.0
Tamaño del cristal	0.35 × 0.11 × 0.09 mm ³
Rango 2θ para la colección de datos	5.98 a 52.82°
Rangos de indexación	-19 ≤ h ≤ 19, -17 ≤ k ≤ 17, -9 ≤ l ≤ 9
Reflexiones recogidas	9584
Reflexiones independientes	3323 [R _{int} = 0.0441, R _{sigma} = 0.0622]
Datos / restricciones / parámetros	3323 / 2 / 263
Bondad de ajuste en F ²	1.007
Índices finales R [I ≥ 2σ (I)]	R ₁ = 0.0412, wR ₂ = 0.0847
Índices finales R (todos los datos)	R ₁ = 0.0600, wR ₂ = 0.0938
Mayor diferencia pico y agujero	0.33 / -0.27 e Å ⁻³
Parámetro Flack	-0.05(6)

Tabla 7. Enlaces de hidrógeno formados en el compuesto AL2.

D	H	A	d(D-H) / Å	d(H-A) / Å	d(D-A) / Å	D-H-A / °
O1	H1O	N1	0.98(4)	1.66(4)	2.537(3)	147(3)
O1W	H1WA	Cl1 ¹	0.79(4)	2.36(4)	3.148(3)	176(4)
O1W	H1WB	Cl1 ²	0.94(5)	2.21(5)	3.143(3)	174(4)
N2	H2N	Cl1 ³	0.99(4)	2.35(4)	3.304(3)	162(3)
O3	H3O	O1W	0.92(5)	1.79(5)	2.693(3)	167(4)
N3	H3N	Cl1	0.98(4)	2.15(4)	3.136(2)	177(3)
O4	H4	O3 ⁴	0.84	1.89	2.672(3)	155.5

¹+X,2-Y,-1/2+Z; ²+X,+Y,-1+Z; ³1/2+X,3/2-Y,-1/2+Z; ⁴+X,-1+Y,+Z

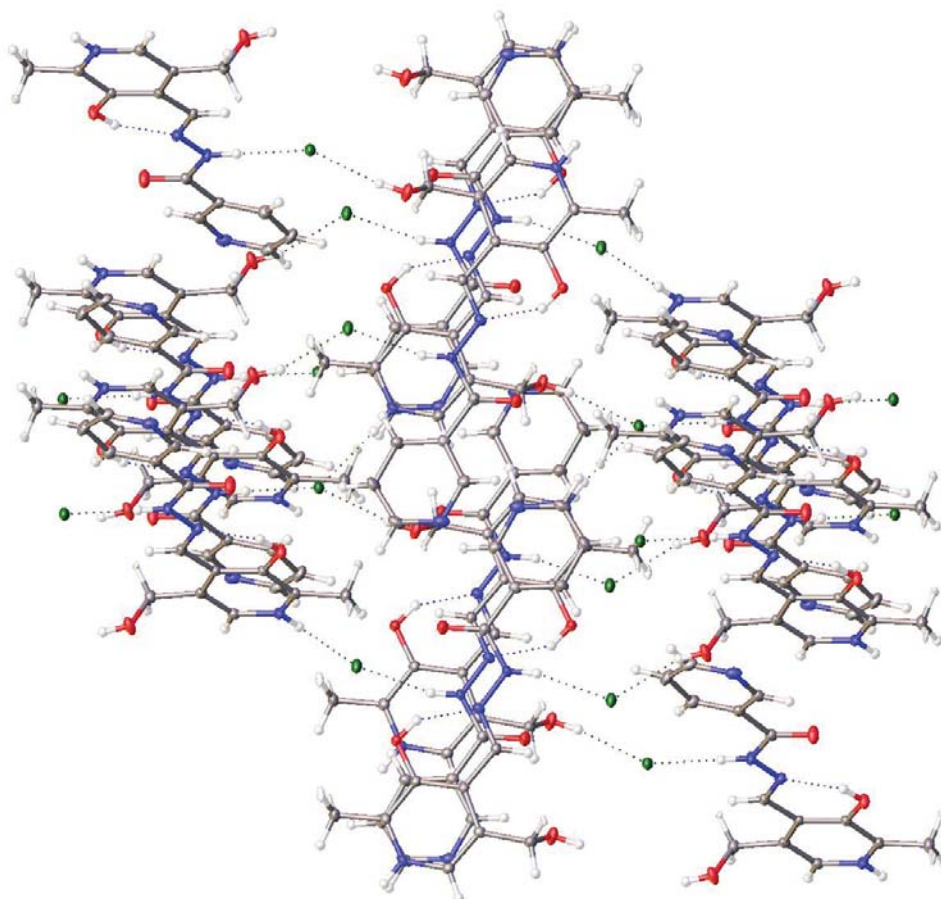


Figura 86. Diagrama de empaquetamiento cristalino del compuesto AR8 obtenido mediante el software OLEX2.

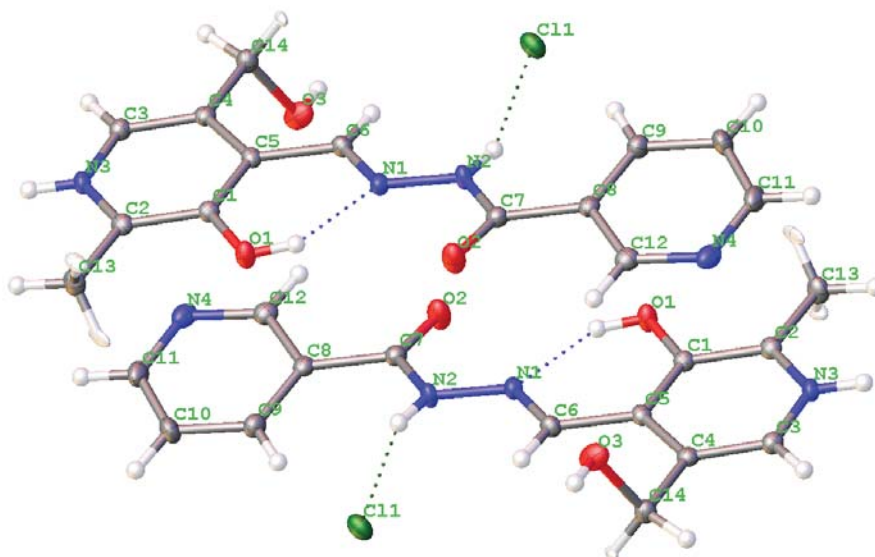


Figura 87. Interacciones π - π entre moléculas de AR8 adyacentes. La representación se obtiene mediante el software OLEX2 con los elipsoides térmicos al 50% de probabilidad.

Tabla 8. Datos cristalográficos y de refinamiento de la estructura de AR8.

Fórmula empírica	C ₁₄ H ₁₅ N ₄ O ₃ Cl
Peso molecular	322.753
Temperatura	N/A
Longitud de onda	0.71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n
Dimensiones de la celda unidad	a = 8.2971(3) Å; α = 90.00° b = 10.5578(4) Å; β = 100.0176(16)° c = 16.8006(7) Å; γ = 90.00°
Volumen	1449.28(10) Å ³
Z	4
Densidad calculada	1.479 Mg/cm ³
Coefficiente de absorción	0.283 mm ⁻¹
F(000)	672.9
Tamaño del cristal	0.12 × 0.1 × 0.06 mm ³
Rango 2θ para la colección de datos	4.58 a 56.7°
Rangos de indexación	-11 ≤ h ≤ 10, -14 ≤ k ≤ 14, -22 ≤ l ≤ 22
Reflexiones recogidas	19598
Reflexiones independientes	3604 [R _{int} = 0.0457, R _{sigma} = 0.0329]
Datos / restricciones / parámetros	3604 / 0 / 220
Bondad de ajuste en F ²	1.055
Índices finales R [>=2σ (I)]	R ₁ = 0.0332, wR ₂ = 0.0832
Índices finales R (todos los datos)	R ₁ = 0.0440, wR ₂ = 0.0890
Mayor diferencia pico y agujero	0.46 / -0.34 e Å ⁻³

7.6. Cromaticidad.

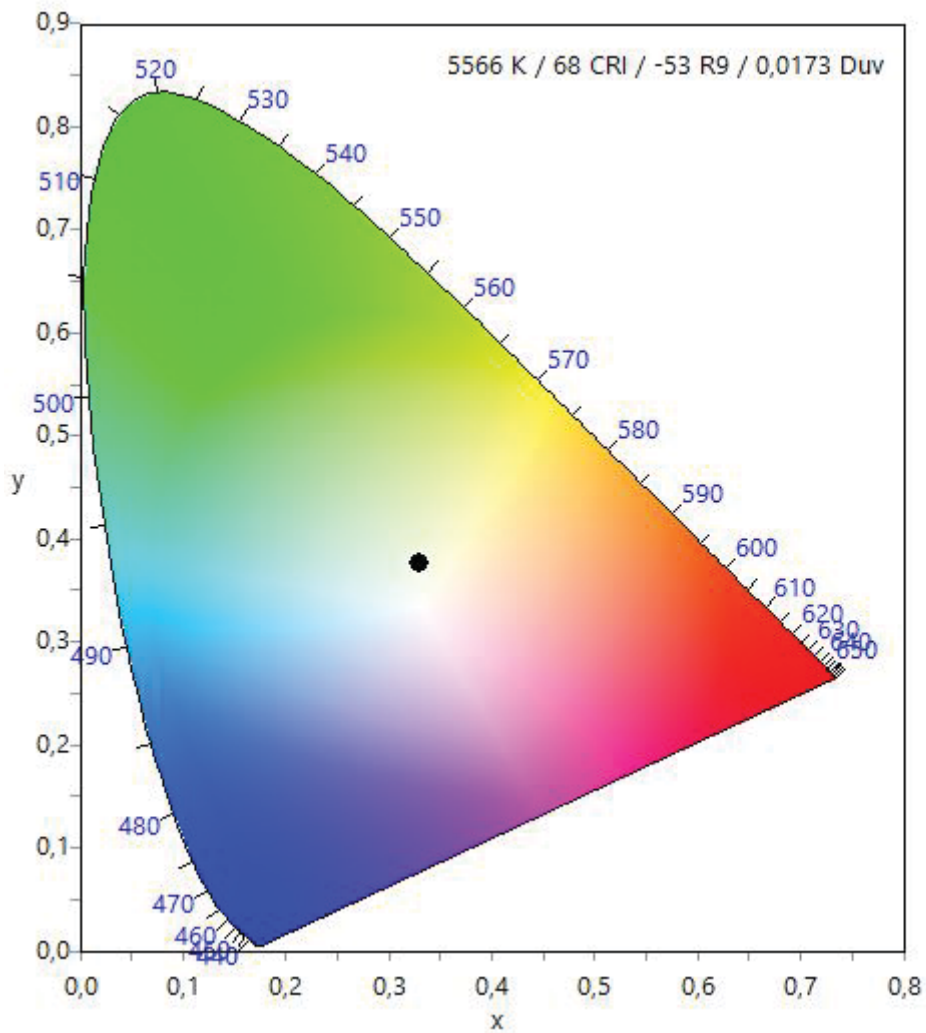


Figura 88. Diagrama de cromaticidad CIE para la emisión fluorescente del compuesto H1 en estado sólido ($x = 0,3309$; $y = 0,3755$). La representación se obtiene mediante el software *ColorCalculator*.

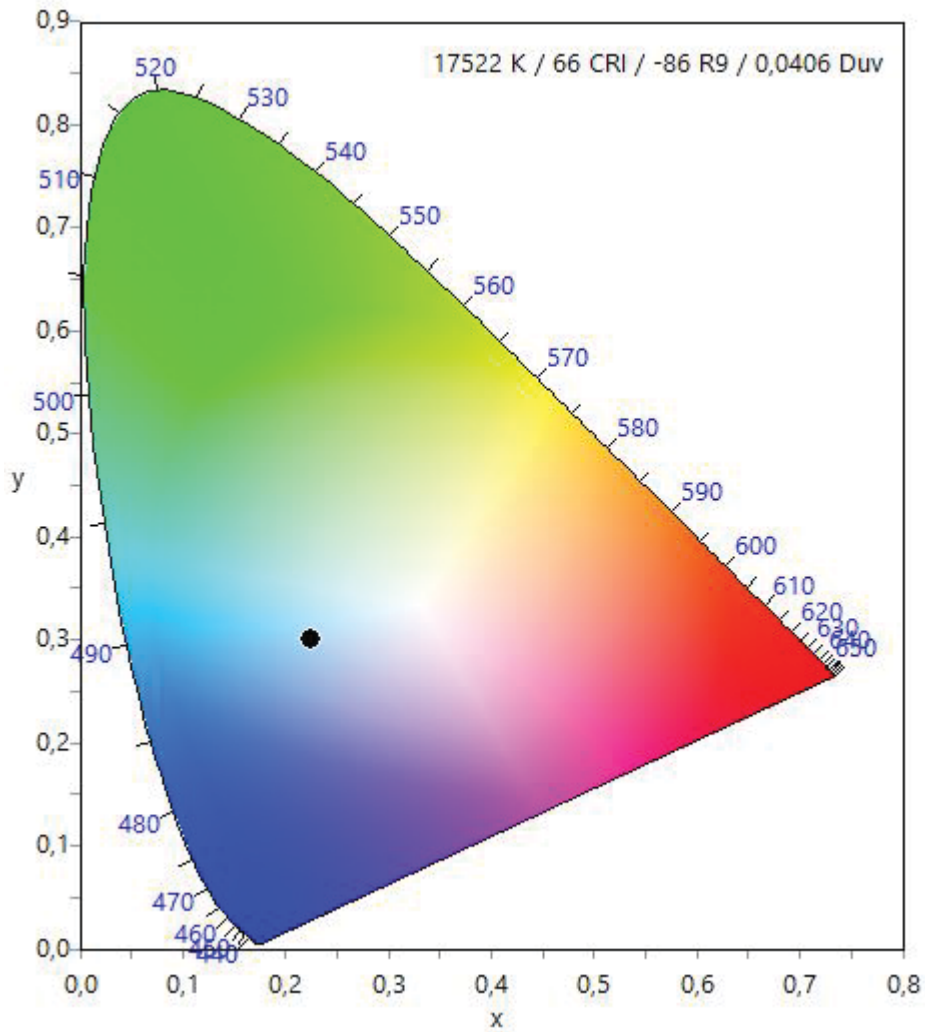


Figura 89. Diagrama de cromaticidad CIE para la emisión fluorescente del compuesto H2 en estado sólido ($x = 0.2247$; $y = 0.2996$). La representación se obtiene mediante el software *ColorCalculator*.

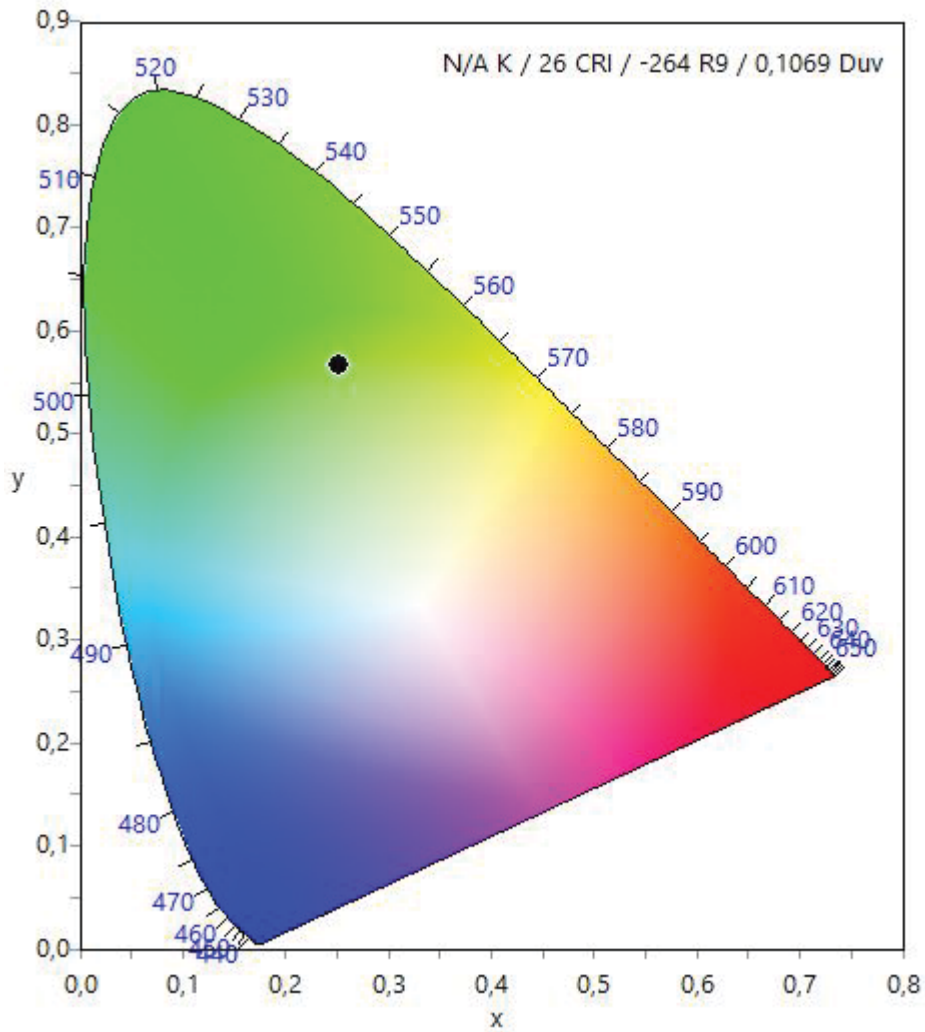


Figura 90. Diagrama de cromaticidad CIE para la emisión fluorescente del compuesto AL2 en estado sólido ($x = 0.2525$; $y = 0.5662$). La representación se obtiene mediante el software *ColorCalculator*.

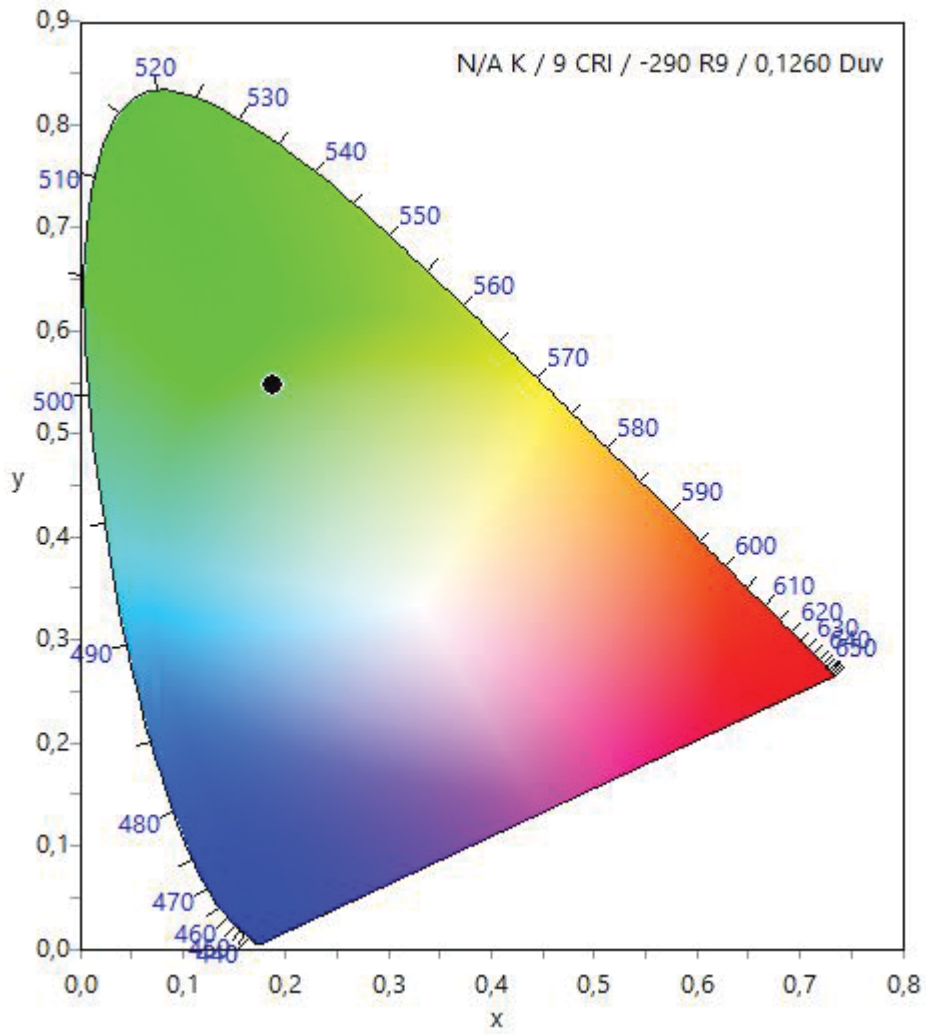


Figura 91. Diagrama de cromaticidad CIE para la emisión fluorescente del compuesto AR8 en estado sólido ($x = 0.1870$; $y = 0.5466$). La representación se obtiene mediante el software *ColorCalculator*.