

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

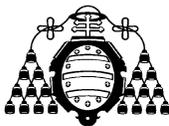
UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Trabajo Fin de Máster

**SÍNTESIS DE DENDRONES CON FERROCENO PARA MARCAJE Y
DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE BIOMOLÉCULAS**

ESTEFANÍA NÚÑEZ BAJO

Julio 2012, Oviedo



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Departamento de
Química Física y Analítica

M. Teresa Fernández Abedul, Profesora Titular del Departamento de
Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICA,

Que el presente trabajo titulado “SÍNTESIS DE DENDRONES CON
FERROCENO PARA MARCAJE Y DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE
BIOMOLÉCULAS” ha sido realizado por Estefanía Núñez Bajo en el
Departamento de Química Física y Analítica bajo su dirección, y en
colaboración con el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica
(Profesor Francisco Javier García Alonso), constituyendo el Trabajo Fin de
Máster de la interesada, cuya presentación autorizo,

Oviedo, 18 de julio de 2012,

M. Teresa Fernández Abedul

Deseo expresar mi agradecimiento:

A Francisco Javier García Alonso, Catedrático del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, por su interés y acertados consejos que han hecho posible este trabajo. A él le estoy especialmente agradecida por ser quien hace un año me abrió las puertas hacia un futuro alternativo.

A María Teresa Fernández Abedul, Dra. del Departamento de Química Física y Analítica, por aconsejarme ampliar mis estudios con este Máster, proponerme trabajar con ella y ser la Directora de este Trabajo Fin de Máster.

A Adela Anillo Abril y Alfredo Ballesteros Gimeno, Dres. del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, por su colaboración en este trabajo.

A mis compañeras de laboratorio, Beatriz Allende Sánchez y Verónica Mulas Hernández, en especial a esta última por ofrecerme trabajar con ella.

A los integrantes del grupo de investigación del Catedrático Agustín Costa García, en especial a Rebeca Alonso Bartolomé.

A María Jesús Bajo Álvarez, Miguel Ángel Núñez Mielgo y Ángela Núñez Bajo, mis padres y hermana, por apoyarme en todo momento.

A Adrián Fernández González, mi novio, por animarme y tranquilizarme a lo largo de este año.

Gracias a todos los que me habéis ayudado.

ÍNDICE

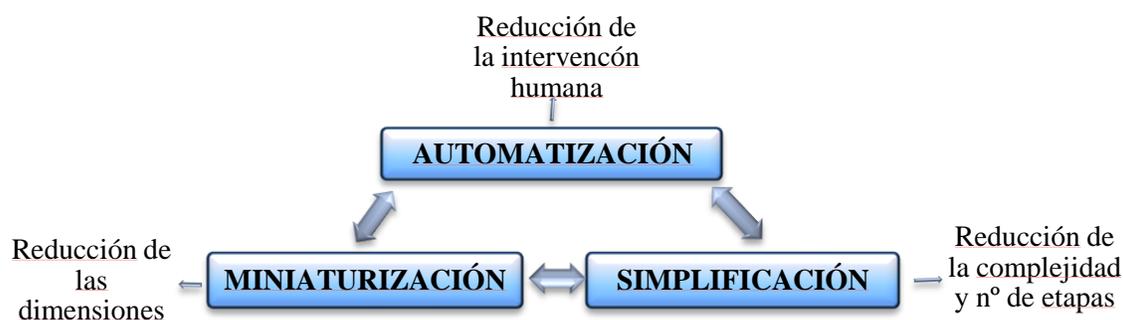
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- TÉCNICAS DE DETECCIÓN EN SISTEMAS MINIATURIZADOS	4
1.2.- MÉTODOS AMPEROMÉTRICOS CON MARCAS.....	7
1.2.1.- Marcas enzimáticas.....	9
1.2.2.- Marcas directas	10
1.3.- POLÍMEROS DENDRÍTICOS	13
1.3.1.- Estructura de los polímeros dendríticos monodispersos.....	14
1.3.2.- Síntesis convencional de dendrones y dendrímeros	15
1.3.3.- Síntesis acelerada de dendrones y dendrímeros	17
1.3.4.- Aplicaciones en Química Analítica	19
2.- OBJETIVOS	20
3.- EXPERIMENTAL	22
3.1.- MATERIALES Y REACTIVOS.....	23
3.2.- TÉCNICAS INSTRUMENTALES	25
3.3.- SÍNTESIS	26
3.3.1.- Obtención de 3,5-(FcCO(CH ₂) ₅ O) ₂ -C ₆ H ₃ -COOMe <u>1</u>	26
3.3.2.- Obtención de FcCO(CH ₂) ₅ I <u>2</u>	29
3.3.3.- Hidrólisis básica del éster del punto focal	30
3.3.3.1- Obtención de 3,5-(FcCO(CH ₂) ₅ O) ₂ -C ₆ H ₃ -COOEt <u>3</u>	30
3.3.3.2- Obtención de 3,5-(FcCO(CH ₂) ₅ O) ₂ -C ₆ H ₃ -COOH <u>4</u>	32

4.-	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
4.1.-	FUNCIONALIZACIÓN DE UN DENDRÓN COMERCIAL	35
4.2.-	SÍNTESIS DE UN DENDRÓN CON DOS UNIDADES DE FERROCENO	37
5.-	CONCLUSIONES	57
6.-	FUTURAS PERSPECTIVAS.....	59
7.-	BIBLIOGRAFÍA	63

1.-INTRODUCCIÓN

El desarrollo de herramientas eficaces para la detección sensible de biomoléculas ha ganado especial importancia en las últimas décadas con el fin de ser aplicadas para el análisis de muestras, principalmente, en los sectores clínico medioambiental y alimentario.

Las mejoras tecnológicas de estos dispositivos son proporcionadas por la miniaturización (reducción de las dimensiones de la instrumentación), automatización (reducción de la intervención humana) y simplificación (reducción del número y complejidad de las etapas del proceso analítico), tres tendencias básicas en Química Analítica¹.



Esquema 1: Relaciones sinérgicas entre tres tendencias de la Química Analítica

Estas tendencias no son independientes, sino que están relacionadas entre sí tal y como se muestra en el **esquema 1**. Así, transformar un método manual en automático casi siempre implica un aumento en el grado de miniaturización y simplificación; y la simplificación de un proceso exige la integración de módulos (miniaturización) y la reducción de la intervención humana (automatización).

De este modo, el uso de tecnologías que incorporan estas tendencias conduce a la mejora en la calidad analítica de los resultados con una menor participación del personal (automatización), una disminución del tiempo y menor coste de análisis debido a la integración de diversas etapas del proceso analítico (simplificación y miniaturización), siendo necesarios menor número de equipos y volumen de muestra. La sencillez y portabilidad hacen, por tanto, que personal no cualificado pueda usarlos fuera del laboratorio resultando más cómodo para el especialista.

Los analizadores, biosensores^{2,3} y μ TAS⁴(microsistemas de análisis total) son avances tecnológicos aplicados en bioanalítica que cumplen algunas o todas las características anteriormente expuestas (rapidez, sencillez, bajo coste y/o portabilidad) siendo claros ejemplos de las tendencias comentadas de automatización, simplificación y miniaturización (**esquema 2**). A su vez, pueden combinarse y así, los microchips de electroforesis (incluidos dentro de los μ TAS) también pueden actuar como biosensores al estar fabricados con materiales cuya superficie se puede funcionalizar permitiendo el anclaje de elementos de reconocimiento^{5,6} muy cerca del elemento de transducción.



Esquema 2: Avances en el análisis (bio)químico y ejemplos. La flecha vertical indica el grado de miniaturización en estos dispositivos, siendo mayor en los μ TAS y menor en los analizadores.

Si bien los analizadores no son sistemas miniaturizados por constar de partes con dimensiones más habituales en dispositivos tradicionales, siguen también esa tendencia. Y los biosensores y microchips no están completamente automatizados porque es necesario que el operario participe en alguna de las etapas (toma de muestra, tratamiento de datos), pero suelen ser portátiles, más simples y necesitan menor volumen de muestra que los analizadores^{1,4}. Por otra parte, los microchips de electroforesis capilar son un buen ejemplo de sistemas miniaturizados por la integración de varias etapas del proceso analítico desde la introducción de la muestra hasta la detección de los analitos⁷⁻¹⁰.

1.1.-TÉCNICAS DE DETECCIÓN EN SISTEMAS MINIATURIZADOS

Debido a las reducidas dimensiones de los dispositivos, es necesario que la detección sea muy sensible puesto que ésta tiene lugar en una pequeña área (interfase) o con volúmenes muy pequeños de muestra (**figura 1**).



Fig. 1: Ejemplos de interfaces transductor-disolución en un biosensor (a) y en un microchip de electroforesis (b).

Existe una gran variedad de principios de transducción para estos dispositivos, siendo los más comunes los transductores ópticos ^{11 - 13}, piezoeléctricos ^{14 - 16} y electroquímicos ¹⁷⁻¹⁹, algunos ejemplos se recogen en la **tabla 1**.

Principio	Propiedad medida	Transducción	Señal analítica
Óptico	Cambios en la radiación electromagnética	Resonancia Superficial de Plasmón (SPR)	Índice de refracción
		Luminiscencia	Intensidad de emisión de fosforescencia o fluorescencia
Electroquímico	Cambios en propiedades relacionadas con la corriente de electrones	Amperometría	Intensidad de corriente
		Potenciometría	Potencial
		Impedancia	Potencial
		Conductimetría	Conductividad
Piezoeléctrico	Cambios de masa	Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM)	Frecuencia de resonancia

Tabla 1: Técnicas de detección compatibles con dispositivos miniaturizados.

De entre todos los ejemplos de técnicas de detección expuestas, la transducción electroquímica y la óptica (especialmente la fluorescencia inducida por láser o LIF²⁰) son las más empleadas. Sin embargo, en los detectores ópticos con medida de absorbancia Vis-UV, la sensibilidad suele reducirse dado que el paso óptico es muy pequeño (p. ej. ancho del canal de un microchip) y por lo tanto también la absorbancia. Por otra parte, los sistemas de detección fluorescente suelen ser equipos voluminosos (necesitan lentes de enfoque, colimadores...) resultando muy complicada su integración en sistemas miniaturizados y, por lo tanto, también su portabilidad. Además, en muchas ocasiones es necesario derivatizar los analitos ya que la gran mayoría no presentan propiedades luminiscentes.

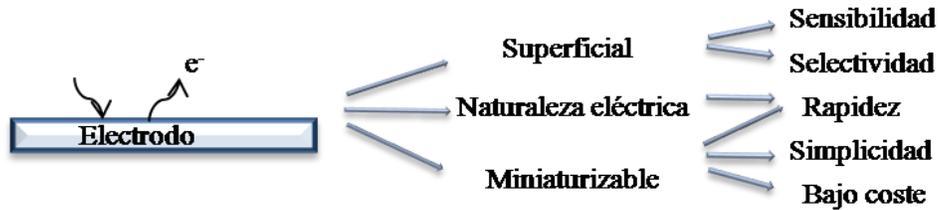
Dentro de las técnicas electroquímicas, en la bibliografía se recogen diferentes sistemas de transducción, por ejemplo, conductimétricos, impedimétricos, potenciométricos o amperométricos, según se mida la conductividad, impedancia, diferencia de potencial o intensidad de corriente. Entre ellas, la primera y la última son las más habituales (**figura 2**)



Fig. 2: Dibujo explicativo de la detección amperométrica (reducción) y conductimétrica.

La conductimetría es una técnica de detección universal ya que el paso de cualquier especie iónica presente en el medio produce un cambio en la conductividad entre dos electrodos, mientras que la amperométrica es selectiva al basarse en la reducción u oxidación de una molécula electroactiva sobre el electrodo sometido a un determinado potencial.

Además, la detección electroquímica presenta numerosas ventajas²¹ resumidas en el **esquema 3**.



Esquema 3: Ventajas de la detección electroquímica.

Al ser un fenómeno superficial, la detección se ve favorecida por las dimensiones de la interfase electrodo-disolución siendo comparables la sensibilidad y selectividad a las de LIF, y muchos analitos no necesitan ser derivatizados. Por otra parte, la transducción es rápida debido a la naturaleza eléctrica y no es necesario hacer una conversión desde otros formatos de medida. Además, los electrodos pueden ser hilos o películas conductoras fabricados en el mismo dispositivo permitiendo la total integración del sistema de detección y la disminución en el coste de producción.

1.2.-MÉTODOS AMPEROMÉTRICOS CON MARCAS

Se han desarrollado numerosos métodos basados en la detección amperométrica de biomoléculas debido a ventajas frente al resto de principios de medida, como son su elevada sensibilidad y selectividad. Si bien hay varias posibilidades de clasificación, pueden distinguirse métodos directos o indirectos dependiendo de dónde provenga la electroactividad: bien del propio analito o bien de una molécula que se utiliza como marca y que permite la detección del mismo.

Por lo tanto, en los métodos **sin marcas** o “**label-free**” el analito es una molécula electroactiva y puede ser detectado de forma directa. A pesar de no requerir la intervención de otro tipo de compuestos, esta metodología tiene una serie de desventajas, a destacar que el número de analitos con propiedades medibles es reducido. Además, hay que tener en cuenta la accesibilidad de los centros electroactivos, como se ilustra en la **figura 3** donde se muestra la estructura de la mioglobina (el difícil acceso del Fe(II) a la superficie del electrodo hace que no se pueda detectar de forma directa). Por otra parte, no son suficientemente sensibles y a veces poseen un elevado ruido de fondo (por ejemplo, la detección electroquímica de ADN a elevados potenciales) por lo que es necesaria una etapa previa de purificación dando como resultado un aumento en el tiempo de análisis^{22,23}.

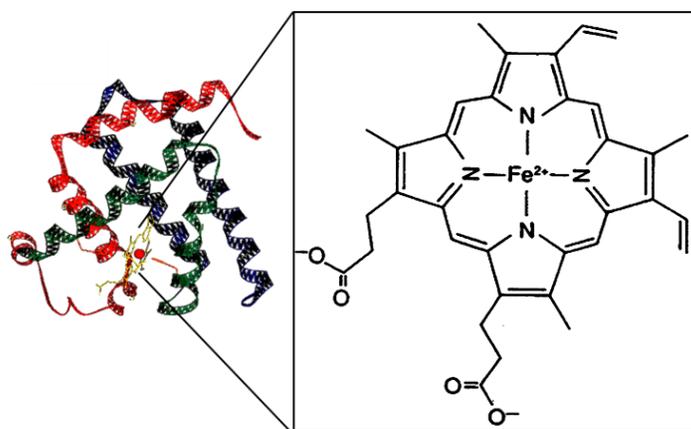
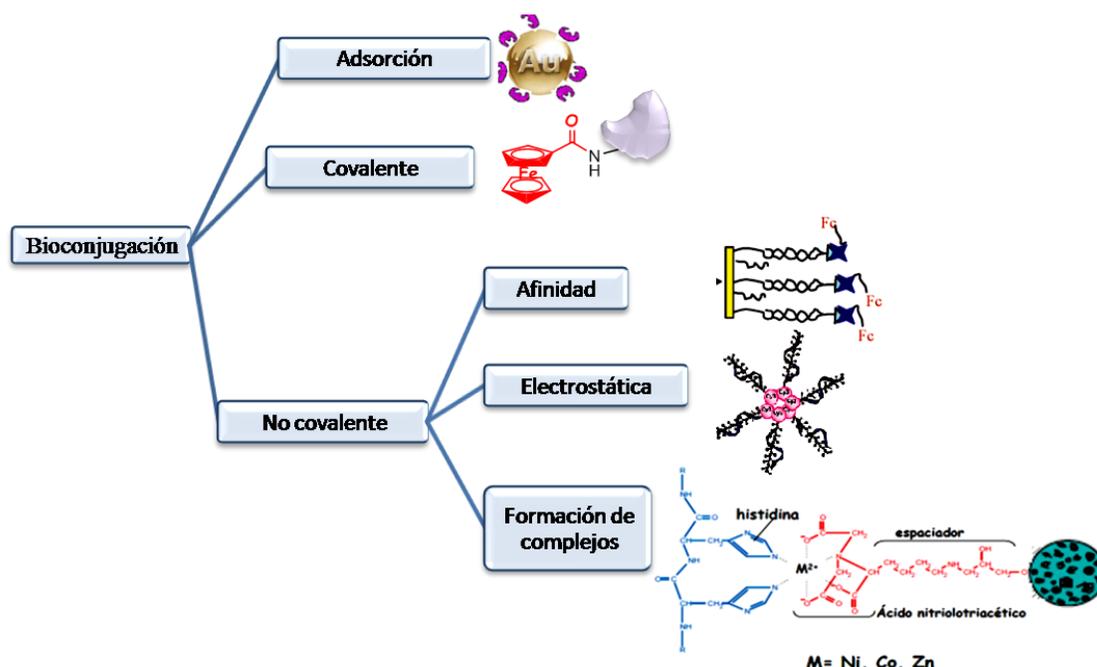


Fig. 3: Estructura de la mioglobina mostrando el centro electroactivo.

Por otro lado, los métodos **con marcas** se basan en la detección de un agente electroactivo diferente al analito de interés pero cuya señal es alterada por su presencia de tal forma que el analito adquiere propiedades extrínsecas o su señal es amplificada. Esto supone un mayor control del ensayo con aumento en la sensibilidad y selectividad de la detección.²⁴⁻²⁶

Las marcas pueden encontrarse unidas (bioconjugadas) a las biomoléculas por inclusión (adsorción), de forma no covalente o covalentemente²⁷ (**esquema 4**).



Esquema 4: Estrategias habitualmente empleadas para unir marcas a biomoléculas.

De entre todos los ejemplos expuestos, la bioconjugación covalente es la que da como resultado uniones marca-biomolécula más fuertes, por lo tanto, los complejos son más robustos y duraderos^{28,29}.

La elección de la estrategia de bioconjugación depende del tamaño, forma, estructura y sitio de unión de la marca, la disponibilidad y grupo funcional de unión de la biomolécula, así como del tipo, tamaño, forma, composición y estabilidad de la misma. Siendo habitualmente empleadas, dentro de las marcas electroquímicas, **las enzimas, las nanopartículas y los compuestos organometálicos**.

1.2.1.- Marcas enzimáticas

Una de las aproximaciones más empleadas en la detección electroquímica de biomoléculas está basada en el empleo de marcas enzimáticas con el fin de generar una señal amplificada a través de diferentes mecanismos como pueden ser la producción de compuestos electroactivos³⁰, la transformación redox biocatalítica³¹, o la precipitación biocatalítica de un producto insoluble sobre el electrodo como resultado de la formación de productos enzimáticos³².

En la bibliografía se encuentran ensayos con enzimas glucosa oxidasa (GOx) y peroxidasa de rábano silvestre (HRP) pero la más común es la fosfatasa alcalina (AP) (hidrolasa que desfosforila catalíticamente los sustratos con grupos fosfato)^{33,34} (**figura 4**).

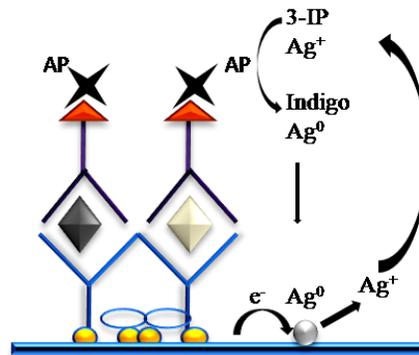


Fig.4: Inmunosensor enzimático empleado en la determinación de PSA (antígeno específico prostático), biomarcador del cáncer de próstata. El sustrato de la AP es el 3-Indoxil Fosfato (3-IP) y la amplificación de señal se produce por la precipitación biocatalítica de $Ag(0)$ y su posterior reincorporación al ciclo enzimático al ser oxidada sobre el electrodo.

Las enzimas son normalmente unidas a biomoléculas a través de la interacción de afinidad estreptavidina-biotina, sin embargo, este marcaje no es sencillo ya que la actividad del conjugado debe ser controlada periódicamente debido a la inestabilidad de las enzimas y de la interacción biotina-estreptavidina, afectando a la reproducibilidad y sensibilidad del ensayo.

1.2.2.- Marcas directas

Las nanopartículas y los complejos organometálicos, al ser compuestos químicos, son más estables que las enzimas y permiten la síntesis controlada de derivados cuyas propiedades, tamaños y ligandos sean diferentes. De este modo, se pueden bioconjugarse de forma directa a través de uniones covalentes generando conjugados más robustos que las marcas enzimáticas. Además, son en sí moléculas electroactivas por lo que su detección es directa y no depende de la adición de sustratos u otros compuestos.

1.2.2.1.- Nanopartículas: AuNPs y QDs

Las **nanopartículas** se pueden definir como materiales cuyas tres dimensiones se encuentran entre 1 y 100 μm siempre y cuando la mayor de las dimensiones no se diferencie de la más pequeña más de tres veces. Su superficie no es uniforme presentando diferentes caras cristalinas, afinidad química y grupos funcionales (ventajoso en bioconjugación)³¹. Dentro de este grupo, se encuentran las nanopartículas de oro (AuNPs) y los Quantum Dots (QDs).

Las **nanopartículas de oro (AuNPs u oro coloidal)** presentan propiedades similares a las del oro, alta relación superficie/volumen y son generadas “in situ” mediante una química húmeda limpia con la que se pueden obtener tamaños de partícula que varían desde los 3 hasta los 150 nm. Además, la gran afinidad que presenta el oro por el azufre hace que la adsorción (quimisorción) de estructuras proteicas sea estable y sin pérdidas de actividad³⁵. Sin embargo, la quimisorción se produce al azar y es una interacción más débil que la covalente.

Por otro lado, los **Quantum Dots (QDs)** son partículas semiconductoras con excelentes propiedades optoelectrónicas, formadas por un núcleo de nanocristales CdS-ZnS cuyas propiedades, tamaño, forma y solubilidad dependen de la proporción de los sulfuros en el núcleo y de las capas inorgánicas y/o orgánicas que lo rodean. Normalmente, la capa externa es de polietilenglicol (PEG) ya que aumenta su solubilidad en medios acuosos y su elevada reactividad permite la incorporación covalente de diversos ligandos superficiales responsables del estímulo externo³⁶⁻³⁸ (**figura 5**).

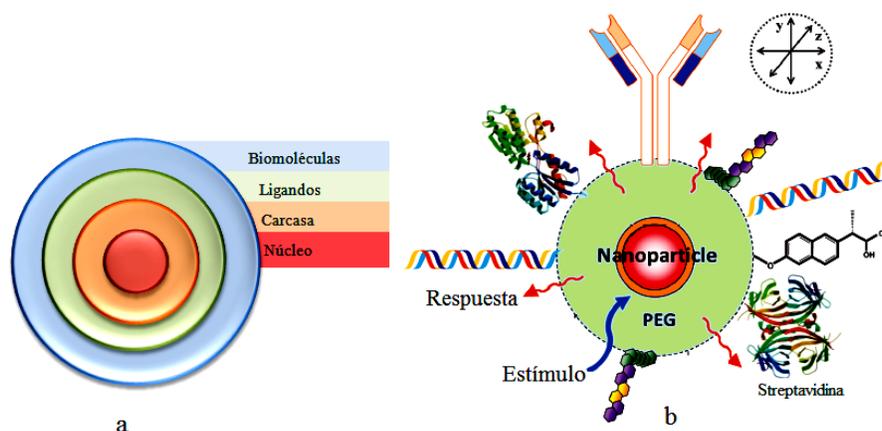


Fig.5: Estructura de un QD (a) y posibles híbridos cuando la capa externa es de PEG (b)

1.2.2.2.- Complejos organometálicos: Fc (Ferroceno)

El ferroceno es una molécula organometálica, complejo de Fe (II) con dos ligandos ciclopentadienuro ($C_5H_5^-$) o de Fe(0) con ciclopentadienilos (C_5H_6), que presenta elevada actividad y excelente reversibilidad electroquímicas tal y como se muestra en la **figura 6**.

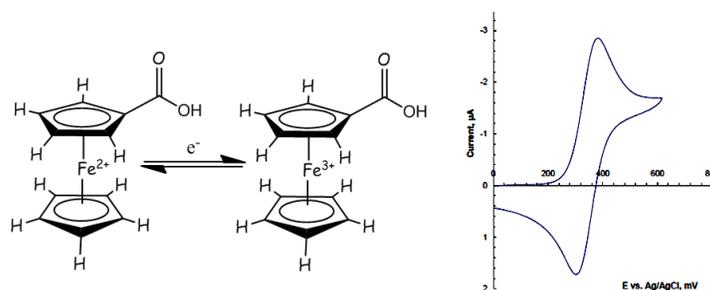
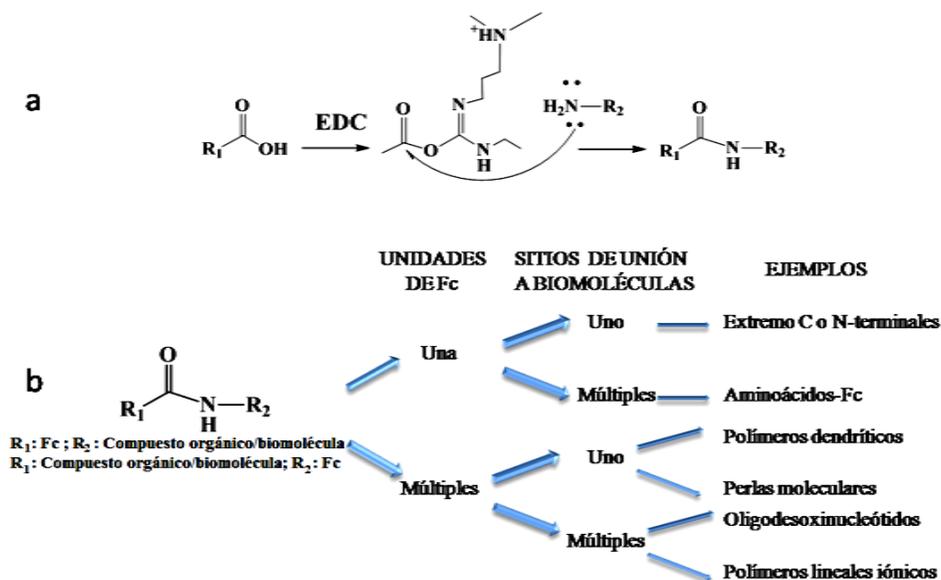


Fig. 6: Reacción y voltamperograma cíclico (100 mV/s) del proceso reversible de oxidación del ácido ferrocenocarboxílico a pH 7 sobre electrodo de carbono frente a electrodo de plata.

Este complejo ofrece una gran versatilidad en la síntesis de derivados, siendo los más empleados, en el marcaje covalente de elementos biológicos, aquellos con grupos carboxílicos (ácido ferrocenocarboxílico) y grupos amino (ferroceno aminoácido y aminoferroceno) puesto que pueden unirse, respectivamente, a restos amino y carboxi a través de la química de la carbodiimida con EDC (véase a en el esquema 5) manteniendo

la actividad y estructura de ADN, proteínas y anticuerpos³⁹⁻⁴². De este modo, se pueden marcar biomoléculas con ferroceno de diversas formas tal y como se indica en **b del esquema 5**.



Esquema 5: Química de la carbodiimida con EDC (a) y ejemplos de compuestos que se valen de esta reacción para contener grupos ferrocenilo (marca electroactiva) clasificados según el nº de ferrocenos (Fc) y el número de puntos con los que se pueden unir a las biomoléculas (b).

En la bibliografía se recogen, por ejemplo, ferrocenil oligodesoxinucleótidos^{43,44} para ser usados como sondas electroquímicas de reacciones de hibridación, perlas moleculares⁴⁵, polímeros lineales⁴⁶ y dendríticos⁴⁷ funcionalizados con ferroceno (Fc). Además, ha sido conjugado exitosamente a estreptavidina sin alterar su actividad permitiendo el anclaje direccional de derivados biotinilados⁴⁸.

Sin duda alguna, las marcas con múltiples unidades electroactivas y un único punto de unión a la biomolécula son las que proporcionan mejor sensibilidad y selectividad ya que la bioconjugación es simple y, al contener multitud de unidades electroquímicamente equivalentes, un gran número de electrones pueden ser transferidos bajo el mismo potencial aplicado. Esto puede realizarse mediante una estrategia que emplee polímeros dendríticos.

1.3.-POLÍMEROS DENDRÍTICOS

La palabra “dendrítico” derivado del griego “dendron”, que significa árbol, es asignada a macromoléculas de estructura tridimensional altamente ramificada, cuyo tamaño y forma pueden ser controlados de forma precisa en el proceso de síntesis.

Estos polímeros están formados por monómeros AB_n interconectados donde A y B son dos funcionalidades diferentes y n un número igual o superior a dos. Sus características geométricas dependen directamente de la direccionalidad del núcleo inicial de crecimiento, número y longitud de las ramificaciones, y pueden ser clasificados, dependiendo de la distribución del peso molecular, en monodispersos (distribución homogénea) y polidispersos (distribución heterogénea) (**figura 7**).

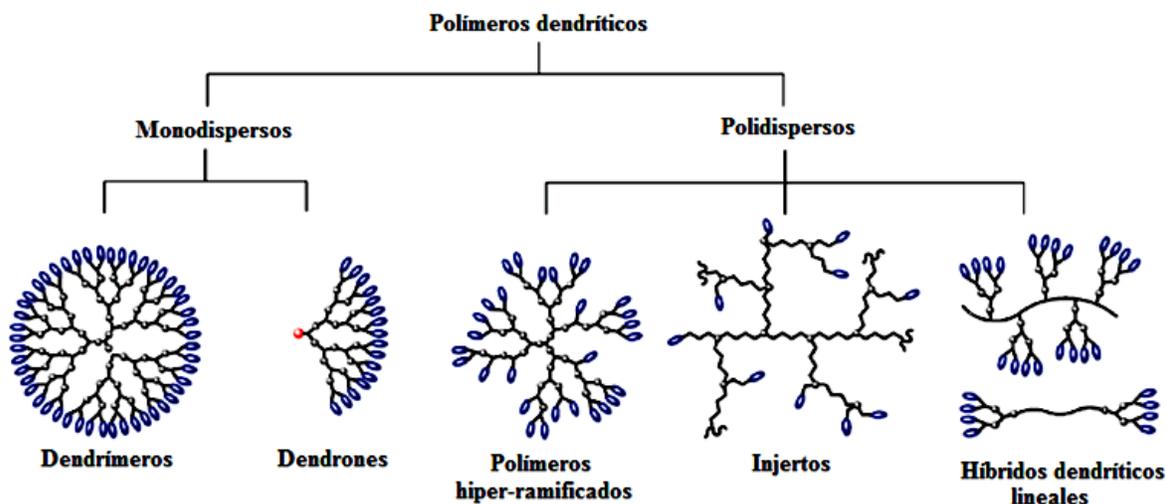


Fig. 7: Visión general de las sub-clases de polímeros dendríticos.

A diferencia de los polímeros dendríticos polidispersos, los monodispersos presentan estructuras homogéneas y regulares en todas las direcciones de crecimiento⁴⁹⁻⁵², por lo que su síntesis y modificación son mucho más sencillas y reproducibles.

1.3.1.- Estructura de los polímeros dendríticos monodispersos

Un dendrímero consiste en un centro molecular reactivo multifuncional, típicamente di-, tri- o tetra-funcional, que actúa como núcleo inicial de crecimiento (generación G0), ramificándose, generación tras generación (G_n), en un proceso de crecimiento análogo al de los árboles en la naturaleza. Generalmente, la capa externa del esqueleto polimérico es “decorada” con un elevado número de grupos funcionales activados para un futuro crecimiento o post-funcionalización. A su vez, la estructura del dendrímero se divide en fragmentos denominados dendrones los cuales son cuñas que abarcan desde el núcleo hasta la periferia del dendrímero (**figura 8**).

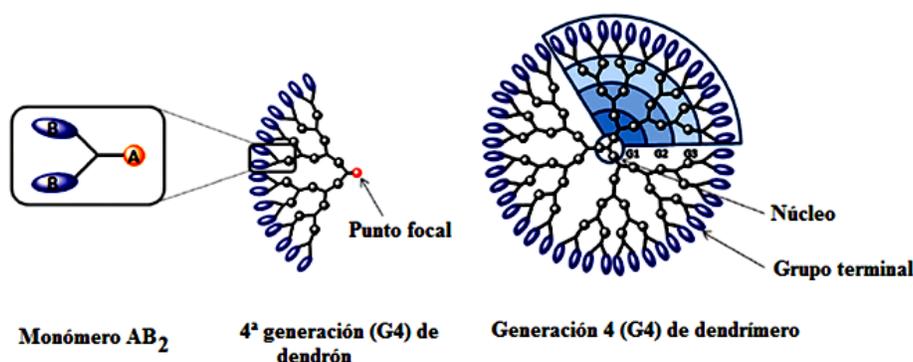


Fig. 8: Monómero AB₂ y sus derivados macromoleculares de cuarta generación (dendrón y dendrímero).

Las investigaciones sobre la síntesis de polímeros dendríticos monodispersos se remontan a dos experimentos originales de mediados de los 80 publicados por Tomalia⁵³ y Newkome⁵⁴ quienes describieron dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) y arbores de poli(eteramida) respectivamente. Normalmente son preparados empleando una cadena de pasos iterativos de crecimiento y activación, existiendo dos tendencias principales de síntesis: la convencional, basada en el crecimiento progresivo de cada generación, y la acelerada, basada en la unión de dos bloques dendríticos ya formados.

1.3.2.- Síntesis convencional de dendrones y dendrímeros

1.3.2.1.- Crecimiento divergente

En las primeras publicaciones sobre la síntesis de dendrímeros^{53,54} se empleó el crecimiento divergente. En esta estrategia, también denominada “de adentro hacia afuera”, el crecimiento del dendrímero es iniciado por el núcleo multifuncional activado de tipo B_n ($n \geq 2$) y monómeros AB_n ($n \geq 2$), donde A es un grupo activado mientras B está desactivado/protegido para permitir el control del crecimiento. Los grupos B del núcleo reaccionan con un exceso de grupos funcionales A del monómero AB_n formando la primera capa dendrítica. Para continuar el crecimiento, los grupos B (procedentes del monómero AB_n) son activados/desprotegidos dando lugar a la primera generación (G1) de reactivo dendrítico. A continuación, una nueva capa de monómero puede ser añadida a la macromolécula obteniéndose el dendrímero de segunda generación (G2).

La repetición de estas etapas permite el incremento de las generaciones al igual que el de grupos funcionales terminales (**figura 9**) y, una vez obtenida la generación deseada, los grupos periféricos están disponibles para una futura post-funcionalización. Sin embargo, el riesgo de construir macromoléculas con defectos estructurales (resultado de una conversión incompleta de los grupos terminales) imposibles de separar de los dendrímeros perfectos es la mayor desventaja del método. De todos modos, este método de síntesis sólo requiere un exceso de monómeros y reactivos de bajo coste.

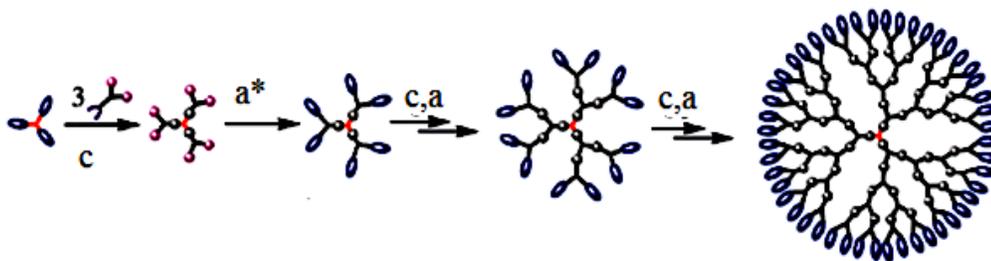


Fig. 9: Crecimiento divergente (a: activación de grupos periféricos; a*: activación del punto focal; c: crecimiento)

1.3.2.2.- Crecimiento convergente

En la década de los 90, Hawker y Fréchet introdujeron la aproximación de crecimiento convergente, como ruta alternativa a la divergente, basado en la previa construcción de dendrones perfectamente ramificados (cuñas de dendrímeros) los cuales son acoplados al núcleo después de la activación del punto focal en la etapa final⁵⁵ (figura 10).

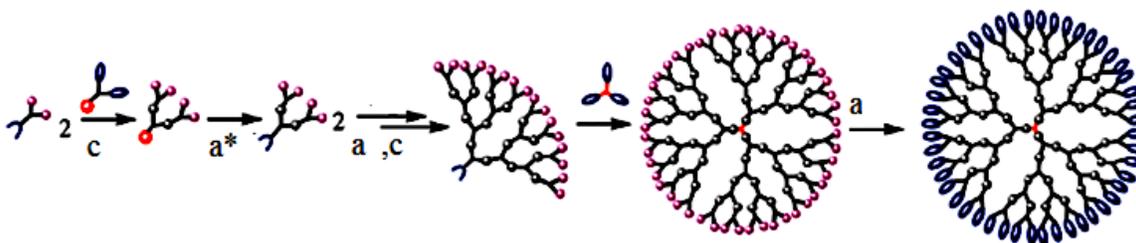


Fig. 10: Crecimiento convergente (a: activación de grupos periféricos; a*: activación del punto focal; c: crecimiento)

En comparación con el método divergente, el crecimiento es mucho más fácil de controlar dando como resultado menores defectos de estructura ya que los dendrones son intrínsecamente menos complejos que los dendrímeros. Sin embargo, a medida que aumenta el tamaño del dendrón reactivo, la eficacia de la reacción disminuye por impedimentos estéricos obteniéndose dendrímeros parcialmente sustituidos en la etapa final o rendimientos bajos. Para evitar que esto ocurra, es necesario emplear un gran exceso de dendrones y/o incluir un núcleo de mayor reactividad.

1.3.3.- Síntesis acelerada de dendrones y dendrímeros

En la década de los 90 comenzó a describirse la estrategia acelerada de síntesis donde se reduce el número de etapas siendo crítica la elección de los bloques de construcción, no sólo con menor consumo de sustancias químicas sino también, más efectiva en el tiempo.

1.3.3.1.-Hipermonomérica

En este método, se juntan dos tipos de bloques con un número grande de grupos funcionales (dendrones de alta generación) en comparación con el monómero AB_2 (**figura 11**). La primera publicación sobre esta estrategia fue descrita por Fréchet y sus colaboradores quienes intentaron acoplar dendrones de tercera generación (hipermonómeros AB_8) con un hipermonómero AB_4 con el fin de obtener un dendrón de quinta generación ⁵⁶. Sin embargo, el bajo rendimiento de la reacción y lo experimentalmente tedioso que resulta, hace que esta metodología no se haya extendido mucho.

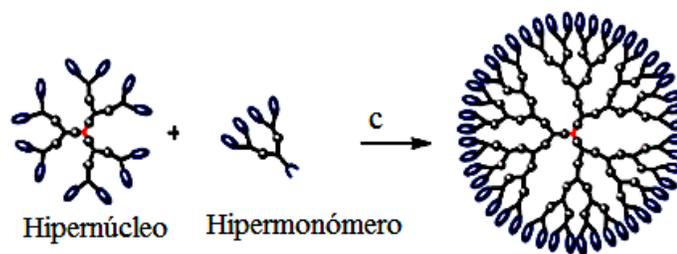


Fig. 11: Crecimiento hipermonomérico (c: crecimiento)

1.3.3.2.-Crecimiento convergente en dos etapas

Esta estrategia se basa en la síntesis paralela de un núcleo hiperfuncional (dendrón de alta generación) y un dendrón de baja generación, los cuales son acoplados unos a otros en la etapa final (**figura 12**). La principal ventaja de esta estrategia reside en el uso del hipernúcleo lo que reduce los problemas estéricos y facilita el acceso a dendrímeros de generaciones superiores. En este caso, Fréchet y sus colaboradores también publicaron la síntesis de un dendrón de séptima generación en una única etapa ⁵⁷.

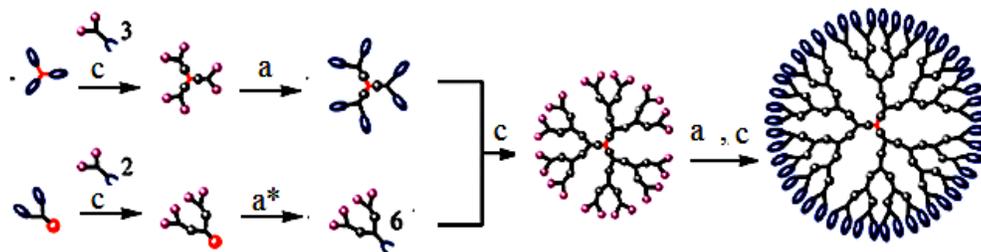


Fig. 12: Crecimiento convergente en dos etapas (a: activación de grupos periféricos; a*: activación del punto focal; c: crecimiento)

A pesar de que la síntesis de elevadas generaciones requiere un limitado número de etapas, este método no ha sido muy empleado ya que la preparación independiente de los dendrones y del núcleo hiperfuncional requiere mucho tiempo por ser preparados a través de las estrategias convencionales de síntesis explicadas anteriormente.

1.3.3.3.- Crecimiento convergente doble exponencial

Este concepto fue desarrollado por vez primera por Moore⁵⁸ en 1995 y se basa en la preparación de dendrones de baja generación totalmente protegidos que posteriormente son activados de forma selectiva en el punto focal o en la capa periférica para que reaccionen los unos con los otros con el fin de obtener otros dendrones totalmente desactivados de generaciones superiores. Estas etapas se repiten sucesivamente y, en el paso final, los puntos focales de dendrones de máxima generación son activados y acoplados en el núcleo multifuncional (**figura 13**).

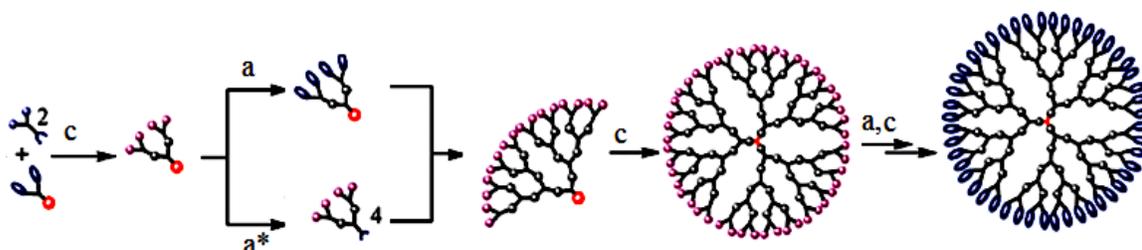


Fig. 13: Crecimiento convergente exponencial (a: activación de grupos periféricos; a*: activación del punto focal; c: crecimiento)

1.3.4.- Aplicaciones en química analítica

Actualmente, los dendrones y dendrímeros son sintetizados mediante métodos convencionales ya que su bajo coste y mayor control permiten la producción en masa. Por ejemplo, el PAMAM (sintetizado desde los años 80) es el dendrímero más comercializado y puede actuar como portador de biomoléculas protegiéndolas del medio⁵⁹, ligando de anclaje de biomoléculas sobre superficies^{60,61} o como mediador electroquímico una vez se ha modificado su superficie con ferroceno^{62,63} (**figura 14**). Estas aplicaciones se deben a los grupos amino superficiales del dendrímero que permiten la unión covalente a través de la química de la carbodiimida.

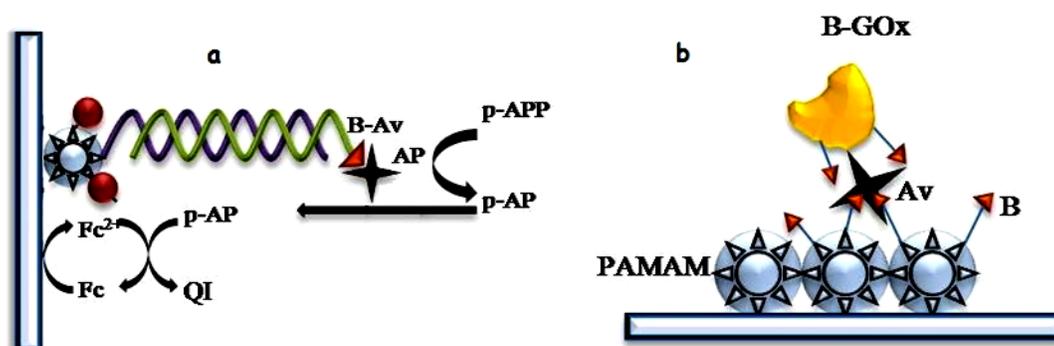


Fig. 14: Aplicaciones electroquímicas del PAMAM (a) unido a Fc como mediador electroquímico y ligando en un genosensor y (b) biotinilado para inmovilizar B-GOx. (Av: avidina; B: biotina; Fc: ferroceno; GOx: glucosa oxidasa; p-APP: para-aminofenil fosfato; p-AP: para-aminofenol; PAMAM: poliamidoamina; QI: quinoimida;)

Sin embargo, no se encuentran en la bibliografía dendrones con ferroceno empleados como marcas de unión directa y, comercialmente, los polímeros dendríticos son de elevado coste. Por lo tanto, la síntesis convencional de dendrones con ferroceno, cuya solubilidad y reactividad sean compatibles con las biomoléculas, es una idea innovadora, de bajo coste y de enorme aplicabilidad.

2.-OBJETIVOS

El presente Trabajo Fin de Máster, del que es partícipe el grupo de investigación del profesor Francisco Javier García Alonso (Departamento de Química Orgánica e Inorgánica) en colaboración con el grupo de investigación del Profesor Agustín Costa (Departamento de Química Física y Analítica), se engloba dentro del proyecto de investigación FC-11-PC-10-30 titulado “Determinación de biomarcadores de interés cardiológico mediante microchips de electroforesis con detección electroquímica”.

El objetivo final de este trabajo sería la detección electroquímica de biomoléculas empleando como marca varias unidades de ferroceno, compuesto organometálico electroactivo, con un único punto de unión a la biomolécula de tal forma que la señal sea amplificada. Como paso previo, se sintetizarán dendrones con ferroceno en la periferia. Para ello, se seguirán dos estrategias:

- 1. Modificación de un dendrón comercial**, incorporando 8 grupos ferrocenilo a la superficie del dendrón y convirtiendo el éster del punto focal en un grupo carboxílico, capaz de unirse a distintas biomoléculas.
- 2. Síntesis de un dendrón** con grupos ferrocenilo en la periferia y un grupo carboxílico en el punto focal aprovechando la metodología puesta a punto por Fréchet (síntesis convencional de crecimiento convergente) y partiendo del 6-bromo-1-oxohexilferroceno.

Asimismo, se optimizarán las condiciones de la síntesis caracterizando los productos obtenidos en cada etapa.

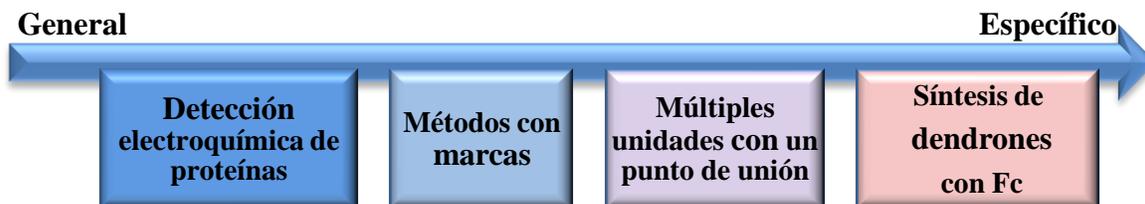


Fig. 15: Objetivos de este Trabajo Fin de Máster desde el objetivo general hasta el específico (punta de la flecha)

3.-EXPERIMENTAL

3.1.-MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1.- Material de vidrio

- Schlenks de 10, 25 y 50mL
- Columna cromatográfica (con filtro nº 3) de 5 cm de diámetro
- Condensador de reflujo
- Borboteador
- Embudo de extracción de 250 ml
- Vasos de precipitados de 100 y 500 ml
- Placa filtrante (nº 3)
- Filtro de nylon de 0.45 µm
- Jeringas Hammlton de 5 y 10 ml

3.1.2.- Reactivos

- Dendron PFd-G3-benzil-OH, *Polymer Factory*, Suiza
- Ácido ferrocenocarboxílico (FcCOOH) 97%, *Aldrich*, EEUU
- 6-Bromo-1-oxohexilferroceno (FcCO(CH₂)₅Br), *Aldrich*, EEUU
- Clorohidrato de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 98%, *Aldrich*, EEUU
- Cloruro de Oxalilo 2M en CH₂Cl₂(ClCOCOC1), *Aldrich*, EEUU
- 3,5-dihidroxibenzoato de metilo97 %, *Aldrich*, EEUU
- Hidróxido potásico, *WWR Prolabo*, Bélgica
- Óxido de Litio97 %, *Aldrich*, EEUU
- Carbonato de Cesio 99 %, *Aldrich*, EEUU
- Carbonato potásico, *WWR Prolabo*, Bélgica
- Trietilamina, 99%*Aldrich*, EEUU
- Ácido clorhídrico 37%, *WWR Prolabo*, Bélgica
- 4-Dimetil-aminopiridina (DMAP), *Aldrich*, EEUU
- Éter 18-corona-6 ≥99%, *Aldrich*, EEUU

- Sulfato de Magnesio (MgSO_4), *WWR Prolabo*, Bélgica
- Agua desionizada milli-Q
- Diclorometano (CH_2Cl_2), *J.T. Baker*, Alemania
- Acetona $\geq 99.5\%$, *Aldrich*, EEUU
- Éter de petróleo 99.9%, *J.T. Baker*, Alemania
- Acetato de Etilo (AcOEt), *J.T. Baker*, Alemania
- Tetrahidrofurano (THF), *J.T. Baker*, Alemania
- Dimetilsulfóxido (DMSO) *J.T. Baker*, Alemania
- Dietiléter (Et_2O) *J.T. Baker*, Alemania
- Dimetilformamida (DMF), *J.T. Baker*, Alemania
- Metanol (MeOH), *J.T. Baker*, Alemania
- Etanol (EtOH) 96 % *J.T. Baker*, Alemania

3.2.-TÉCNICAS INSTRUMENTALES

- **Espectroscopía Infrarroja**

Los espectros de infrarrojo han sido realizados en un espectrómetro Perkin-Elmer Paragon 1000 con un resolución de $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ en un rango comprendido entre 4000 y 400 cm^{-1} . Las muestras fueron preparadas en pastillas de KBr.

- **Resonancia Magnética Nuclear**

Los espectros de RMN de ^1H (a 400 MHz) y ^{13}C (a 100 MHz) han sido realizados en el espectrómetro AV400 usando como disolventes CDCl_3 o DMSO-d_6 según el compuesto a analizar y procesados con el Software MestreNova. Los valores de desplazamiento químico (δ) están expresados en ppm relativas al tetrametilsilano. Los espectros de ^{13}C han sido efectuados con desacoplamiento total de protón.

3.3.- SINTESIS

3.3.1.- Obtención de 3,5-bis(oxa(6-oxoferrocenil)hexil)benzoato de metilo {3,5-(FcCO(CH₂)₅O)₂-C₆H₃-COOMe} 1

3.3.1.1- A partir de 6-bromo-1-oxohexilferroceno {FcCO(CH₂)₅Br}

A una disolución de FcCO(CH₂)₅Br (400 mg, 1.1 mmol) en 4 ml de acetona seca se añadió K₂CO₃ (152 mg, 1.1 mmol), 3,5-dihidroxibenzoato de metilo {3,5-(OH)₂-C₆H₃-COOMe} (92 mg, 0.55 mmol) y éter 18-corona-6 (29 mg, 0.11 mmol). Se calentó la mezcla a reflujo durante 72 h observándose un cambio de color de naranja a pardo-rojizo.

Los compuestos coloreados, que contienen el grupo oxoferrocenilo, se separaron del residuo (al que previamente le fueron añadidos 10 ml de agua) por sucesivas extracciones con CH₂Cl₂ (7x10 ml). El extracto orgánico de color rojo-anaranjado se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó el disolvente a vacío obteniéndose un aceite rojo-anaranjado.

Posteriormente, los productos con el grupo Fc se separaron por cromatografía en columna de gel de sílice (7 cm de altura x 5 cm de diámetro) empleando como eluyente una mezcla Acetato de etilo/ Éter de petróleo. Para una proporción en volumen 2/8 eluye el compuesto de partida y para una proporción 6/4 el producto deseado.

Finalmente, se obtuvo 1 como sólido rojo-anaranjado por evaporación del disolvente a vacío durante 2 días con un rendimiento del 84 %.

3.3.1.2.- A partir de 6-yodo-1-oxohexilferroceno {FcCO(CH₂)₅I}

A una disolución de FcCO(CH₂)₅I (80 mg, 0.2 mmol) en 1 ml de acetona seca se añadió Cs₂CO₃ (65 mg, 0.2 mmol) o [K₂CO₃ (27 mg, 0.2 mmol)] y 3,5-dihidroxibenzoato de metilo {3,5- (OH)₂-C₆H₃- COOMe} (16.4 mg, 0.1 mmol;). Se calentó la mezcla a reflujo de durante 72 h observándose un cambio de color de naranja a pardo-rojizo.

Los compuestos coloreados, que contienen el grupo oxoferrocenilo, se separaron del residuo (al que previamente se habían añadido 10 ml de agua) por sucesivas extracciones con CH₂Cl₂ (3x10 ml). El extracto orgánico de color rojo-anaranjado se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó el disolvente a vacío obteniéndose un aceite rojo-anaranjado.

Posteriormente, los productos con Fc se separaron por cromatografía en columna de gel de sílice (7 cm de altura x 5 cm de diámetro) empleando como eluyente una mezcla Acetato de etilo/ Éter de petróleo. Para una proporción en volumen 2/8 eluyó el compuesto de partida y para una proporción 6/4 el producto deseado.

Finalmente, se obtuvo el producto 1 como sólido rojo anaranjado por evaporación del disolvente a vacío durante 2 días con un rendimiento del 80 %.

En la **figura 16** se muestra la estructura del compuesto **1** con sus carbonos numerados.

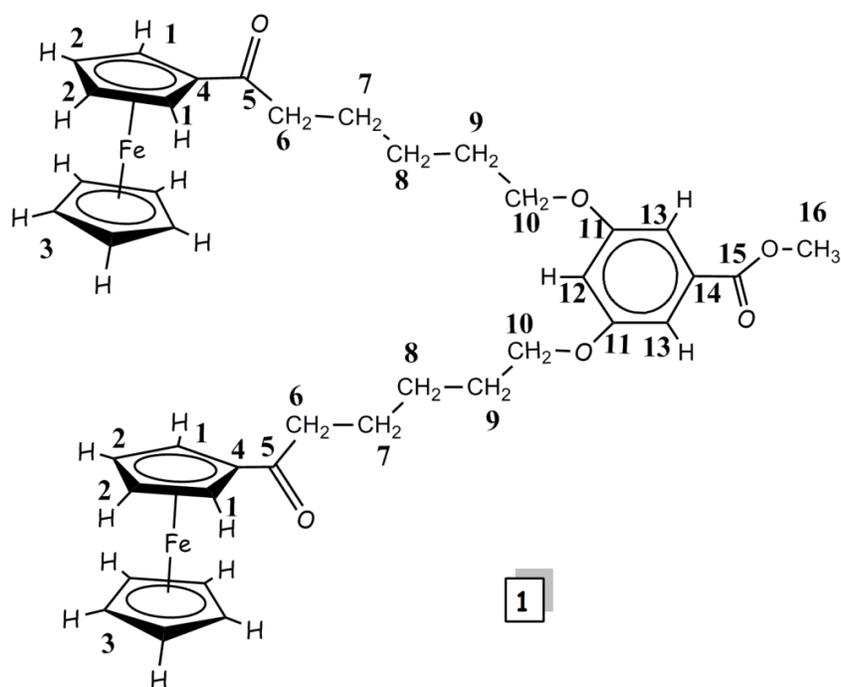


Fig. 16: Estructura del compuesto 1.

IR(KBr)(cm^{-1}): 1714 ($\nu_{C=O}$;benzoato);1660($\nu_{C=O}$;cetona); 1592 ($\nu_{C=C}$;aromático); 1450 (δ_{C-H});

RMN- 1H ($CDCl_3$)(δ/ppm): 7.17 (H_{13}); 6.65 (H_{12}); 4.79 (H_1); 4.50 (H_2); 4.20 (H_3); 4.00 (H_{10}); 3.90 (H_{16}); 2.74(H_6); 1.84 (H_9); 1.78 (H_7); 1.55 (H_8).

RMN- ^{13}C ($CDCl_3$)(δ/ppm): 204.51 (C_5); 166.90 (C_{15}); 160.05 (C_{11}); 131.82 (C_{14}); 107.70 (C_{13}); 106.53 (C_{12}); 79.01 (C_4); 72.20 (C_1); 69.75 (C_3); 69.37 (C_2); 68.04 (C_{10}); 52.19 (C_{16}); 39.52 (C_6); 29.10 (C_9); 25.98 (C_7); 24.23 (C_8).

3.3.2.- Obtención de 6-Yodo-1-oxohexilferroceno {FcCO(CH₂)₅I} 2

A una disolución de FcCO(CH₂)₅Br (454 mg, 1.25 mmol) en 15 ml de acetona seca se añadió KI (415 mg, 2.50 mmol). A continuación, se calentó la mezcla a reflujo durante 48 h observándose un progresivo cambio de color de naranja a rojo anaranjado. Seguidamente, se filtró la disolución sobre placa filtrante (n° 3) y después con filtro de nylon (0.45 µm) y se evaporó el disolvente. El producto resultante se secó a vacío durante 2 días obteniéndose un sólido de color rojo anaranjado con un rendimiento del 94%.

En la **figura 17** se muestra la estructura del compuesto 2 con sus carbonos numerados.

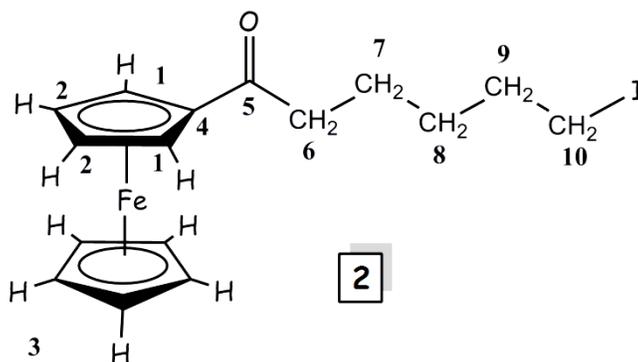


Fig. 17: Estructura del compuesto 2.

RMN-¹H (CDCl₃)(δ/ppm): 4.78 (H₁); 4.50 (H₂); 4.20(H₃); 3.23(H₁₀); 2.72 (H₆); 1.89 (H₉); 1.74 (H₇); 1.5(H₈).

RMN-¹³C (CDCl₃)(δ/ppm): 204.16 (C₅); 79.02 (C₄); 72.20 (C₁); 69.76 (C₃); 69.30 (C₂); 39.37 (C₁₀); 33.37 (C₆); 30.40 (C₉); 23.35 (C₇); 6.89 (C₈)

3.3.3.- Hidrólisis básica del éster del punto focal

3.3.3.1.- Obtención de 3,5-bis(oxa(6-oxoferrocenil)hexil)benzoato de etilo {3,5-(FcCO(CH₂)₅O)₂-C₆H₃-COOEt}3

A una disolución de 3,5-(FcCO(CH₂)₅O)₂-C₆H₃-COOMe 1 (100 mg, 0.14 mmol) en 10 ml de EtOH se añadieron 3.4 ml de KOH 0.04M en EtOH (0.14 mmol). A continuación, se calentó la mezcla a 50°C durante 24 h.

Posteriormente, se añadió gota a gota una disolución de HCl 37% en EtOH (1:20, v/v) sobre la mezcla de reacción hasta la aparición de un precipitado de color salmón. El sólido se filtró en placa (n° 3) y se lavó con agua desionizada (4x3ml).

Finalmente, el compuesto se secó a vacío durante 2 días obteniéndose un rendimiento del 95%.

En la **figura 18** se muestra la estructura del compuesto 3 con sus carbonos numerados.

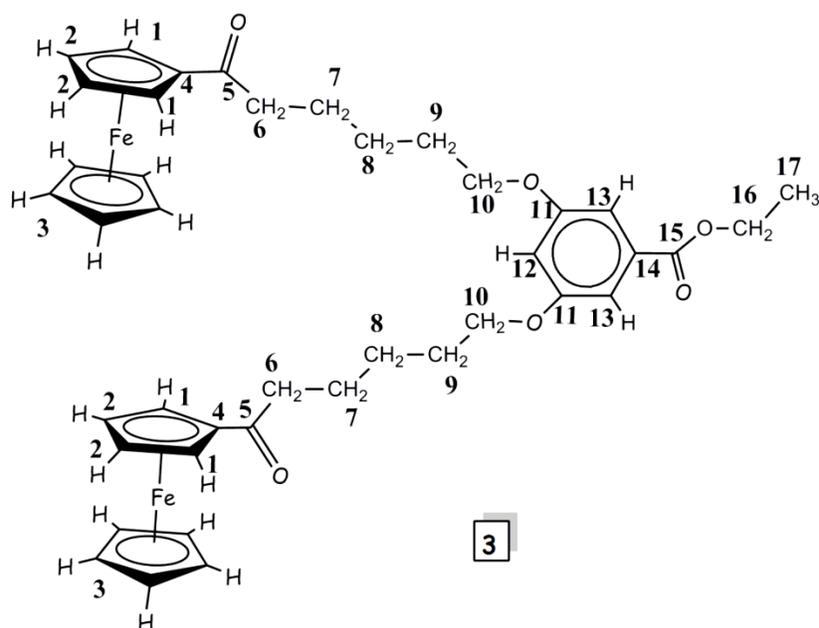


Fig. 18: Estructura del compuesto **3**.

RMN-¹H (*CDCl*₃)(*δ/ppm*): 7.18 (H₁₃); 6.65 (H₁₂); 4.80 (H₁); 4.51 (H₂); 4.38 (H₁₆); 4.21 (H₃); 4.03 (H₁₀); 2.76(H₆); 1.84 (H₉); 1.80 (H₇); 1.58 (H₈); 1.39 (H₁₇).

RMN-¹³C (*CDCl*₃)(*δ/ppm*): 204.32 (C₅); 166.41 (C₁₅); 160.04 (C₁₁); 132.24 (C₁₄); 107.71 (C₁₃); 106.27 (C₁₂); 79.08 (C₄); 72.16 (C₁); 69.75 (C₃); 69.31 (C₂); 68.04 (C₁₀); 61.06 (C₁₆); 39.54 (C₆); 29.13 (C₉); 26.00(C₇); 24.23(C₈); 14.35 (C₁₇).

3.3.3.2.- Obtención del ácido 3,5-bis(oxa(6-oxoferrocenil)hexil) benzoico {3,5-FcCO(CH₂)₅O)₂-C₆H₃-COOH} **4**

A una disolución de 2.2 mg de Li₂O (0.07 mmol) en una mezcla de 2 ml de THF y 2 ml de agua se añadieron 20 mg de 3,5-(FcCO(CH₂)₅O)₂-C₆H₃-COOMe **1** (0.03 mmol). La mezcla se calentó a 45 °C durante 24 h observándose un cambio de color de rojo a naranja. A continuación, se evaporó el disolvente orgánico a vacío y sobre la disolución acuosa se añadieron dos gotas de HCl concentrado observando la aparición de un precipitado de color granate. Posteriormente, se decantó el líquido y se lavó el residuo sucesivas veces con agua desionizada (4x3ml).

Finalmente, el producto se secó a vacío durante 3 días obteniéndose un rendimiento del 88 %.

En la **figura 19** se muestra la estructura del compuesto **4** con sus carbonos numerados.

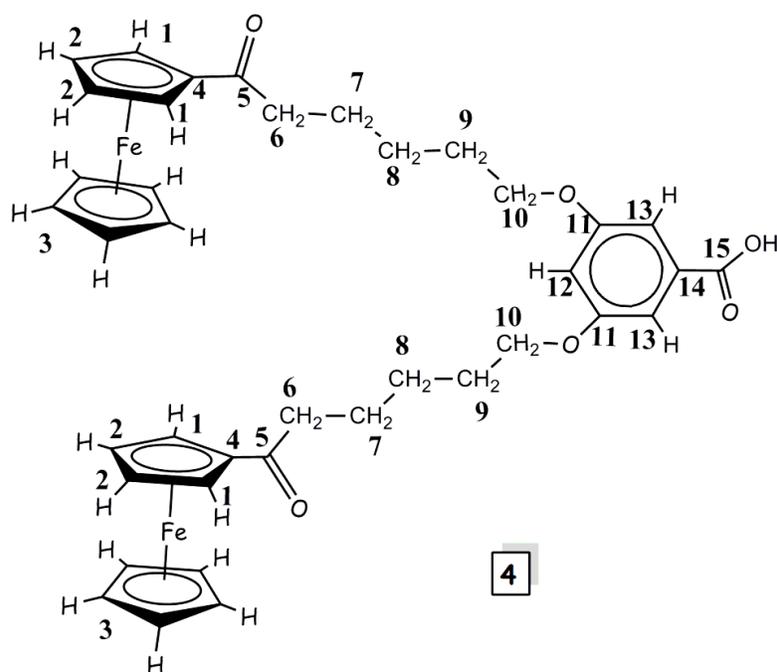


Fig. 19: Estructura del compuesto 4.

IR(KBr)(cm^{-1}): 1720 ($\nu_{C=O}$; ácido carboxílico); 1664($\nu_{C=O}$;cetona); 1592 ($\nu_{C=C}$;aromático); 1450 (δ_{C-H}).

RMN- 1H ($CDCl_3$)(δ/ppm): 7.25 (H_{13}); 6.70 (H_{12}); 4.80 (H_1); 4.51 (H_2); 4.21 (H_3); 4.02 (H_{10}); 2.76(H_6); 1.86 (H_9); 1.80 (H_7); 1.58 (H_8).

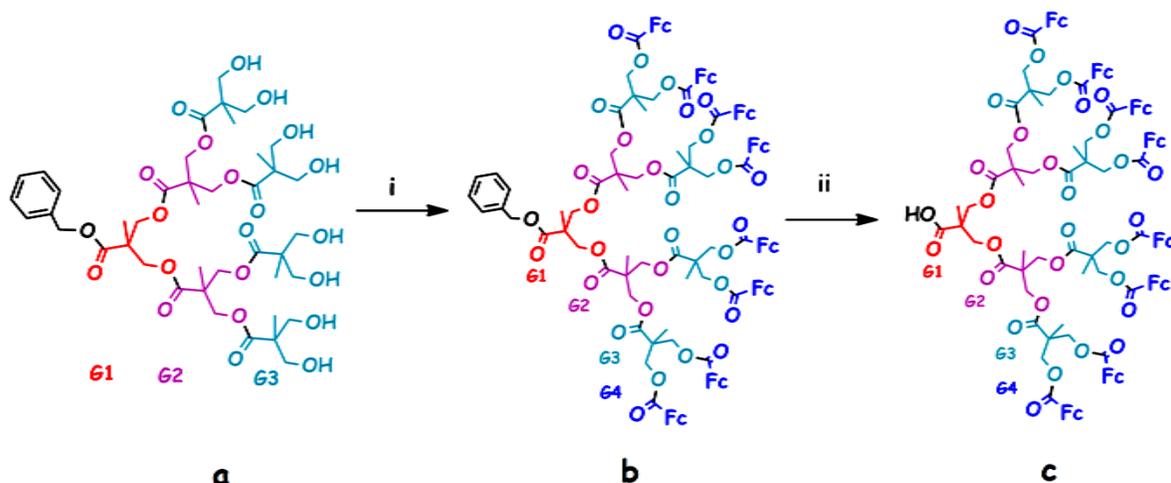
RMN- ^{13}C ($CDCl_3$)(δ/ppm): 204.49 (C_5); 160.50 (C_{11}); 108.47 (C_{13}); 107.19 (C_{12}); 79.08 (C_4); 72.19 (C_1); 69.77 (C_3); 69.35 (C_2); 68.19 (C_{10}); 39.56 (C_6); 29.11 (C_9); 26.01(C_7); 24.26(C_8) (los carbonos C_{14} y C_{15} no se aprecian por estar la muestra muy diluída).

4.-DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tal y como se comentó en los objetivos, tratamos de obtener dendrones con grupos ferrocenilo en la superficie siguiendo dos rutas diferentes, una a partir de un dendrón comercial y otra sintetizándolo a partir de un derivado del ferroceno.

4.1.-FUNCIONALIZACIÓN DE UN DENDRÓN COMERCIAL CON FERROCENO

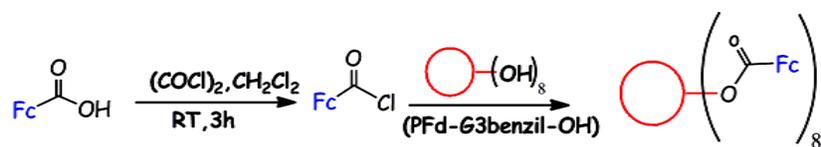
Así, se compró el dendrón PFd-G3-benzil-OH (**a en el esquema 6**) con la intención de introducir 8 grupos ferrocenilo en su superficie, aprovechando la reactividad de los alcoholes periféricos (paso i del esquema 6), y modificar su punto focal pasando de un grupo éster {C(O)OPh} a un grupo ácido carboxílico {C(O)OH} (paso **ii del esquema 6**) a través del cual pueda unirse a las biomoléculas.



Esquema 6: Formación del dendrón con grupos ferrocenilo en la superficie (b) y un ácido carboxílico en el punto focal (c) a partir de un dendrón comercial (a). **(i)** anclaje del grupo ferrocenilo; **(ii)** hidrólisis del éster del punto focal. Fc={(η^5 -C₅H₅)(η^5 -C₅H₄)Fe}

Inicialmente, se trató de llevar a cabo la modificación superficial (paso i, esquema 6) por reacción de **a** con el ácido ferrocenocarboxílico (FcCOOH) en presencia de EDC que facilita la formación del éster⁶⁴. Sin embargo, de la mezcla resultante no se pudo aislar el producto deseado (**b en esquema 6**) ni por extracción con distintos disolventes ni por cromatografía en columna.

Posteriormente, se intentó obtener el mismo producto **b** por reacción de **a** con FcCOCl. Éste cloruro de ácido, de color cereza, fue preparado “in situ” agitando, durante 3 h a temperatura ambiente, una mezcla del ácido ferrocenocarboxílico (FcCOOH) con el doble número de moles de cloruro de oxalilo, (COCl)₂, en diclorometano⁶⁵⁻⁶⁷ (**esquema 7**). Eliminado el exceso de cloruro de oxalilo a vacío, se redisolvió el sólido resultante en DMF y se añadió el dendrón comercial (en proporción 1/14 para asegurar que a cada alcohol le correspondiese más de un cloruro de ácido) y se dejó agitar la mezcla un día, observándose un cambio de color a marrón amarillento.



Esquema 7: Reacción de síntesis del cloruro de ácido y posterior reacción con el dendrón

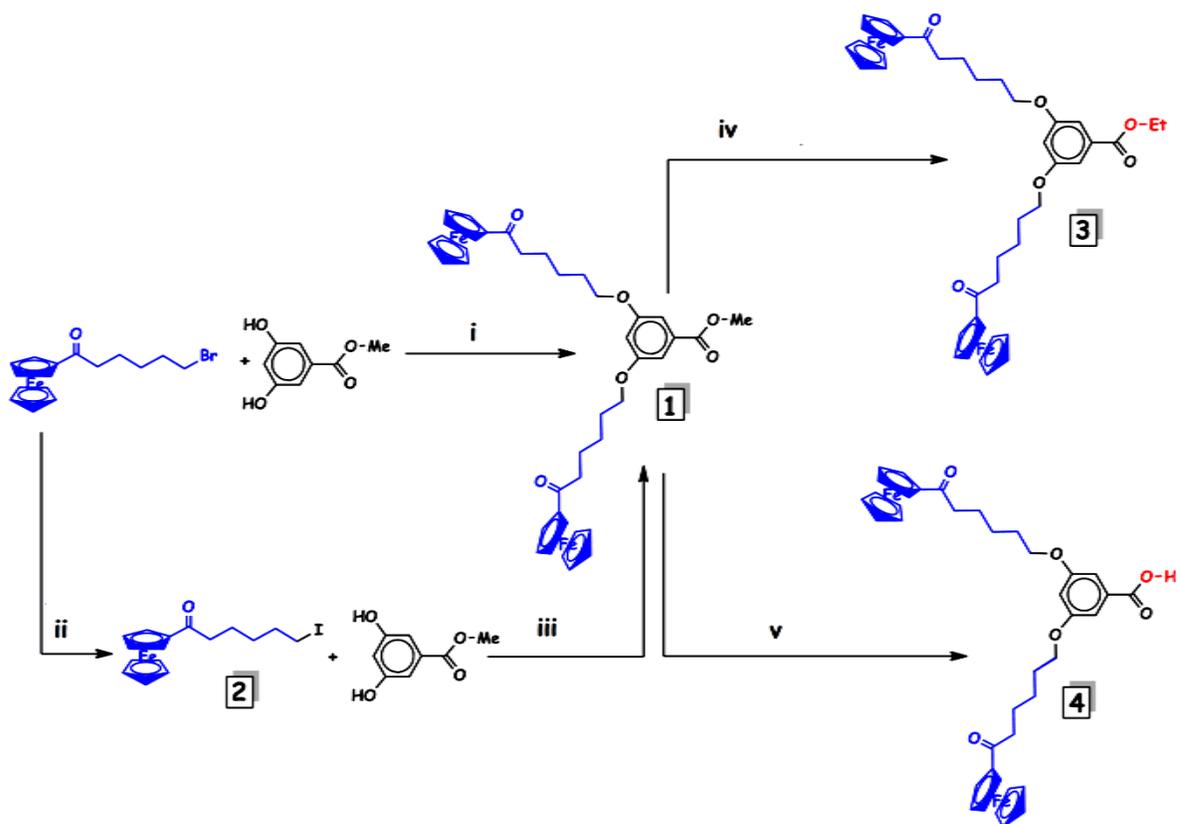
Sin embargo, al igual que en el caso anterior, no se pudo obtener **b**, el producto deseado, de la mezcla de reacción ni por extracción en diferentes disolventes ni por cromatografía en columna. Por lo tanto, no se pudo continuar con la hidrólisis del éster del punto focal (**ii en el esquema 6**) para obtener el ácido **c**.

Estos resultados concuerdan con lo explicado con anterioridad (sección 1.3.2.1) en el sentido de que la funcionalización de la superficie, el aislamiento de los productos y la síntesis de posteriores generaciones son procesos más complejos a medida que aumenta la generación del polímero dendrítico debido a los impedimentos estéricos producidos por el solapamiento de las ramificaciones.

Por todo ello, se optó por sintetizar un nuevo dendrón a partir de un derivado del ferroceno.

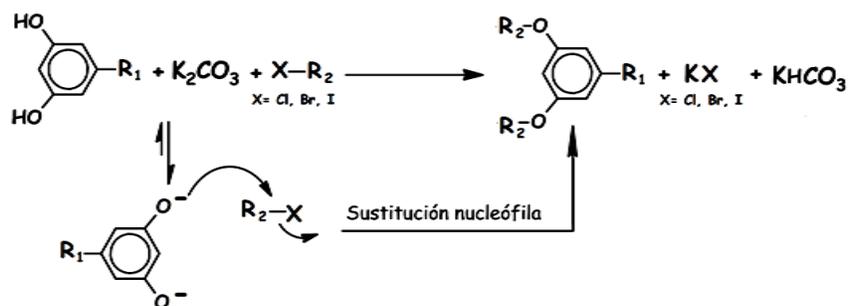
4.2.-SÍNTESIS DE UN DENDRÓN CON DOS UNIDADES DE FERROCENO

El primer paso consistió en sintetizar el dendrón de primera generación, 3,5-bis(oxa(6-oxoferrocenil)hexil) benzoato de metilo, **1**, con dos grupos ferrocenilo periféricos y cuyo punto focal es un éster, a partir de un compuesto comercial con un grupo ferrocenilo, el 6-Bromo-1-oxohexilferroceno {FcCO(CH₂)₅Br}, por reacción con el 3,5-dihidroxo-benzoato de metilo en presencia de carbonato potásico y un éter corona (reacción i en el esquema 8).



Esquema 8:(i) K₂CO₃, éter 18-corona-6/ acetona, 60°C, 72 h; (ii) KI/acetona, 60°C, 48 h; (iii) K₂CO₃ o Cs₂CO₃/acetona, 60°C, 72 h; (iv) 1. KOH/EtOH, 50°C, 24h,2.HClconc./EtOH; (v) 1. Li₂O/ THF/H₂O, 45°C, 24h,2.HClconc./ H₂O.

La formación de un éter fenólico por reacción de un fenol con un haloalcano en presencia de un carbonato alcalino es una reacción estándar de química orgánica, denominada “síntesis de éteres de Williamson”,⁷² (esquema 9).



Esquema 9: Mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$ de la síntesis de éteres de Williamson.

Esta reacción se basa en el ataque nucleófilo de alcóxidos, obtenidos por desprotonación de alcoholes con bases fuertes, a un haloalcano primario siendo desplazado el halógeno. Se lleva a cabo en medios apróticos polares ya que favorecen la sustitución nucleófila en lugar de la eliminación E_2 .

Tras 72 horas de reacción a reflujo en acetona se obtuvo una mezcla de productos que fueron separados por cromatografía en columna de sílicagel. Empleando una mezcla de acetato de etilo/éter de petróleo (6/4, v/v) como eluyente se pudo aislar el producto deseado **1**, pero con tan solo el 30% de rendimiento.

Para mejorar el rendimiento se repitió la reacción anterior añadiendo una cantidad catalítica de éter 18-corona-6^{55,68,69} que forma complejos con el catión K^+ selectivamente⁷² y solubiliza, por tanto, mayor cantidad de carbonato potásico. De esta forma, el rendimiento subió a 84 % .

La estructura del compuesto **1** (esquema 8) viene avalada por los datos espectroscópicos de IR, ^{13}C RMN y ^1H RMN.

Del espectro de IR de **1** se ha preferido destacar únicamente las absorciones especialmente significativas, las que se recogen en la **figura 20**. Las bandas que aparecen son: 1714 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$; **benzoato**), 1660 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$; **cetona**), 1592 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=C}}$; **aromático**) y 1450 cm^{-1} ($\delta_{\text{C-H}}$). Las bandas de la cetona a 1660 cm^{-1} y de la deformación CH de los grupos metileno a 1450 cm^{-1} implican la presencia del grupo $\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5$, mientras que las bandas del grupo carbonilo del éster a 1715 cm^{-1} y de la tensión C=C del grupo aromático a 1592 cm^{-1} refrendan la presencia del grupo $-\text{C}_6\text{H}_3-\text{COOMe}$.

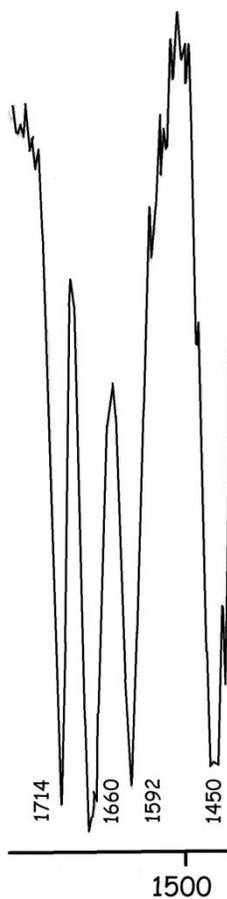


Fig. 20: Bandas características en el espectro IR (KBr) del producto **1**.

Su espectro de ^1H RMN (**Figura 21**) muestra las bandas típicas del grupo ferrocenilo a 4.79, 4.50 y 4.20 ppm con intensidades relativas 4/4/10, que aparecen prácticamente a los mismos desplazamientos químicos que en el espectro de protón del compuesto de partida $\{\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{Br}\}$, recogido en la **figura 22**. De otro lado, el espectro de **1** muestra las señales de los protones de los cinco grupos CH_2 a 4.0, 2.74, 1.84, 1.78 y 1.55 ppm, esto es a desplazamientos químicos muy semejantes a los observados para los mismos protones en el compuesto bromado de partida ($6'$ - $10'$ en **figura 22**). Sin embargo, y tal como era de esperar, la señal correspondiente a los hidrógenos del grupo metilo unido al oxígeno del éter fenólico (carbono 10) aparece claramente a campo más bajo que la señal de los hidrógenos $10'$ del $\{\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{Br}\}$, (4.00 ppm vs. 3.45 respectivamente). Por otra parte, el singlete correspondiente al metilo del grupo éster (16 en **figura 20**) situado a 3.90 ppm aparece prácticamente en el mismo sitio que el metilo del 3,5-dihidroxobenzoato de metilo de partida ($6''$ en **figura 23**); las pequeñas diferencias observadas son debidas muy probablemente al cambio de disolvente. Finalmente, los picos atribuidos a los protones del anillo aromático (12y 13 en la **figura 21**) situados a 7.17 y 6.65 ppm aparecen a campo más bajo respecto al desplazamiento químico de las mismas señales en el benzoato de partida {6.75 ($3''$) y 6.43 ($2''$) **figura 23**}, debido sin duda a la formación de los grupo éter.

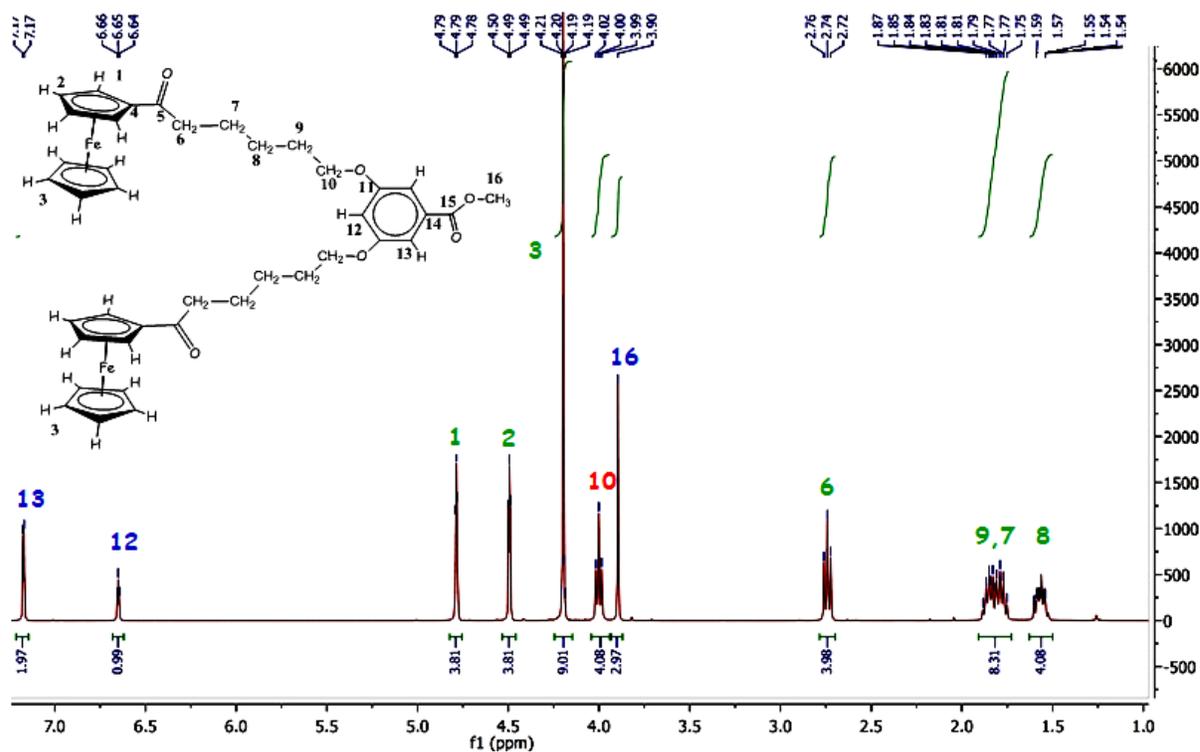


Fig. 21: Espectro ^1H RMN (CDCl_3) del 3,5-(FcCO(CH $_2$) $_5$ O) $_2$ -C $_6$ H $_3$ -COOMe **1**. Con numeración en rojo: señales diferentes a las de los reactivos; en azul: señales semejantes a las del 3,5-dihidroxibenzoato de metilo; en verde: señales semejantes a las del {FcCO(CH $_2$) $_5$ Br}.

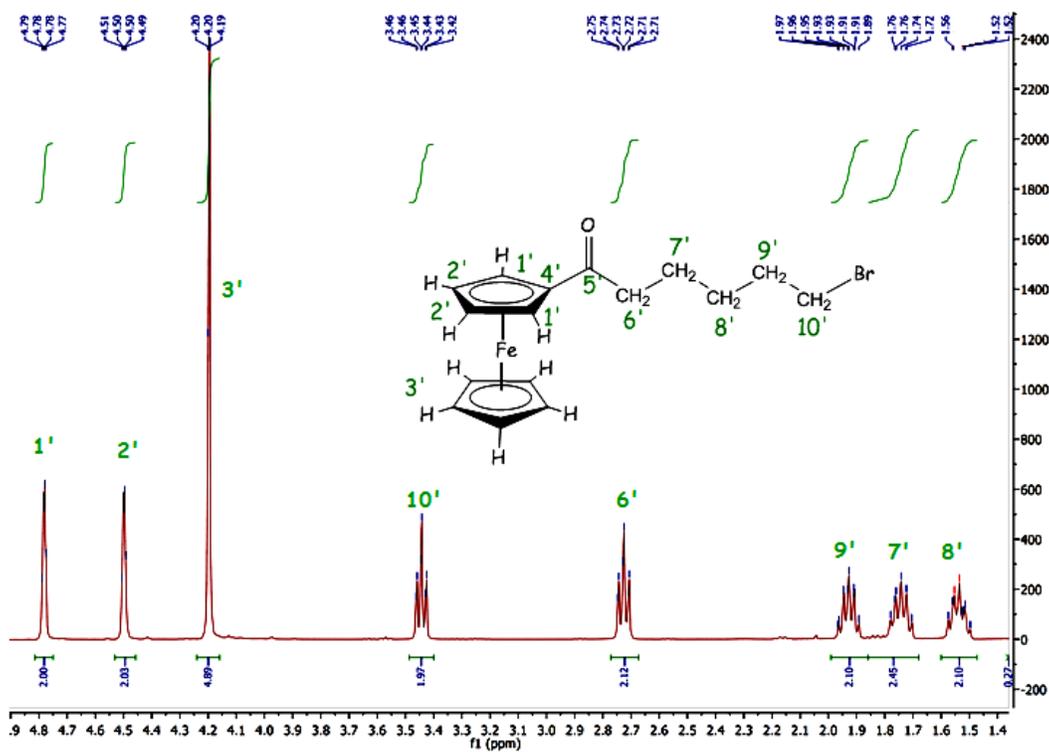


Fig. 22: Espectro ^1H RMN (CDCl_3) del $\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{Br}$.

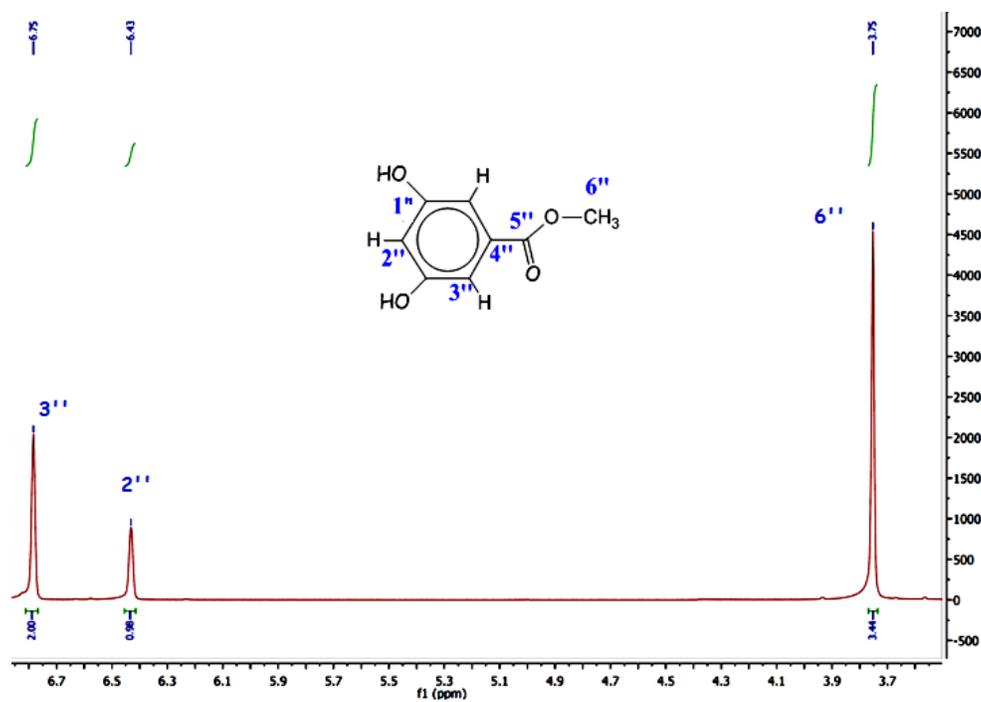


Fig. 23: Espectro ^1H RMN (DMSO-d_6) del 3,5-dihidroxibenzoato de metilo.

Por otra parte, comparando el espectro de ^{13}C RMN del producto **1** (**figura 24**) con el espectro del bromoderivado de partida (**figura 25**) fácilmente se aprecia que los desplazamientos químicos de las señales correspondientes al grupo ferrocenilo, a 79.01 (C_4), 72.20 (C_1), 69.75 (C_3), 69.37 (C_2) ppm, son prácticamente coincidentes. Lo mismo ocurre con el desplazamiento químico de la señal del grupo carbonilo (C_5) a 204.51 ppm. Las señales de los carbonos de los grupos metileno, CH_2 , aparecen en la misma zona pero más o menos desplazados. Así, los carbonos 10 y 6 del producto **1** aparecen a campo más bajo {68.03 (C_{10}) y 39.51 (C_6) frente a 39.40 ($\text{C}_{10'}$) y 33.68 ($\text{C}_{6'}$) del $[\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{Br}]$. Los carbonos 9 y 7 del 3,5-bis(oxa(6-oxoferrocenil) hexil) benzoato de metilo, por el contrario, aparecen a campo más alto {29.10 (C_9); 25.98 (C_7) frente a 32.67 ($\text{C}_{9'}$); 28.07 ($\text{C}_{7'}$) del $[\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{Br}]$. Por su parte, el carbono 8 queda más o menos inalterado {24.23 en **1** frente a 23.57 en el bromoderivado de partida}. El desplazamiento de la señal del carbono del metilo del grupo éster en **1** (C_{16} en **figura 24**) a 52.19 ppm coincide básicamente con el desplazamiento del mismo carbono en el benzoato de partida ($\text{C}_{6''}$ en la **figura 26**) a 52.64 ppm. Las señales correspondientes a los carbonos del anillo aromático del compuesto **1** mantienen el formato de las mismas señales en el 3,5 dihidroxo-benzoato de metilo {160.05 (C_{11}); 131.82 (C_{14}); 107.70 (C_{13}); 106.53 (C_{12}) en la **figura 24**; frente a 156.81 ($\text{C}_{11''}$); 132.64 ($\text{C}_{14''}$); 108.32 ($\text{C}_{13''}$); 107.42 ($\text{C}_{12''}$) en la **figura 26**}. Finalmente, el desplazamiento del carbono del grupo carbonilo del éster aparece menos apantallado en el compuesto final **1** que el benzoato de partida {166.90 (C_{15}) frente a 162.83 ($\text{C}_{5''}$) respectivamente}. Parte de este cambio es sin duda por el uso de disolventes diferentes.

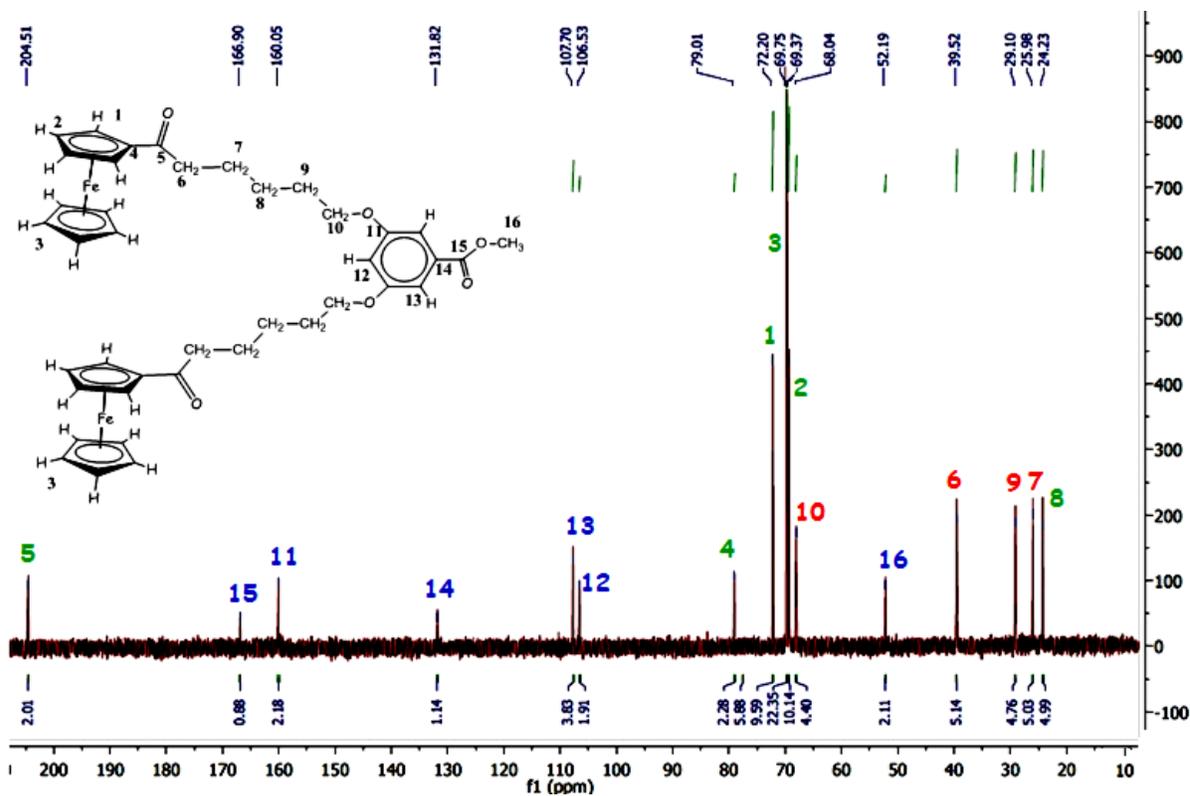


Fig. 24: Espectro ^{13}C RMN del 3,5-(FcCO(CH₂)₅O)₂-C₆H₃-COOMe **1**. Con numeración en rojo: señale que cambian respecto a los reactivos; en azul: señales que aparecen similares a las del 3,5-dihidroxibenzoato de metilo; en verde: señales similares a las del FcCO(CH₂)₅Br.

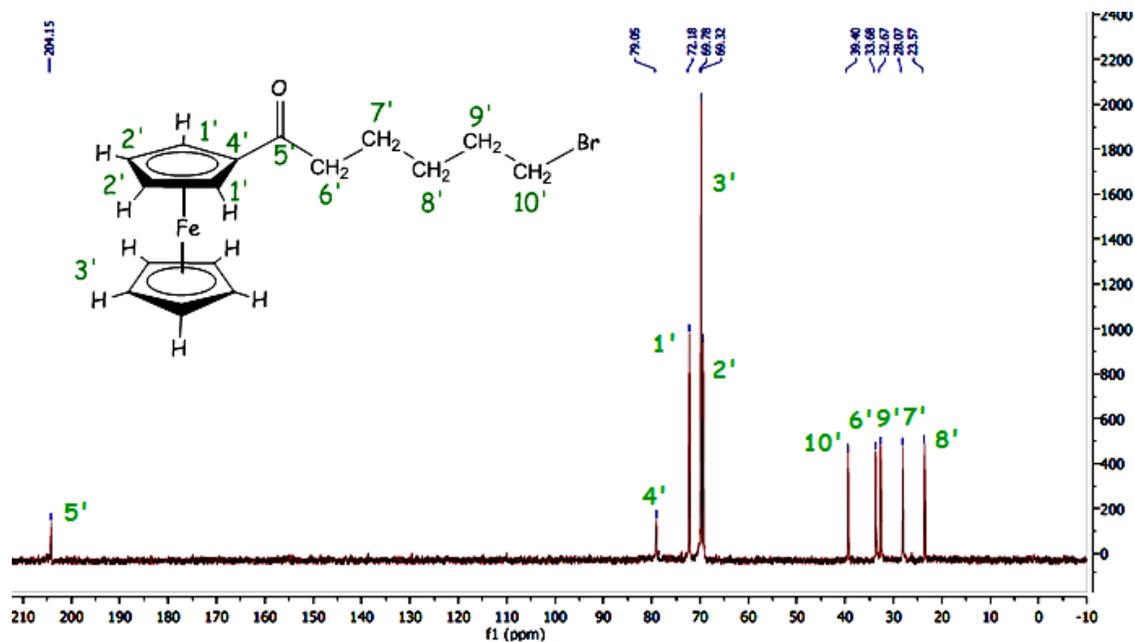


Fig. 25: Espectro ¹³C RMN (CDCl₃) del FcCO(CH₂)₅Br

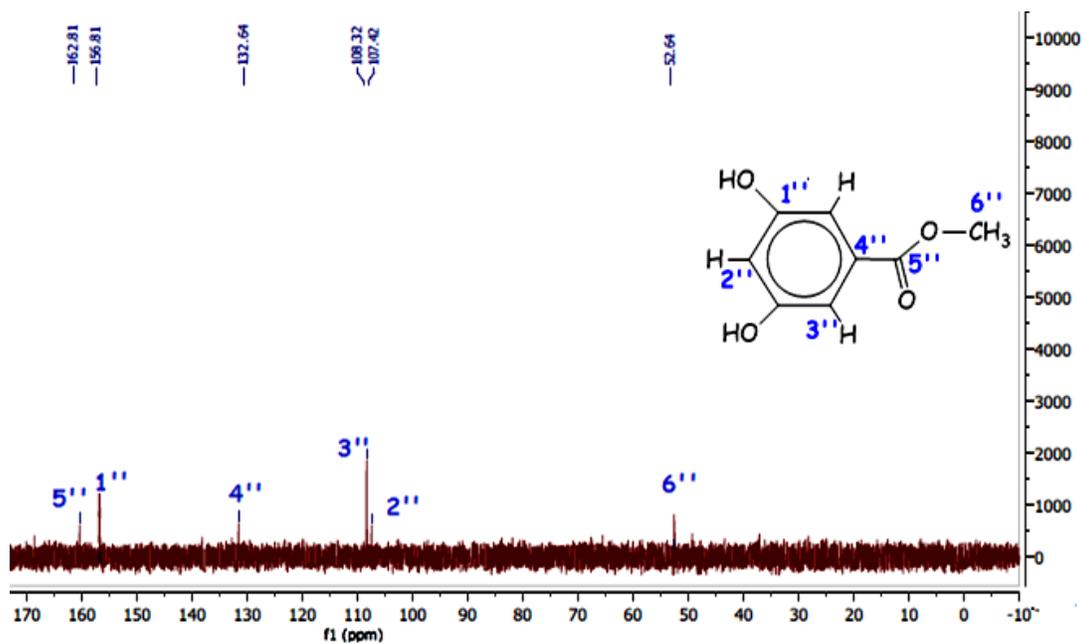
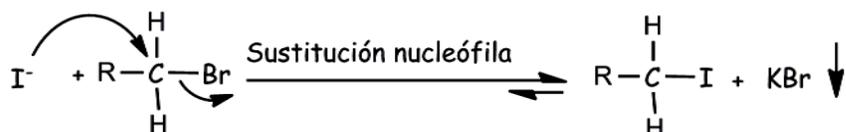


Fig. 26: Espectro ¹³C RMN (DMSO-d₆) del 3,5-dihidroxibenzoato de metilo

Otra forma de obtener el mismo producto **1** es a partir del 6-iodo-1-oxohexilferroceno {FcCO(CH₂)₅I}^{70,71} (**2** en el esquema 8) en lugar del FcCO(CH₂)₅Br (**reacción iii en el esquema 8**). Dado que el Iodo es mejor grupo saliente que el Bromo (el enlace carbono–iodo es más débil que el enlace carbono-bromo)⁷² se espera que la reacción vaya en condiciones más suaves o al menos que no sea necesario añadir el éter corona.

Dado que el FcCO(CH₂)₅I no es comercial hubo que prepararlo calentando a reflujo una disolución del bromoderivado {FcCO(CH₂)₅Br} en acetona con un exceso (2:1) de KI (ii en el esquema 8). Tras eliminar por filtración el KBr formado y el KI sin reaccionar (primero en placa filtrante del 3 y después con microfiltro de nylon de 0,45µL), se evaporó el disolvente a vacío obteniéndose el producto deseado **2** {FcCO(CH₂)₅I} con un rendimiento del 94%.

Esta reacción, conocida como metátesis o intercambio de halógeno, se basa en el ataque nucleófilo del ión yoduro a un carbono primario unido a bromo siguiendo un mecanismo de sustitución S_N2 en medios polares apróticos⁷²(**esquema 10**).



Esquema 10: Mecanismo de intercambio de halógeno.

La reacción está favorecida hacia la formación del iodoalcano por la precipitación de bromuro potásico (KBr), sal más insoluble en medios orgánicos que el yoduro potásico (KI).

Puesto que la reacción no puede ser seguida mediante cromatografía en capa fina (TLC), se dejó transcurrir un periodo de 48 h asegurando el intercambio completo del halógeno.

Que la sustitución fue efectiva y total se pudo comprobar fácilmente comparando los espectros de protón y carbono 13 de $\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{I}$ (**figuras 27 y 28**) con los espectros correspondientes del compuesto de partida $\{\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{Br}\}$ (**figuras 22 y 25**), donde se ha hecho la correspondiente asignación. En particular, es muy significativo que en el espectro de protón de **2** no aparezca señal alguna a 3.45 ppm (debida a los protones unidos al carbono 10' del bromo derivado, véase **figura 22**) y, en cambio, aparezca una señal a 3.23 ppm debida a los hidrógenos del carbono unido al yodo. En el espectro de carbono 13 el cambio más significativo no es el debido al carbono unido al halógeno sino el que corresponde al carbono 8, que en el bromoderivado aparece a 23.57 ppm (8' en **figura 25**) y que en el iododerivado está a 6.89 ppm.

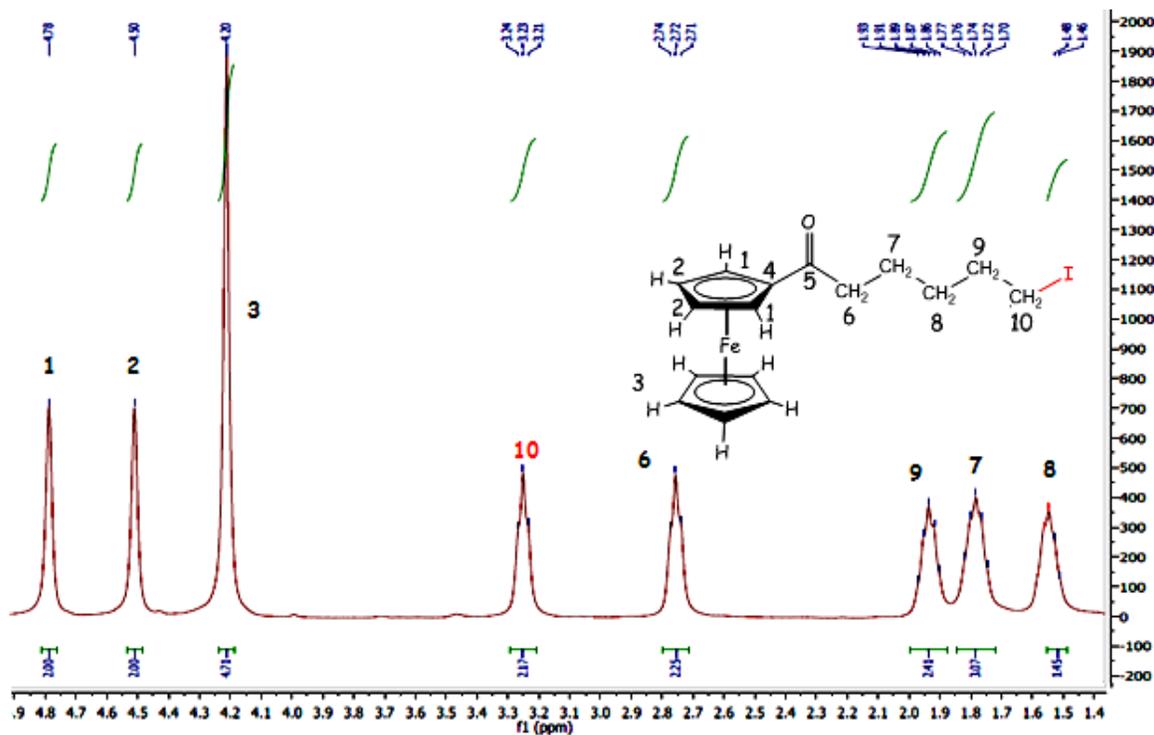


Fig. 27: Espectro ^1H RMN (CDCl_3) del producto **2**. La señal que cambia de forma significativa respecto a la del reactivo se indica con numeración roja.

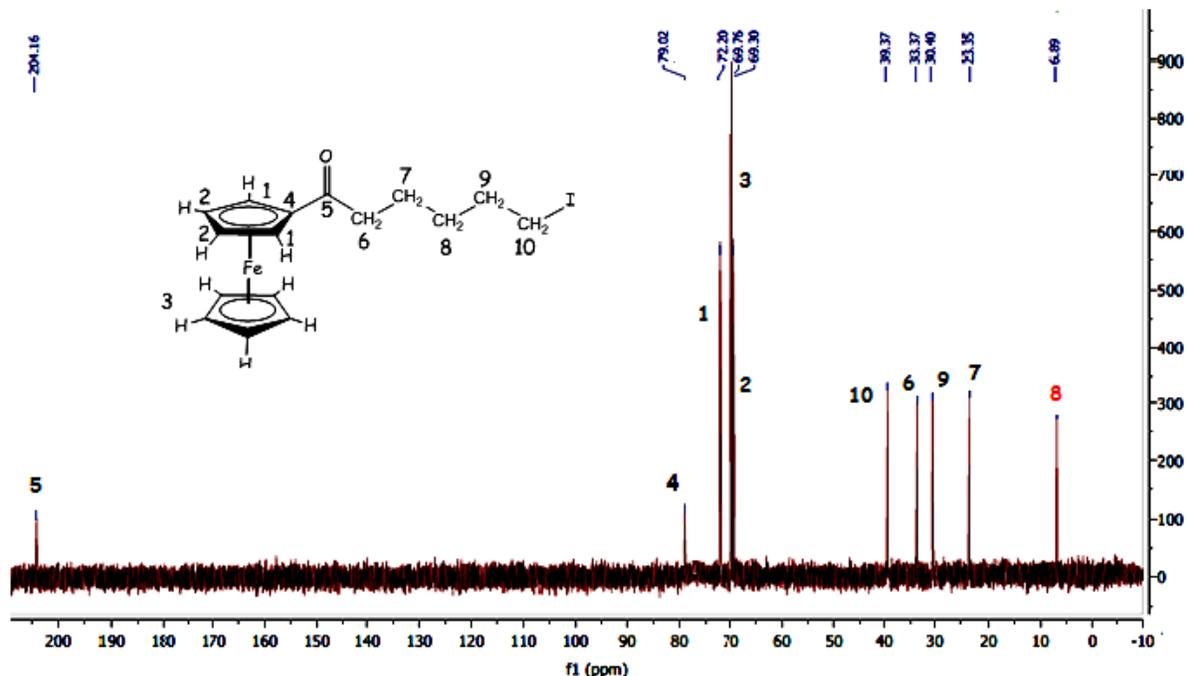


Fig. 28: Espectro ^{13}C RMN (CDCl_3) del producto **2**. La señal que cambia de forma significativa respecto a la del reactivo se indica con numeración roja.

Pues bien, cuando se llevó a cabo la reacción del 3,5-dihydroxobenzoato de metilo con el derivado del $\{\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{I}\}$ **2** para obtener **1** no fue necesaria la presencia de éter 18-corona-6 sino sólo la del carbonato potásico (K_2CO_3), necesario para la desprotonación del fenol (**reacción iii del esquema 8**), y el rendimiento de la reacción fue superior al 80%. Cuando la misma reacción se llevó a cabo empleando carbonato de cesio (Cs_2CO_3), cuyo catión es de mayor tamaño, el rendimiento fue similar.

Finalmente, se llevó a cabo la síntesis paralela del compuesto **1** a partir del bromoderivado en presencia de K_2CO_3 y éter 18-corona-6 (**ii en el esquema 8**), y a partir del yododerivado **2** en presencia de K_2CO_3 sin éter 18-corona-6 (**iii en el esquema 8**). Comparando las placas TLC realizadas a las 24 h de reacción (**figura 28**) se observa que efectivamente, se obtiene el mismo producto y, aproximadamente, con el mismo rendimiento.

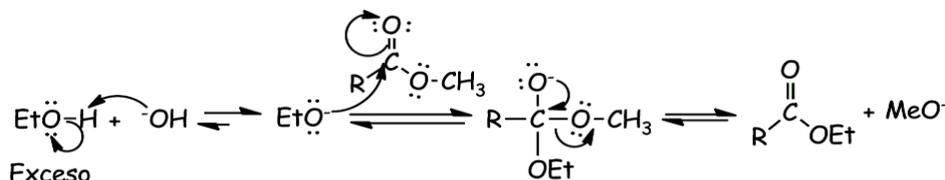


Fig. 29: Imagen de la placa TLC en Acetato de etilo/éter de petróleo 2/8 (v/v) realizada a las 24 h de la reacción. (En la imagen, “8” significa productos obtenidos a partir de $\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{Br}$ en presencia de K_2CO_3 y éter 18-corona-6; “9” significa productos obtenidos a partir de $\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{I}$ en presencia de K_2CO_3 sin éter 18-corona-6).

A continuación, se procedió a la activación del punto focal del dendrón, transformando el éster metílico en ácido carboxílico, de modo que aumentaran tanto su reactividad como su solubilidad. Para ello, se llevó a cabo la hidrólisis básica del éster $\{3,5\text{-(FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{O)}_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-COOMe}\}$ **1** para obtener el ácido $\{3,5\text{-(FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{O)}_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-COOMe}\}$ **4**.

Inicialmente, se intentó hidrolizar el $3,5\text{-(FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{O)}_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-COOMe}$ **1** con hidróxido potásico en etanol a 50°C durante un día, seguido de la adición de ácido clorhídrico concentrado, tal y como indica la bibliografía⁷³, sin embargo, lo que se obtuvo es un producto de transestrificación, el 3,5-bis(oxa(6-oxoferrocenil)hexil) benzoato de etilo $\{3,5\text{-(FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{O)}_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-COOEt}\}$ **3** (reacción iv del esquema 8).

La transesterificación (véase esquema 11) se inicia probablemente con la formación de etóxido sódico por acción de la potasa sobre el etanol. A continuación el etóxido formado, EtO^- , atacaría al grupo carbonilo del éster que se deseaba hidrolizar y el sistema evolucionaría finalmente a la formación del éster etílico con la consiguiente eliminación del grupo metoxi⁷². Se trataría, por tanto, de una serie de equilibrios que está desplazado hacia la derecha por el exceso de disolvente (EtOH).



Esquema 11: Mecanismo de la reacción de transesterificación.

Los datos espectroscópicos ^1H RMN y ^{13}C RMN del producto **3** avalan su estructura. Para ello, basta comparar el espectro de ^1H RMN del producto encontrado 3,5-bis(oxa(6-oxoferrocenil)hexil) benzoato de etilo **3** con el espectro del compuesto de partida {3,5-(FcCO(CH₂)₅O)₂-C₆H₃-COOMe} **1** (figura 30). Se observa en primer lugar que casi todas las señales presentan el mismo desplazamiento químico. Lo único novedoso es la desaparición de la banda de los protones del grupo metoxi del éster del compuesto **1** a 3.90 ppm en el espectro del compuesto **3** y la aparición, en el espectro de **3**, de dos nuevas bandas a 4.38 y 1.39 ppm que integran dos y tres protones respectivamente, características de un grupo etoxi del éster.

Por otro lado, comparando los espectros de ^{13}C RMN de **1** y **3** (figura 31) los únicos cambios apreciables observados son los que cabe esperar de sustituir un grupo metilo por un grupo etilo. Así, la señal del carbono del grupo metilo del compuesto de partida que aparece a 52.19 ppm en el primer espectro, no aparece en el espectro de **3**, mientras que en el mismo espectro (el de **3**) aparecen dos señales a 61.63 y a 14.05 ppm correspondientes al grupo etilo, que naturalmente no aparecen en el espectro de **1**.

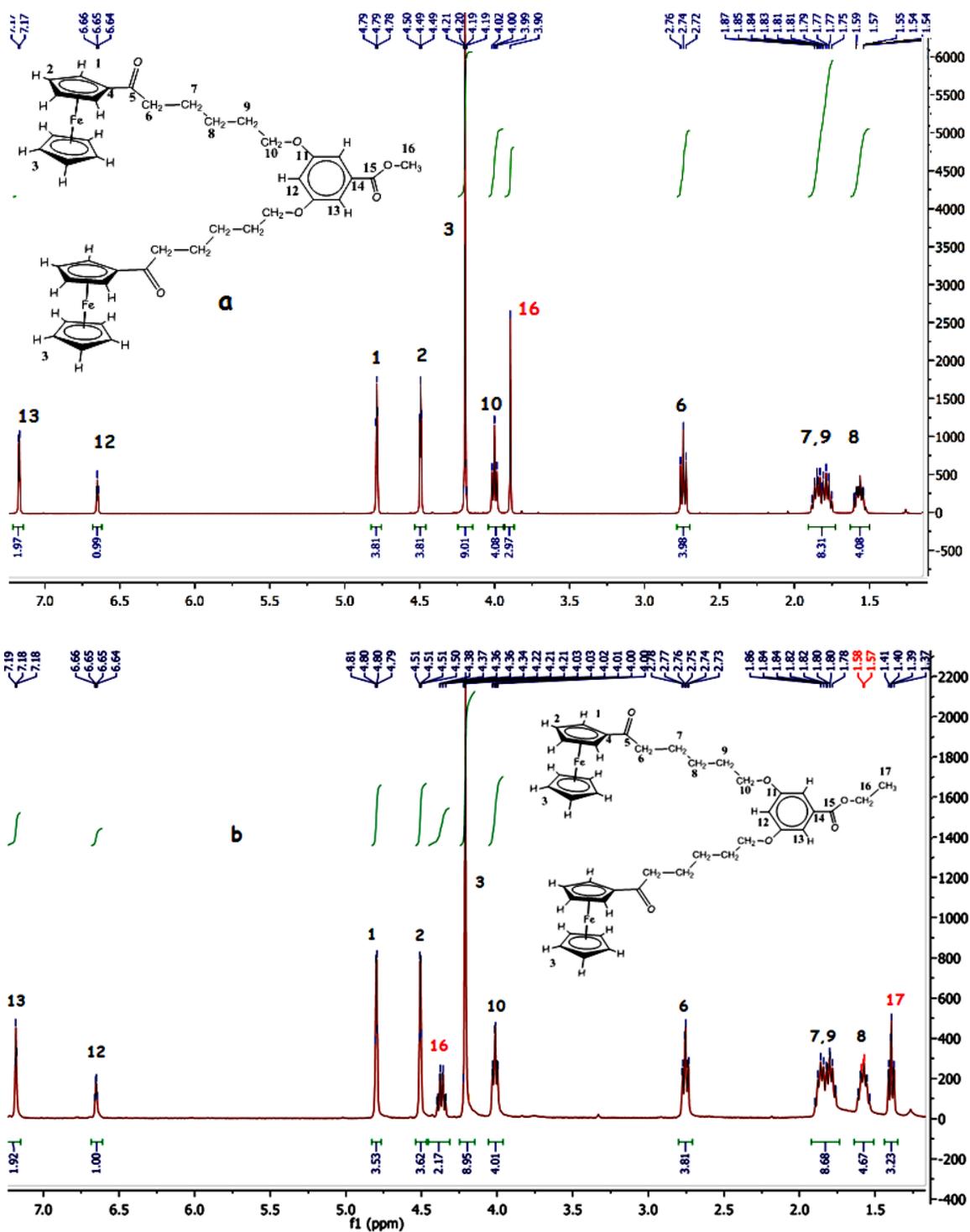


Fig. 30: Espectros 1H RMN del éster de partida $\{3,5-(FcCO(CH_2)_5O)_2-C_6H_3-COOME\}$ **1** (a) y del producto $\{3,5-(FcCO(CH_2)_5O)_2-C_6H_3-COOEt\}$ **3** (b), la numeración encima de las bandas en rojo indica las señales que han cambiado.

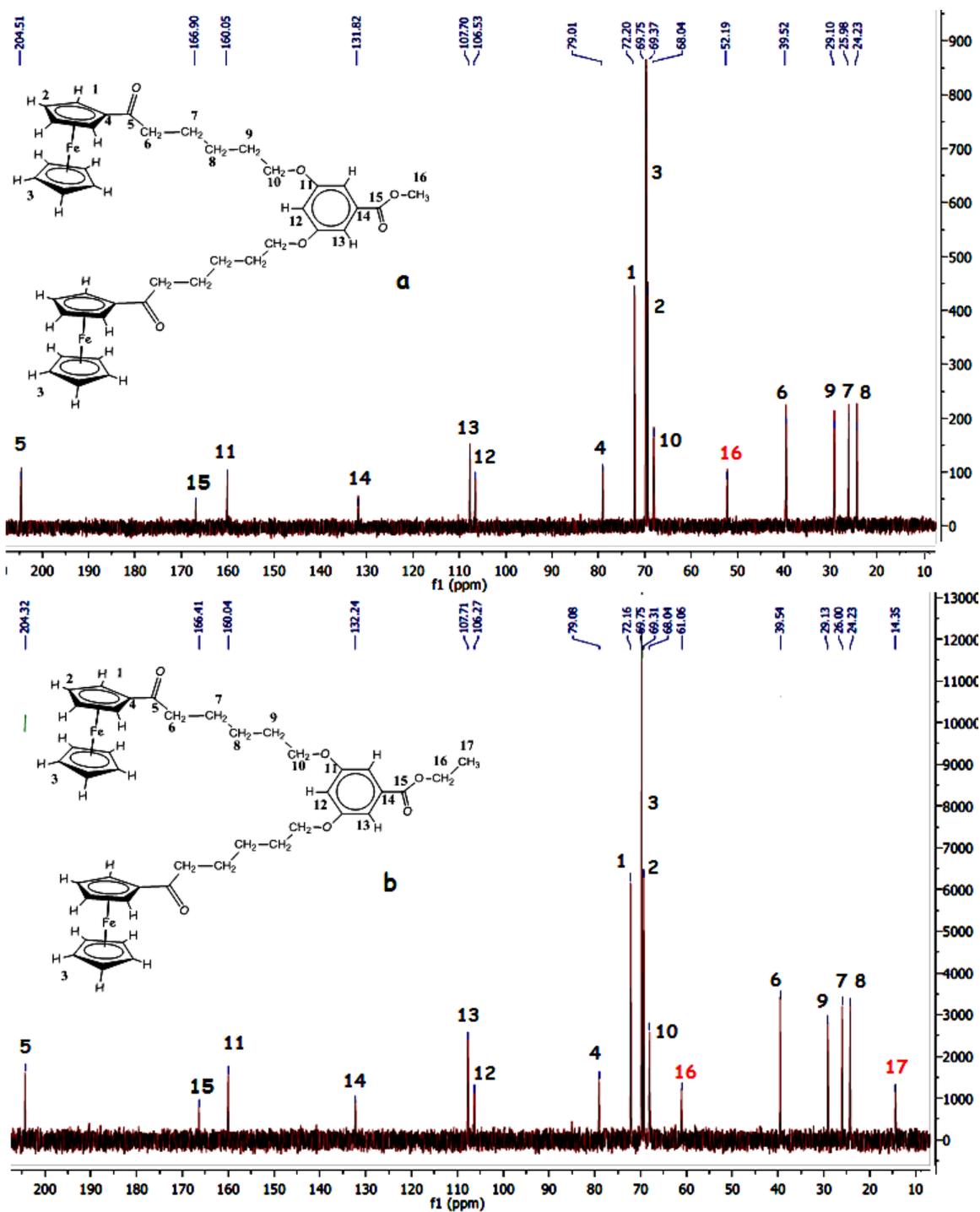


Fig. 31: Espectros ^{13}C RMN del éster de partida $\{3,5\text{-(FcCO(CH}_2\text{)}_5\text{O)}_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-COOMe}\}$ **1** (a) y del producto $\{3,5\text{-(FcCO(CH}_2\text{)}_5\text{O)}_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-COOEt}\}$ **3** (b), la numeración en rojo sobre las bandas indica las señales que han cambiado respecto a las del producto.

Seguidamente, se intentó hidrolizar el éster metílico del compuesto 3,5-FcCO(CH₂)₅O)₂-C₆H₃-COOMe **1** tratándolo inicialmente con hidróxido de litio en una mezcla de tetrahidrofurano y agua seguido de la adición de ácido clorhídrico en agua. Inicialmente, la reacción se llevó a cabo con una proporción 1:1 (3,5-(FcCO(CH₂)₅O)₂-C₆H₃-COOMe: Li₂O) tal y como viene descrito en la bibliografía⁷⁴⁻⁷⁶ (**v en esquema 8**). Sin embargo, no se obtuvo el ácido sino el reactivo de partida por lo que se probó una proporción 1:2 manteniendo el resto de condiciones constantes. De este modo, se obtuvo finalmente el producto deseado, es decir, el ácido {3,5-(FcCO(CH₂)₅O)₂-C₆H₃-COOH} **4**.

Todos los datos espectroscópicos de **4** avalan la estructura propuesta (**véase v en esquema 8**). Del infrarrojo se ha decidido destacar solamente las bandas que aparecen en la **figura 32**, es decir, 1720 cm⁻¹ (**v_{C=O}**; **ácido carboxílico**), 1664 cm⁻¹ (**v_{C=O}**; **cetona**), 1592 cm⁻¹ (**v_{C=C}**; **aromático**) y 1450 cm⁻¹ (**δ_{C-H}**). La banda a 1720 cm⁻¹ debida al grupo carbonilo del ácido es particularmente importante dada la baja intensidad de las señales obtenidas en el espectro de ¹³C RMN del producto (ver más adelante).

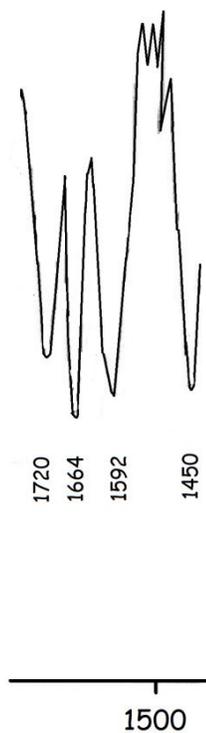


Fig. 32: Bandas características en el espectro IR (KBr) del producto **4**.

De otro lado, comparando el espectro de ^1H RMN del ácido **4** con el del éster de partida **1** (**figura 33**) se observa que en el espectro del ácido falta el pico a 3.90 ppm correspondiente al grupo metoxi del reactivo (16) mientras que las demás señales son coincidentes. De forma paralela, cuando se comparan los espectros de ^{13}C RMN del ácido **4** y del éster de partida **1** (**figura 34**), también se observa que en el espectro del ácido falta la señal a 52.19 ppm correspondiente al grupo metilo del éster de partida C_{16} , mientras que el resto de las señales son coincidentes. Nótese que el espectro de ^{13}C RMN del ácido adolece de algunas las señales de dos carbonos cuaternarios, la correspondiente al pico del carbono del grupo carboxílico C_{15} y la del carbono del anillo unido al grupo carboxílico C_{14} . Aunque se midió el espectro dos veces durante toda la noche, la falta de suficiente cantidad del compuesto **4** impidió obtener señales más intensas. La presencia del grupo carboxílico viene avalada por el espectro de infrarrojo (**figura 32**) debido a la presencia de la banda a 1720 cm^{-1} .

Finalmente, se hicieron pruebas de solubilidad con el producto **4** resultando ser totalmente soluble en agua a pH 13.3, en CH_2Cl_2 , en THF y DMSO y parcialmente soluble en EtOH. Por lo tanto, sirve para marcar ADN (DMSO, THF, CH_2Cl_2), pero no para marcar proteínas sin pérdida de la estructura terciaria a no ser que primero se active el carbonilo con EDC/NHS (a en el Esquema 5) en THF.

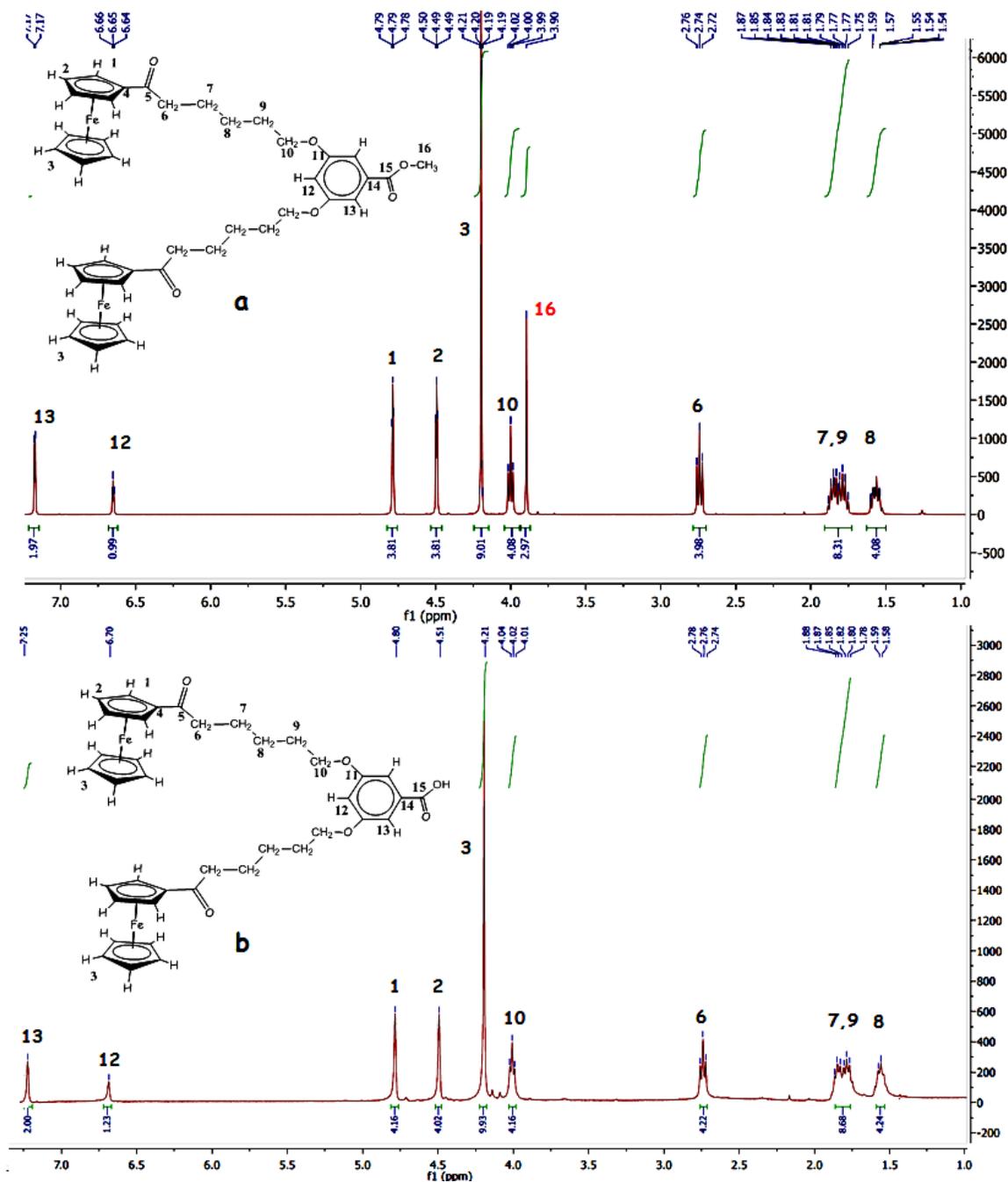


Fig. 33: Espectros 1H RMN del éster de partida $\{3,5-(FcCO(CH_2)_5O)_2-C_6H_3-COOME\}$ **1** (a) y del producto $\{3,5-(FcCO(CH_2)_5O)_2-C_6H_3-COOH\}$ **4** (b), la numeración en rojo indica la señal que desapareció.

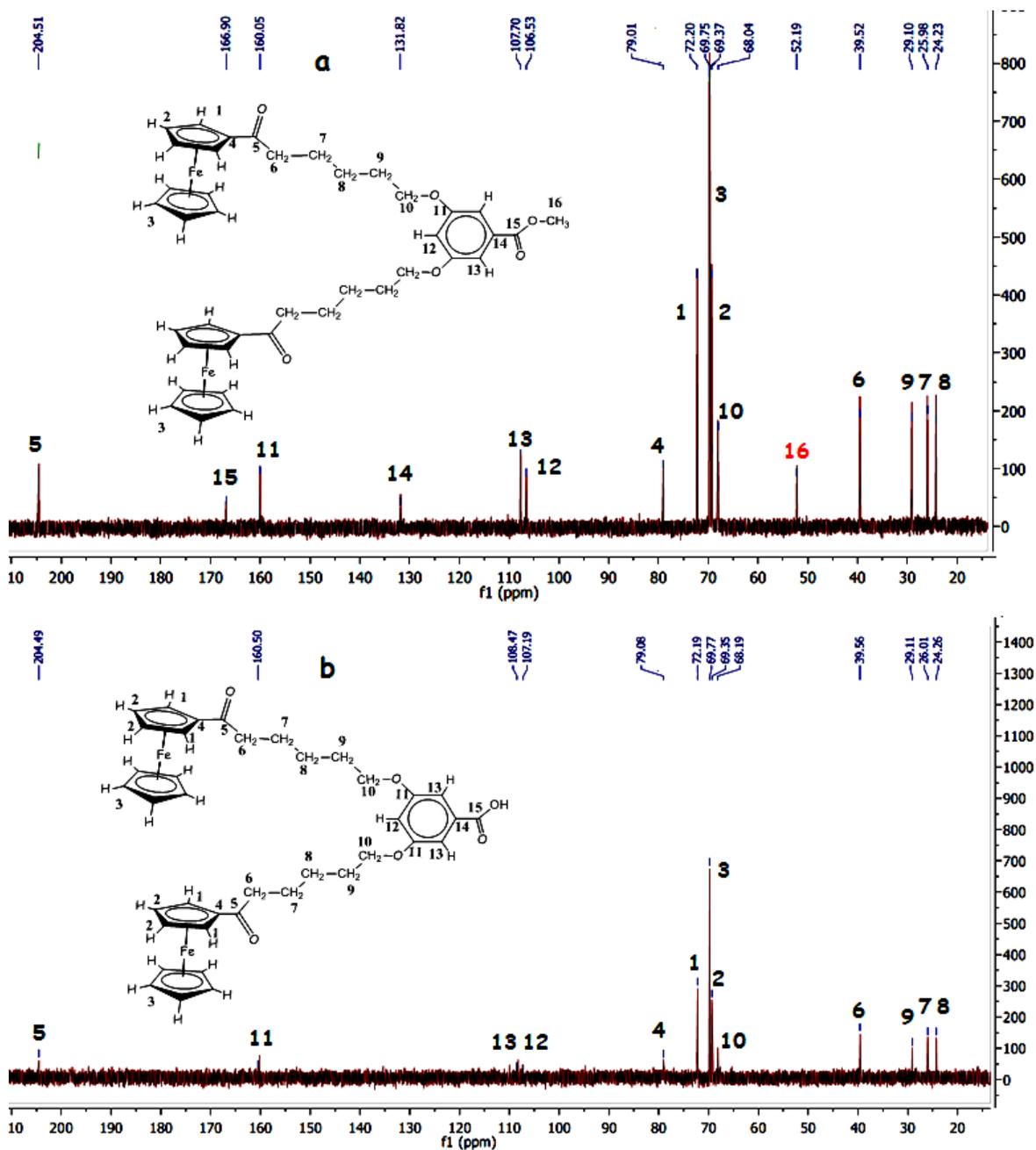


Fig. 34: Espectros ^{13}C RMN del éster de partida {3,5-(FcCO(CH $_2$) $_5$ O) $_2$ -C $_6$ H $_3$ -COOMe} **1** (a) y del producto {3,5-(FcCO(CH $_2$) $_5$ O) $_2$ -C $_6$ H $_3$ -COOH} **4** (b), la numeración en rojo indica la señal que desapareció en el producto.

5.-CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas al término del presente Trabajo Fin de Máster y de acuerdo con los objetivos propuestos han sido las siguientes:

1.

Se ha conseguido sintetizar y caracterizar con éxito un dendrón con dos grupos ferrocenilo y un ácido carboxílico en el punto focal a partir de un compuesto con un único ferrocenilo.

2.

Este dendrón es soluble en medios compatibles con muchas biomoléculas de tal forma que puede unirse a las mismas a través de la química con EDC. Con ello se puede dotar de señal electroquímica a biomoléculas que no son electroactivas o su centro electroactivo no puede ser detectado.

Los próximos pasos a seguir se resumen a continuación en la sección “Futuras Perspectivas”.

6.-FUTURAS PERSPECTIVAS

Este apartado está dedicado a indicar, en orden cronológico, lo que se podría haber hecho con el dendrón $\{3,5-(\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{O})_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-COOH}\}$ **4** si se hubiera dispuesto de tiempo y que, posiblemente, se pueda llevar a cabo en un futuro.

1. Caracterización completa de $\{3,5-(\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{O})_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-COOH}\}$

El compuesto **4** (figura 19) podría ser caracterizado más completamente empleando otras técnicas como pudieran ser Espectrometría de Masas (MS), el Análisis Elemental y la Difracción de Rayos X (DRX) (aparte de mejorar los datos de ^{13}C RMN).

2. Evaluación electroquímica de $3,5-(\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{O})_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-COOH}$

Se estudiaría la amplificación de la señal del ferroceno al pasar del ácido ferrocenocarboxílico (FcCOOH), con una unidad ferroceno (ya usado en nuestro grupo de trabajo), al compuesto $3,5-(\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{O})_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-COOH}$ **4**, con dos unidades de Fc.

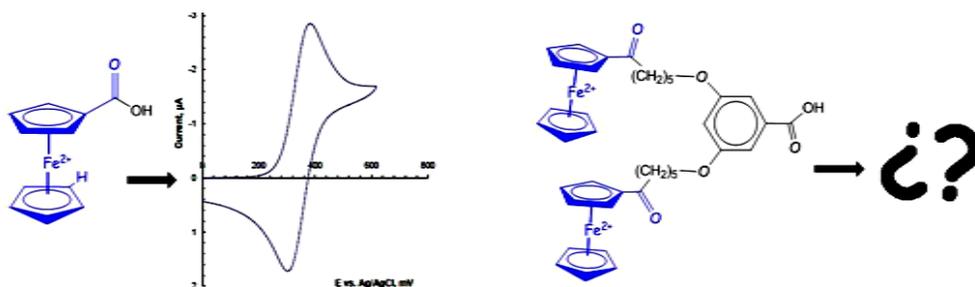


Fig. 35: Voltamperograma cíclico del ácido ferrocenocarboxílico 1 mM a pH 7 sobre electrodo de carbono frente a electrodo de plata. ¿Cómo será el del $3,5-(\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{O})_2\text{-C}_6\text{H}_3\text{-COOH}$?

3. Marcaje de mioglobina con 3,5-(FcCO(CH₂)₅O)₂-C₆H₃-COOH

La mioglobina, proteína biomarcadora del infarto de miocardio, tiene un centro electroactivo de Fe(II). Sin embargo, como ya se explicó en la introducción (sección 1.2, página 7), su difícil acceso a la superficie del electrodo hace que no se pueda detectar electroquímicamente de forma directa necesitando ser marcada con un compuesto electroactivo (actualmente se emplea el FcCOOH).

Por lo tanto, se podría comprobar si el {3,5-(FcCO(CH₂)₅O)₂-C₆H₃-COOH} **4** se une a dicha proteína (**figura 36**) de forma reproducible, estable y en grandes cantidades ya que, si realmente amplifica la señal respecto al FcCOOH, el límite de detección disminuiría considerablemente y el infarto de miocardio se diagnosticaría a niveles de concentración más bajos y, probablemente, en estados más tempranos de la enfermedad.

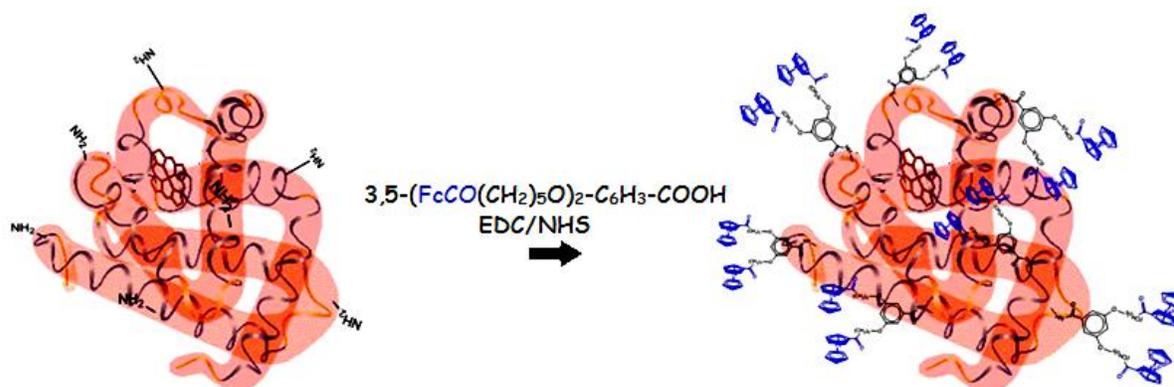
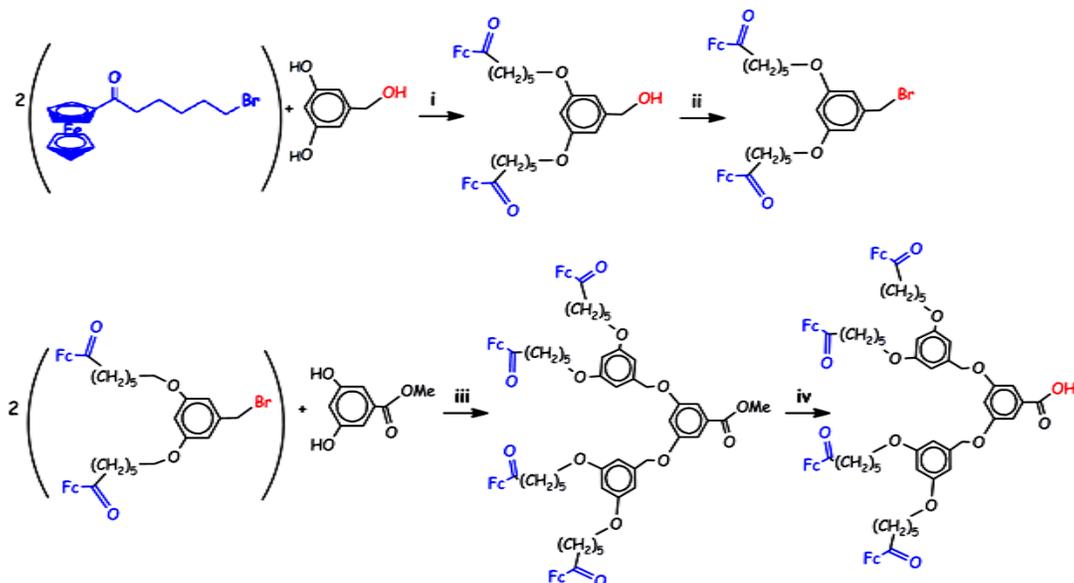


Fig. 36: Marcaje de mioglobina empleando la química de la carbodiimida para unir el 3,5-(FcCO(CH₂)₅O)₂-C₆H₃-COOH a los restos amino (NH₂) de la proteína.

4. Crecimiento del dendrón para obtener otro de segunda generación (G2), tal como se señala en la explicación del esquema adjunto.



Esquema 12: Secuencia de reacciones para llevar a cabo la síntesis convergente tipo Fréchet del dendrón de segunda generación a partir del $\{\text{FcCO}(\text{CH}_2)_5\text{Br}\}$. **i:** Crecimiento convergente por acoplamiento al (3,5-dihidroxifenil)metanol en presencia de éter 18-corona-6 y K_2CO_3 ; **ii:** Bromación del alcohol bencílico con CBr_4 y PPh_3 ; **iii:** Crecimiento convergente por acoplamiento al 3,5-dihidroxibenzoato de metilo en presencia de éter 18-corona-6 y K_2CO_3 ; **iv:** Hidrólisis básica del éster, con Li_2O en $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ y HCl conc. en H_2O , para obtener el ácido de tal forma que se pueda conjugar a las biomoléculas a través de la reacción con carbodiimida.

7.-BIBLIOGRAFÍA

- ¹M. Valcárcel, M. S. Cárdenas. *Automatización y Miniaturización en Química Analítica*. Springer, **2000**.
- ²T. G. Drummond, M. G Hill, J. K Barton. *Nature Biotechnology*, **2003**, 21, 1193-1199
- ³M.N. Velasco-García. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **2009**,20, 27–33
- ⁴A. R. Castro, A. Escarpa, B. Simonet. *Miniaturization of analytical Systems: Principles, Designs and Applications*. J. Wiley & Sons, **2009**, Chap. 1
- ⁵W. R. Vandaveer, S. A. Pasas, R. S. Martin, S. M. Lunte. *Electrophoresis***2002**, 23, 3667–3677
- ⁶N. Shimizu, K. Sugimoto, J. Tang, T. Nishi, I. Sato, M. Hiramoto; S. Aizawa, M. Hatakeyama, R. Ohba, H. Hatori, T. Yoshikawa, F. Suzuki, A. Oomori, H. Tanaka, H. Kawaguchi, H. Watanabe, H. Handa. *Nature Biotechnology*, **2000**,18, 877-881
- ⁷H. Bi, S. Meng, Y. Li, K. Guo, Y. Chen, J. Kong, P. Yang, W. Zhong, B. Liu. *Lab on a Chip*, **2006**, 6, 769-775
- ⁸Q. Wu, W. Ma, L. Zhu, Q. Guo, B. Zhang, S.M. Kulageri, W. Zheng. *Journal of Biomedical Materials Research, Applied Biomaterials*, **2008**, 87B.1, 67-72
- ⁹B.E. Slentz, N.A. Penner, F.E. Regnier. *Journal of Chromatography*, **2002**, 948, 225-233
- ¹⁰T. Nakagawa, T. Tanaka, D. Niwa, T. Osaka, H. Takeyama, T. Matsunaga. *Journal of Biotechnology*, **2005**, 116, 105-111
- ¹¹E.Milkani, S.Morais, C. R. Lambert, W. G.McGimpsey. *Biosensors and Bioelectronics*, **2010**,25, 1217–1220
- ¹²E.Milkani, A. M. Khaing, S. Morais, C. R. Lambert, W. G.McGimpsey. *Analytical Methods*, **2011**, 3, 122
- ¹³K.Doré, S.Dubus, H-A. Ho, I.Le´vesque,M. Brunette, G.Corbail, M.Boissinot, G.Boivin, M. G. Bergeron,D. Boudreau, M. Leclerc. *Journal of American Chemistry Society*, **2004**, 126, 4240-4244
- ¹⁴R. Wang, Y. Wang, K. Lassiter, Y. Li, B. Hargis, S. Tung, L.Berghman, W.Bottje. *Talanta*, **2009**,79, 159–164
- ¹⁵Y. Uludag, I.E. Tohill. *Talanta*, **2010**, 82, 277–282
- ¹⁶J. Wang. *AnalyticaChimica Acta*, **2003**,500,247–257
- ¹⁷Y-L. Zhang, P-F. Pang,J-H.Jiang, G-L.Shen, R-Q.Yu. *Electroanalysis***2009**, 21, 1327 – 1333
- ¹⁸W. M. Hassen, V. Duplan, E. Frost, J. J. Dubowski. *Electrochimica Acta*. **2011**, 56, 8325-8328
- ¹⁹S.D. Keighley, P. Estrela, P. Li, P. Migliorato. *Biosensors and Bioelectronics*,**2008**, 24, 906–911
- ²⁰J. Qiao, L. Qui, X. Mu, Y. Chen. *Analyst*, **2011**, 136, 2077
- ²¹W. R. Vandaveer, S. A. Pasas, R. S. Martin, S. M. Lunte . *Electrophoresis*, **2002**, 23, 3667-3677
- ²²Y. Shang, P.R. Singh, M. M. Chisti, R. Mernaugh, X. Zeng. *Analytical Chemistry*, **2011**, 83, 8928–8936
- ²³E. V. Suprun,A. L. Shilovskaya, A. V. Lisitsa, T. V. Bulko, V. V. Shumyantseva, A. I. Archakov. *Electroanalysis*,**2011**, 23, 1051 – 1057
- ²⁴S.Martic, M.Labib, D. Freeman, H-B.Kraatz. *Chemistry an European Journal*. **2011**, 17, 6744 – 6752
- ²⁵S. Martic, M. Labib, H-B.Kraatz. *Talanta*, **2011**, 85, 2430– 2436
- ²⁶E. G. Hvastkovs and Daniel A. Buttry . *Analyst*,**2010**, 135, 1817–1829
- ²⁷G. T. Hermanson. *BioconjugateTechniques* (2 Ed.), **2008**, Caps. 1 y 2
- ²⁸K. E. Sapsford, K. M. Tyner, B. J. Dair, J. R. Deschamps, I. L. Medintz. *Analytical Chemistry*,**2011**, 83, 4453–4488.
- ²⁹M-E Aubin-Tam, K. Hamad-Schifferli, *Biomedical Materials*.**2008**, 3 (3) 03400
- ³⁰F. Azek, C. Grosslord, M. Joannes, B. Limoges, P. Brossier. *Analytical. Biochemistry*, **2000**, 284, 107-113
- ³¹F. Patolsky, Y. Weizmann, I. J. Willner, *Journal of the American Chemical Society*, **2002**, 124, 770-772
- ³²P. Fanjul, D. Hernández, M. B. González, A. Costa. *Anaytical Chemistry*, **2007**, 79, 5272-5277
- ³³V. Escamilla, D. Hernández, M. B. González, J. M. Pingarrón, A. Costa. *Biosensors and Bioelectronics*,**2009**, 24, 2678-83
- ³⁴G. Martínez, M. B.González, A. Costa. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2010**, 149, 329-335
- ³⁵C. A.S. Andrade. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***2011**, 88, 100– 107
- ³⁶D. Dorokhin, N.Tomczak, M. Han,D. N. Reinhoudt, A. H. Velders, G. J.Vancso. *American Chemistry Society*.**2009**, 661-667
- ³⁷S. Impellizzeri, S. Monaco, I. Yildiz, M. Amelia, A. Credi, F. M. Raymo. *Journal of Physical Chemistry C*, **2010**, 114,7007–7013
- ³⁸D. Dorokhin, N. Tomczak, A. H. Velders, D. N. Reinhoudt,G. J.Vancso. *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, 113,18676–18680
- ³⁹D. Ge, R.Levicky. *Chemical Communications*, **2010**, 46, 7190–7192
- ⁴⁰S.Martíc, M.Labib, P. O. Shipman, H-B.Kraatz *Dalton Transactions*, **2011**, 40, 7264–7290
- ⁴¹A. Anne, J.Moiroux. *Macromolecules*,**1999**, 32, 5829-5835
- ⁴²S. Zhang, F. Zheng, Z. Wu, G. Shen, R. Yu. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24,129–135
- ⁴³F. Xuan. *Biosensors and Bioelectronics*,**2012**, 35, 230– 234
- ⁴⁴F. Patolsky, Y. Weizmann, I.Willner. *Journal of American Chemistry Society*.**2002**,124, 5, 2002
- ⁴⁵J. Wang, R. Polsky, A. Merkoci, K. L. Turner. *Langmuir*, **2003**, 19, 989-991
- ⁴⁶F. Le Floch, H. A. Ho, M. Leclerc. *Analytical Chemistry*,**2006**, 78, 4727–4731
- ⁴⁷F. Xiao, X. Sun, X. Wu, J. Zhao, Y. Luo. *Journal of Organometallic Chemistry*, **2012**, 713,96-103
- ⁴⁸J. Liu, S.Tian, L. Tiefenauer, P. E. Nielsen, W. Knoll. *Analytical Chemistry*, **2005**, 77, 9, 2756-2761

- ⁴⁹ S. Wang, P. Su, E. Hongjun, Y. Yang. *Analytical Biochemistry*, **2010**, 405, 230–235
- ⁵⁰ O. Flomenbom, R. J. Amir, D. Shabat, J. Klafter. *Journal of Luminescence*, **2005**, 111, 315–325
- ⁵¹ S. C. Zimmerman, L. J. Lawless. *Topics in Current Chemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Vol. 217, 96-120
- ⁵² M. V. Walter, M. Malkoch. *Chemical Society Reviews*, **2012**, 41, 4593–4609
- ⁵³ D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith. *Polymer Journal*, **1985**, 17, 117–132
- ⁵⁴ G. R. Newkome, Z. Q. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta. *Journal of Organic Chemistry*, **1985**, 50, 2003–2004.
- ⁵⁵ C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *Journal of the American Chemical Society*, **1990**, 112, 7638–7647.
- ⁵⁶ K. L. Woollorley, C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet. *Angewandte Chemie International Edition*, **1994**, 33, 82–85
- ⁵⁷ K. L. Wooley, C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet. *Journal of the American Chemical Society*, **1991**, 113, 4252–4261
- ⁵⁸ T. Kawaguchi, K. L. Walker, C. L. Wilkins, J. S. Moore. *Journal of the American Chemical Society*, **1995**, 117, 2159–2165
- ⁵⁹ H. Arima, K. Motoyama, T. Higashi. *Pharmaceutics* **2012**, 4
- ⁶⁰ J. Das, K. Jo, J. W. Lee, H. Yang. *Analytical Chemistry*. **2007**, 79, 2790-2796
- ⁶¹ H. C. Yoon, H-S. Kim. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **2004**, 9, 107-111
- ⁶² E. Kim, K. Kim, H. Yang, Y. T. Kim, J. Kwak. *Analytical Chemistry*, **2003**, 75, 5665-5672
- ⁶³ H. C. Yoon, M-Y. Hong, H-S. Kim. *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 4420-4427
- ⁶⁴ G. W. Anderson, F. M. Callahan. *Journal of the American Chemical Society*, **1960**, 82, 3359
- ⁶⁵ L. Péliniski, D. Razafimahefa, M-T. Martin, D. Ramanitrahambola, P. Rasoanaivo, J. S. Brocard. *Bioorganic and Medicinal Chemical Letters*, **2005**, 15, 1239-1241
- ⁶⁶ G. Li, Z. Wang, R. Lu and Z. Tang. *Tetrahedron Letters*, **2011**, 52, 3097-3101
- ⁶⁷ L. Torun, T. W. Robison, J. Krzykowski, D. W. Purkiss, R. A. Bartsch. *Tetrahedron*, **2005**, 6, 8345-8350
- ⁶⁸ M. A. Azagarsamy, K. Krishnamoorthy, K. Sivanandan, S. Thayumanavan. *Journal of the American Chemical Society*, **2009**, 74, 9475-9485
- ⁶⁹ Z. Cheng, B. Ren, D. Zhao, X. Liu, Z. Tong. *Macromolecules*, **2009**, 42, 2762-2766
- ⁷⁰ S. P. McManus, R. M. Karaman, R. Sedaghat-Herati, J. M. Harris. *Journal of Organic Chemistry*, **1995**, 60, 4764-4766
- ⁷¹ P. D. Bartlett, L. J. Rosen. *Journal of the American Chemical Society*, **1942**, 64, 543-6.
- ⁷² K. Peter, C. Vollhart, N. E. Schore. *Química Orgánica*, **3^a Ed.**, Cap. 9
- ⁷³ Z. Cheng, B. Ren, D. Zhao, X. Liu, Z. Tong. *Macromolecules*, **2009**, 42, 2762-2766
- ⁷⁴ P. Camps, M. Font-Bardia, S. Giménez, F. Pérez, X. Solans, N. Soldevilla. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 3123–3138
- ⁷⁵ J. Pandey, N. Dwivedi, N. Singh, A. K. Srivastava, A. Tamarkar, R. P. Tripathi. *Bioorganic and Medicinal Chemical Letters*, **2007**, 17, 1321–1325
- ⁷⁶ J. Pandey, A. Sharma, V. K. Tiwari, D. Dube, R. Ramachandran, V. Chaturvedi, S. K. Sinha, N. N. Mishra, P. K. Shukla, R. P. Tripathi. *Journal of Combinatorial Chemistry*, **2009**, 11, 422–427