TESIS CON CARÁCTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: MARÍA TERESA MÉNDEZ BAUTISTA

TITULO: <u>"SÍNTESIS DE OLIGÓMEROS DEL TIPO FENILENETINILENO</u> <u>FUNCIONALIZADOS CON 4-AMINOFENIL-α-D-MANOPIRANÓSIDA PARA</u> <u>EL RECONOCIMIENTO BIOMOLECULAR DE LA BACTERIA</u> <u>Escherichia coli"</u>

ASESORES: Dra. Ivana Moggio

Dr. Jorge Romero García

FIRMA:	Wone Moji
FIRMA:	Romero

El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular de Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coah., a 27 de junio de 2006



Sello de la Institución

Dr. Juan Mendez Nonell Firma del Director General del CIOA



Centro de Investigación en Química Aplicada

TESIS

Síntesis de oligómeros del tipo fenilenetinileno funcionalizados con 4-aminofenil-α-D-manopiranósida para el reconocimiento biomolecular de la bacteria *Escherichia coli*

Presentada por:

María Teresa Méndez Bautista

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros



Asesores:

1 4 JUL 2008

RECIBIDO

Dra. Ivana Moggio

Dr. Jorge Romero García

Saltillo, Coahuila

Junio del 2006

CENTRO DE INVESTIGACION EN QUIMICA APLICADA

Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

"SÍNTESIS DE OLIGÓMEROS DEL TIPO FENILENETINILENO FUNCIONALIZADOS CON 4-AMINOFENIL-α-D-MANOPIRANÓSIDA PARA EL RECONOCIMIENTO BIOMOLECULAR DE LA BACTERIA *Escherichia coli*"

Presentada por:

MARÍA TERESA MÉNDEZ BAUTISTA

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

Asesorada por:

DRA. IVANA MOGGIO DR. JORGE ROMERO GARCÍA

INODALES taton os lo

M.C. Antonio Serguei Ledezma Pérez Presidente

Dr. Dámaso Navarro Rodríguez Secretario

Dra. Rosa Angeles Vázquez García Vocal

Saltillo, Coahuila

Junio de 2006

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental y de Resultados de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis y que dicha información pertenece al Centro de investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coah., a 27 de Junio de 2006

Imp.

MARÍA TERESA MÉNDEZ BAUTISTA

Nombre y firma del sustentante

En este espacio quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que participaron en mi formación como estudiante así como en el desarrollo de la parte experimental de este trabajo. De manera particular quiero agradecer:

A los doctores Ivana Moggio, Jorge Romero García y Eduardo Arias Marín por la oportunidad de participar en su equipo de trabajo, compartiendo a la vez sus conocimientos conmigo y brindándome asesoría para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Rosa Ángeles Vázquez García, Dr. Dámaso Rodríguez y al M. C. Antonio Ledezma Pérez por las recomendaciones realizadas con el fin de mejorar este trabajo.

A la L.C.Q. Gabriela Padrón Gamboa por el apoyo técnico otorgado en la manipulación de material biológico.

A la L.C.Q. Diana Iris Medellín Banda por el apoyo técnico dado en la síntesis de compuestos químicos.

A la Bióloga Marcela Hernández por la asesoría proporcionada en la preparación de soluciones para el teñido de bacterias.

A Gris, Fátima, Erika y Gaby por orientarme y compartir conmigo las experiencias adquiridas durante su trabajo en el laboratorio, pero principalmente por su amistad.

A Gustavo de Luna por la actitud desinteresada con que ayuda a las personas y por su gran amistad.

A mis compañeros del departamento de Materiales Avanzados por hacer agradable mi estancia durante el desarrollo de la tesis.

A Isabel, Lorena, Gilberto, Erick, Moisés, Javier, Carlos, Arcadio y Octavio por su compañerismo.

A los doctores Francisco Patiño Cardona y Eleazar Salinas Rodríguez por el apoyo que siempre me han brindado y que ha hecho posible la realización de este proyecto personal.

Al Laboratorio de Análisis Clínicos Especializados de Saltillo, S. A. de C. V. por proporcionarnos las cepas de *Escherichia coli* de tipo uropatógeno.

Al Centro de Investigación en Química Aplicada por la oportunidad de prepararme en sus aulas y de realizar este trabajo de investigación en sus instalaciones. Así mismo por el apoyo proporcionado a través del proyecto interno F70623.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero concedido a través de la beca No. 184912 y del proyecto SEP-CONACYT No. 43166-R.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por las facilidades otorgadas para realizar los estudios de maestría desde la etapa inicial de selección hasta la presentación del examen para obtener el grado.

Página

Índi	ce ger	eral		i
Índi	ce de	figura	5	v
Índi	ce de	tablas		ix
Res	umen			x
1.	Intro	oducci	ón	1
2.	Antecedentes			4
	2.1	Los o	carbohidratos como moléculas de reconocimiento de bacterias	4
	2.2	Inter	acciones bacteria-carbohidrato	5
	2.3	Los	polímeros y oligómeros conjugados	9
	2.4	Olig	ómeros del tipo fenilenetinileno	10
	2.5	Reac	ción de acoplamiento de Sonogashira-Heck	11
	2.6	Estad	lo del arte	16
3.	Hipó	tesis		19
4.	Objetivos		19	
5.	Justi	ficaci	ón	20
6.	Desa	rrollo	experimental	22
	6.1	Mate	rial y equipo	22
	6.2	Read	tivos y solventes	24
	6.3	Sínte	esis de monómeros	26
	6	.3.1	Síntesis de 1,4-Bis(dodecanoxi)benceno (2)	26
	6	.3.2	Síntesis de 1-Bromo-2,5-bis(dodecanoxi)benceno (3)	27

6.3.3	Síntesis de 1-Bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4-yodobenceno (4)	28
6.3.4	Síntesis de 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno (5)	29
6.3.5	Síntesis de 4-Yodobenzoato de bencilo (7)	30
6.3.6	Procedimiento general para el acoplamiento de Sonogashira-	
	Heck	30
6.3.7	Síntesis de 4-[(trimetilsilil)etinilen] benzoato de bencilo (8)	31
6.3.8	Síntesis de 4-Etinilbenzoato de bencilo (9)	32
6.3.9	Síntesis de 1-yodo-4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno (11)	32
6.3.10	Síntesis de 4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-trimetilsililetinilen-	
	benceno (12)	33
6.3.11	Síntesis de 1-Etinilen-4-[2(-2- metoxi-etoxi)-etoxi] benceno	
	(13)	34
6.4 Sínte	esis de oligómeros	34
6.4.1	Síntesis del trímero fenilenetinileno con terminaciones bencil	
	éster (oFE3Bz2)	34
6.4.2	Procedimiento general para la desprotección de grupos	
	carboxilo	35
6.4.3	Síntesis del trímero fenilenetinileno con terminaciones	
	carboxilo (oFE3COOH2)	36
6.4.4	Síntesis del difenil(2,3-dihidro-2-tioxo-3-	
	benzoxazolil)fosfonato (17)	37
6.4.5	Síntesis del trímero fenilenetinileno con terminaciones	
	manosa (oFE3Man2)	38
6.4.6	Síntesis de 4[4-bromo-2,5-bis-(dodecanoxi)fenilenetinilen]	
	benzoato de bencilo (14)	39
6.4.7	Síntesis del trímero fenilenetinileno con terminaciones glicol	
	bencil éster (oFE3GBz)	40
6.4.8	Síntesis del trímero fenilenetinileno con terminaciones glicol	
	carboxilo (oFE3GCOOH)	41
6.4.9	Síntesis del trímero fenilenetinileno con terminaciones glicol	

1

ii

		manosa (oFE3GMan)	42
6.5	Pru	ebas preeliminares de reconocimiento bacteriano	43
6	5.5.1	Condiciones de cultivo	43
6	5.5.2	Reconocimiento bacteriano mediante el uso de los oligómeros	
		oFE3GMan y oFE3Man2	44
Resu	ıltado	os y Discusiones	45
7.1	Sínt	tesis de monómeros	45
7	.1.1	Rutas de síntesis	45
7	.1.2	Mecanismos de reacción	47
		7.1.2.1 Síntesis de Williamson	47
		7.1.2.2 Sustitución electrofilica aromática	48
		7.1.2.3 Esterificación de Steglich	49
		7.1.2.4 Reacción general de acoplamiento de Sonogashira-	
		Heck	51
		7.1.2.5 Desprotección del grupo trimetilsililacetileno	51
7	.1.3	Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear	52
		7.1.3.1 Resonancia Magnética Nuclear ¹ H	53
		7.1.3.2 Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ C	60
7.2	Sín	tesis de oligómeros	66
7	7.2.1	Rutas de síntesis	68
7	7.2.2	Mecanismos de reacción	71
		7.2.2.1 Acoplamiento Sonogashira-Heck	71
		7.2.2.2 Desprotección de grupos carboxilo	71
		7.2.2.3 Síntesis del agente activante de grupos carboxílicos	72
		7.2.2.4 Reacción de amidación	72
7	7.2.3	Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear	74
		7.2.3.1 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de	
		¹ H	74

7.

		7.2.3.2 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de	
		¹³ C	81
	7.2.4	Caracterización por Ultravioleta-Visible y fluorescencia	88
	7.3 Pru	ebas preeliminares de reconocimiento bacteriano	91
	7.3.1	Reconocimiento de E. coli mediante el uso de los oligómeros	
		oFE3GMan y oFE3Man2	91
		7.3.1.1 Caracterización por microscopía óptica	91
		7.3.1.2 Caracterización por microscopía de láser confocal	95
		7.3.1.3 Espectroscopía de Uv-vis y fluorescencia	96
8.	Conclusio	ones	98
9.	Trabajo a	a futuro	100
	Apéndice	: Tinción de Gram	101
	Referenc	ias	103

Figura	Nombre	Página
2.1	Estructuras químicas de algunos sacáridos que participan en procesos de adhesión celular	4
2.2	Esquema de una membrana celular en la cual se encuentran adheridas células de tipo microbiano, mediante interacciones proteína-carbohidrato. Los sitios de reconocimiento están representados por figuras geométricas	5
2.3	Imagen de una Escherichia coli en la que se observa la presencia de fimbrias tipo 1 (TEM)	6
2.4	Imagen de una fimbria tipo 1. La adhesina FimH se encuentra señalada por la flecha	7
2.5	Dominio receptor de la adhesina FimH, en donde se puede apreciar la cavidad receptora de la manosa amplificada. La parte hidrófoba se encuentra señalada por los residuos de aminoácidos que la integran. La región azul corresponde a los residuos de aminoácidos con carga positiva y la región roja a los residuos con carga negativa	8
2.6	Estructuras químicas de algunos polímeros conjugados	9
2.7	Mecanismo de reacción propuesto por Sonogashira-Heck para el acoplamiento de acetilenos terminales y halogenuros de arilo	12
2.8	Mecanismo de reacción propuesto por Amatore para el acoplamiento de acetilenos terminales y halogenuros de arilo	13
2.9	Especies aniónicas producidas en la primera etapa del mecanismo de reacción propuesto por Amatore	14
2.10	Adición oxidativa en la segunda etapa descrita por Amatore	14
2.11	Poli(diacetileno) funcionalizado con ácido siálico para la identificación del virus de la influenza	17
2.12	Politiofenos portadores de manosa (a) y de ácido siálico (b)	17
2.13	Polímero de tipo fenilenetinileno funcionalizado con el monosacárido manosa para la detección de la bacteria <i>E. coli</i>	18
7.1	Ruta de síntesis de los monómeros 1-Bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4-yodobenceno 4 y 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno 5. a C ₁₂ H ₂₅ Br/NaOH/DMF, 120-130 °C, 16 h. b CCl ₄ , Br ₂ , reflujo, 14 h. c (i) CH ₃ COOH/H ₂ O/H ₂ SO ₄ , KIO ₃ , I ₂ , reflujo, 24 h	45

7.2	Ruta de síntesis del monómero 4-etinilbenzoato de bencilo 9. ^{<i>a</i>} CH ₂ Cl ₂ , DMAP, C ₆ H ₅ CH ₂ OH, DCC/DMF, 0 °C, 16 h. ^{<i>b</i>} TEA/THF, diclorobis(trifenil)fosfina paladio II, CuI, (CH ₃) ₃ SiCCH, temperatura ambiente, 18 h, N ₂ . ^{<i>c</i>} THF/H ₂ O/FTBA	46
7.3	Ruta de síntesis del monómero 1-etinilen-4-[2(-2- metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13. ^{<i>a</i>} CH ₃ (O(CH ₂) ₂) ₂ Br/NaOH/DMF, 120-130 °C, 16 h. ^{<i>b</i>} TEA/THF, diclorobis(trifenil)fosfina paladio II, CuI, (CH ₃) ₃ SiCCH, temperatura ambiente, 18 h, N ₂ . ^{<i>c</i>} THF/H ₂ O/FTBA	47
7.4	Mecanismo de reacción involucrado en la alquilación de Williamson	48
7.5	Mecanismo de reacción para la formación de 1-bromo-2,5- bis(dodecanoxi)benceno 3	48
7.6	Mecanismo de reacción involucrado en la formación del 1-bromo-2,5- bis(dodecanoxi)-4-yodobenceno 4	49
7.7	Mecanismo de reacción para obtener el 4-yodobenzoato de bencilo 7	50
7.8	Mecanismo de reacción que se lleva a cabo durante la desprotección de grupos acetilenos. ^a Bu_4NF/THF . ^b H_2O	52
7.9	Espectros de RMN ¹ H de la hidroquinona 1, 1,4-bis(dodecanoxi)benceno 2, 1- bromo-2,5-bis(dodecanoxi)benceno 3, 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4- yodobenceno 4 y del 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno 5 en CDCl ₃	55
7.10	Espectros de RMN ¹ H correspondientes al ácido 4-yodobenzoico 6, 4- yodobenzoato de bencilo 7, 4-[(trimetilsilil)etinilen]benzoato de bencilo 8 y 4- etinilbenzoato de bencilo 9	57
7.11	Espectros de RMN ¹ H correspondientes al 4-yodofenol 10, 1-yodo-4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 11, 4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]- trimetilsililetinilenbenceno 12, y 1-Etinilen-4-[2(-2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13. Figura insertada: Región amplificada del espectro de RMN ¹ H del 4- yodofenol 10. La banda ancha con δ 5.36 ppm corresponde al protón del grupo hidroxilo	59
7.12	Espectros de RMN ¹³ C de la hidroquinona 1, 1,4-bis(dodecanoxi)benceno 2, 1- bromo-2,5-bis(dodecanoxi)benceno 3, 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4- yodobenceno 4 y del 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno 5	62
7.13	Espectros de RMN ¹³ C correspondientes al ácido 4-yodobenzoico 6, 4- yodobenzoato de bencilo 7, 4-[(trimetilsilil)etinilen]benzoato de bencilo 8 y 4- etinilbenzoato de bencilo 9	
7.14	Espectros de RMN ¹³ C correspondientes al 4-yodofenol 10, 1-yodo-4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 11, 4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]- trimetilsililetinilenbenceno 12, y 1-etinilen-4-[2(-2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13	64 66

7.15	Ruta de síntesis de los trímeros oFE3Bz2, oFE3COOH2 y de oFE3Man2. ^{<i>a</i>} TEA/THF, diclorobis(trifenil)fosfina paladio II, CuI, 60-70 °C, 16 h. ^{<i>b</i>} (i) Tolueno, KOH, reflujo, 90 min. N ₂ . (ii) H ₂ O/HCl. (pH 1). ^{<i>c</i>} Difenil (2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil) fosfonato, 1-metil-2- pirrolidinona, TEA, 4-aminofenil α -D-manopiranósida	69
7.16	Ruta de síntesis del 4[4-bromo-2,5-bis-(dodecanoxi)fenilentinilen] benzoato de bencilo 14 y de los oligómeros oFE3GBz, oFE3GCOOH y oFE3GMan. ^{<i>a</i>} TEA, diclorobis(trifenil)fosfina paladio II, CuI, 60-70 °C, 16 h. ^{<i>b</i>} (i) Tolueno, KOH, reflujo, 90 min. N ₂ . (ii) H ₂ O/HCl. (pH 1). ^{<i>c</i>} Difenil (2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil) fosfonato, 1-metil-2- pirrolidinona, TEA, 4-aminofenil α -D-manopiranósida	70
7.17	Ruta de síntesis del agente activante de ácidos carboxílicos: difenil (2,3-dihidro- 2-tioxo-3-benzoxazolil) fosfonato, 1-metil-2- pirrolidinona. ^{<i>a</i>} TEA/Benceno seco, N_2	70
7.18	Mecanismo de reacción para la desprotección de funciones carboxílicas en medio alcalino	71
7.19	Mecanismo de reacción para obtener el difenil(2,3-dihidro-2-tioxo-3- benzoxazolil)fosfonato 17	72
7.20	Mecanismo de reacción para la funcionalización de compuestos carboxílicos con aminas	73
7.21	Espectros de RMN ¹ H correspondientes a los trímeros con terminaciones bencil éster (oFE3Bz2), carboxilo (oFE3COOH2) y manosa (oFE3Man2)	77
7.22	Espectros de RMN ¹ H correspondientes al 4[4-bromo-2,5-bis- (dodecanoxi)fenilenetinilen] benzoato de bencilo 14 y a los trímeros con terminaciones glicol bencil éster (oFE3GBz), glicol carboxilo (oFE3GCOOH) y glicol manosa (oFE3GMan)	79
7.23	Espectros de RMN ¹ H correspondientes al mercaptobenzoxazol 16 y al difenil(2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil)fosfonato 17	80
7.24	Espectros de RMN ¹³ C correspondientes a los trímeros con terminaciones bencil éster (oFE3Bz2), carboxilo (oFE3COOH2) y manosa (oFE3Man2)	83
7.25	Espectros de RMN ¹³ C correspondientes al 4[4-bromo-2,5-bis- (dodecanoxi)fenilenetinilen] benzoato de bencilo 14 y a los trímeros con terminaciones glicol bencil éster (oFE3GBz), glicol carboxilo (oFE3GCOOH) y glicol manosa (oFE3GMan)	86
7.26	Espectros de RMN ¹³ C correspondientes al mercaptobenzoxazol 16 y al difenil(2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil)fosfonato 17	88
7.27	Espectros de absorción UV-vis y de emisión del compuesto oFE3Man2 en DMF	89

- 7.28 Imágenes obtenidas de un frotis para verificar la dispersión de la bacteria en solución, previo al inicio de la pruebas de reconocimiento bacteriano. a) Imagen del frotis tal y como se observa en el microscopio óptico 1000X. b) La imagen modificada empleando el programa de edición de fotos PhotoImpression. c) Imágenes de las bacterias de *E. coli* señaladas con un círculo punteado de color blanco en las figuras anteriores
- 7.29 Imágenes de un aglomerado formado durante la interacción entre el trímero oFE3Man2 y la bacteria *E. coli.* a) Imagen del aglomerado tal y como se obtuvo con el microscopio óptico 400X. b) Imagen modificada del aglomerado empleando el programa de edición de fotos PhotoImpression
- 7.30 a) Imágenes de aglomerados formados durante la interacción entre los trímeros oFE3GMan y oFE3Man2 con la bacteria *E. coli*. En donde pueden notarse las diferencias de tamaños existentes entre los aglomerados que forma cada compuesto. Imágenes obtenidas por microscopía óptica 1000X. Mecanismo propuesto para la interacción entre la adhesina FimH de la bacteria *E. coli* con los oligómeros: b) oFE3GMan y c) oFE3Man2
- 7.31 Imágenes de los aglomerados formados durante la interacción entre los trímeros oFE3Man2 (a) y oFE3GMan (b) con la bacteria *E. coli*. (c) Imagen de la bacteria señalada con un círculo punteado de color blanco en (b), en la cual puede apreciarse la fluorescencia que esta presenta. Estas imágenes fueron obtenidas con un microscopio de láser confocal
- 7.32 Soluciones del blanco de la bacteria (C) y de los oligómeros oFE3GMan y oFE3Man2 sin bacteria (A) y con bacteria (B) bajo la lámpara de luz ultravioleta
- 7.33 Espectro de emisión de los oligómeros oFE3GMan y oFE3Man2 con la bacteria E. coli

92

93

95

96

94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
6.1	Reactivos empleados para el desarrollo de la etapa experimental	24
6.2	Solventes empleados para el desarrollo de la etapa experimental	25
7.1	Desplazamientos químicos de solventes deuterados	53
7.2	Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de la hidroquinona 1, 1,4-bis(dodecanoxi)benceno 2, 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)benceno 3, 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4-yodobenceno 4 y del 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno 5.de solventes deuterados	61
7.3	Desplazamientos químicos experimentales y teóricos del ácido 4- yodobenzoico 6, 4-yodobenzoato de bencilo 7, 4- [(trimetilsilil)etinilen]benzoato de bencilo 8 y 4-etinilbenzoato de bencilo 9	63
7.4	Desplazamientos químicos de 4-yodofenol 10, 1-yodo-4-[2-(2-metoxi-etoxi)- etoxi] benceno 11, 4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-trimetilsililetinilenbenceno 12, y 1-etinilen-4-[2(-2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13	65
7.5	Desplazamientos químicos teóricos y experimentales de los trímeros oFE3Bz2, oFE3COOH2 y de oFE3Man2	82
7.6	Desplazamientos químicos teóricos y experimentales del dímero 4[4-bromo- 2,5-bis-(dodecanoxi)fenil etinilen] benzoato de bencilo 14 y de los oligómeros oFE3GBz, oFE3GCOOH y oFE3GMan	85
7.7	Longitudes de absorción y coeficientes de extinción molar de los oligómeros oFE3Bz2, oFE3COOH2, oFE3Man2, oFE3GBz, oFE3GCOOH y oFE3GMan	89
7.8	Longitudes de máxima emisión de los oligómeros oFE3COOH2, oFE3Man2, oFE3GCOOH y oFE3GMan	90

RESUMEN

En este trabajo de tesis se reporta la síntesis de dos nuevos oligómeros de tipo fenilenetinileno portadores de 4-aminofenil- α -D-manopiranósida como grupo receptor para el reconocimiento molecular de la bacteria *Escherichia coli*. La síntesis requiere primeramente de la obtención de trímeros fenilenetinilenos con terminaciones de grupos bencilbenzoato. Sucesivamente se realiza una desprotección selectiva para obtener los correspondientes oligómeros con terminaciones ácido carboxílico. Finalmente, éstos últimos se someten a una reacción de amidación con 4-aminofenil- α -D-manopiranósida para dar los productos esperados. Todos los productos intermediarios, así como los oligómeros fueron caracterizados por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear ¹H y ¹³C. Para los oligómeros sustituidos con manosa se realizó también el estudio de las propiedades ópticas de absorción y emisión en solución por espectroscopia UV-vis y de fluorescencia. Finalmente se llevaron a cabo ensayos de reconocimiento molecular de la bacteria. El reconocimiento molecular se comprobó por microscopía óptica, láser confocal y por espectroscopia de fluorescencia. La formación de aglomerados fluorescentes bacteria-oligómero demuestra la viabilidad de utilizar estos oligómeros como moléculas de reconocimiento molecular en el diagnóstico clínico de cepas potencialmente patógenas de *E. coli*.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias, virus y otros microorganismos se encuentran en la naturaleza y en el ambiente en una cantidad y diversidad inimaginable. Las bacterias patógenas, por ejemplo, están distribuidas en el suelo, en aguas marinas, en los tractos intestinales de animales o en aguas contaminadas con heces. Una persona en promedio presenta más de 150 tipos diferentes de bacterias adentro y afuera de su cuerpo. La mayor parte de los microorganismos desarrollan actividades benéficas, sin embargo, existen algunos microorganismos potencialmente dañinos que pueden producir enfermedades graves y hasta la muerte en el ser que los hospeda. Entre ellos, podemos mencionar las bacterias Escherichia coli y Salmonella typhimurium que a la fecha son responsables todavía de varias enfermedades infecciosas en países desarrollados o en vías de desarrollo. Los métodos convencionales de análisis para detectar la presencia de un microorganismo, usualmente incluyen la evaluación morfológica del microorganismo así como pruebas bioquímicas y de cultivo en medios de crecimiento específicos. Si bien estas técnicas permiten la detección de las bacterias, requieren de la amplificación de la señal a través del crecimiento de una célula a una colonia, proceso que demanda un tiempo mínimo (hasta 72 h). Además, normalmente ningún "test" puede identificar con absoluta exactitud, de manera que se necesitan realizar varias pruebas. A esto se tiene que agregar que se requiere de personal altamente capacitado e infraestructura de seguridad biológica.

En los últimos años se ha venido desarrollando la tecnología de los biosensores como alternativa viable y de bajo costo a los métodos antes mencionados. En principio, los biosensores permiten tener una respuesta rápida y selectiva con un equipo sencillo y económico que cualquier persona no entrenada pueda usar en el momento y lugar que se requiera. Como biosensor, normalmente se identifica un dispositivo compacto constituido por un sistema capaz de reconocer el microorganismo (receptor) y un sistema de detección (transductor). Sin embargo, para la construcción de un biosensor de interés comercial es necesario resolver varios problemas relacionados con su ensamble, como son la fabricación de un transductor altamente sensible, la inmovilización en su superficie del receptor de forma que quede susceptible al reconocimiento molecular y que 0su actividad sea estable en el tiempo, la encapsulación del dispositivo para evitar interferencias del ambiente externo, etc. De allí que una alternativa es la de realizar un

en estado líquido; es decir, desarrollar un material que combine en su estructura las dos funciones, transductor y receptor y que sea soluble o por lo menos parcialmente soluble en el medio de análisis (fluido corporal).

En cuanto a la detección de las bacterias patógenas como la *Escherichia coli*, es notorio que éstas pueden fijarse a los carbohidratos presentes en las células de otros organismos a través de adhesiones célula-célula y de esta forma se desarrolla la infección en el huésped. El tipo de carbohidrato hace que la interacción célula-bacteria patógena sea selectiva. En particular, la cepa *E. coli* con fimbrias tipo 1 constituye un tipo de bacteria patógena responsable de diversas enfermedades de las vías urinarias. Esta presenta una adhesión especifica hacía derivados aromáticos de la manosa, mismos que constituyen los receptores ideales para esta bacteria.

En cuanto a los transductores, no es posible construir biosensores en solución con transductores de tipo amperométrico, ya que éstos requieren de la incorporación de electrodos, es decir, dispositivos sólidos. La única opción viable en solución es la detección por medios ópticos al utilizar colorantes o fluoróforos. Sin embargo, la sustitución de carbohidratos en moléculas pequeñas como son la mayor parte de los colorantes de uso común no es sencilla ya que éstas presentan en su estructura química normalmente grupos amino o hidroxilo, que pueden interferir en las reacciones de sustitución con la manosa y además en las interacciones con la bacteria. Los oligómeros y polímeros conjugados han surgido como materiales candidatos para aplicaciones en biosensores ópticos. En este caso, los grupos receptores pueden ser insertados en las cadenas laterales sin alterar la estructura química de la parte conjugada. Al interactuar los receptores con su substrato biológico, se inducen cambios conformacionales en el esqueleto conjugado y por consecuencia se provoca una variación en las propiedades ópticas. Este tipo de aplicación se ha reportado para poli(diacetilenos) en biosensores colorimétricos y para poli(fenilenetinilenos) en biosensores de fluorescencia. El limitado número de trabajos que existen en literatura, es probablemente debido a la dificultad de obtener polímeros conjugados solubles o parcialmente solubles en agua, ya que normalmente la sustitución de estos sistemas con grupos polares (con la finalidad de incrementar su solubilidad en agua) afecta sus propiedades ópticas. Además, los polímeros conjugados tienen una elevada tendencia a agregarse, lo cual interfiere en las interacciones con los microorganismos. Por estas razones, es recomendable sintetizar más bien macromoléculas de bajo peso molecular como son los oligómeros, lo cual es el tema de investigación de esta tesis.

2. ANTECEDENTES

2.1 Los carbohidratos como moléculas de reconocimiento de bacterias

Los carbohidratos o sacáridos están formados por una o más unidades cíclicas polihidroxiladas conocidas como monosacáridos (**figura 2.1**). Cuando estos compuestos forman parte de la superficie de membranas celulares intervienen en diversos fenómenos de reconocimiento intercelular de gran importancia para los seres vivos, como por ejemplo en los procesos de fertilización, respuesta inmunológica, replicación viral e infecciones causadas por virus, bacterias o parásitos, entre otros.¹ El principio bajo el cual ocurren estos procesos es de especial interés, debido a que da pauta para que los carbohidratos puedan utilizarse como biomoléculas de reconocimiento que permitan identificar y cuantificar analitos muy específicos.²



Figura 2.1 Estructuras químicas de algunos sacáridos que participan en procesos de adhesión celular.

Por tal motivo, en los últimos años se ha estudiado la posibilidad de emplear carbohidratos como elementos de reconocimiento en dispositivos conocidos como biosensores, con el fin de aplicarlos en la detección de virus,³ bacterias⁴ y toxinas.⁵ El principio de reconocimiento implica un proceso de adhesión celular similar al que ocurre cuando los seres vivos son infectados por microorganismos de tipo patógeno. En este proceso, los carbohidratos funcionan como sitios de

reconocimiento hacia receptores específicos que normalmente están determinados por proteínas que se localizan en la superficie de los virus, las bacterias y las toxinas (**Figura 2.2**).⁶ Algunos ejemplos de la interacción entre un carbohidrato y un microorganismo patógeno lo constituyen los compuestos derivados de la manosa y del ácido siálico, los cuales interaccionan con algunos tipos de *Escherichia coli* (*E. coli*)⁷ y con el virus de la influenza,⁸ respectivamente.



Figura 2.2 Esquema de una membrana celular en la cual se encuentran adheridas células de tipo microbiano, mediante interacciones proteína-carbohidrato Los sitios de reconocimiento están representados por figuras geométricas.

Las bacterias se adhieren a los carbohidratos a través de compuestos conocidos como adhesinas. Para el caso particular de la bacteria $E. \ coli$, la interacción se lleva a cabo a través de la adhesina llamada FimH, la cual es de naturaleza proteica.⁹

2.2 Interacciones bacteria-carbohidrato

Al igual que los carbohidratos, las adhesinas desempeñan un rol importante en los procesos de reconocimiento bacteriano. Estas moléculas pueden estar formadas de polisacáridos, los cuales por lo general son los componentes habituales de la membrana o de la pared bacteriana. Otro tipo de adhesinas son las de tipo proteico, a las que también se les conoce como lectinas bacterianas. Dentro de este último grupo existen adhesinas que forman parte de organelos denominados

fimbrias o pilis.¹⁰ Las fimbrias son apéndices rígidos que tienen forma de cabello y están distribuidas en la superficie de la bacteria, como se observa en la figura 2.3.¹¹



Figura 2.3 Imagen de una Escherichia coli en la que se observa la presencia de fimbrias tipo l (TEM).

De entre el gran número de fimbrias producidas por las bacterias, las fimbrias tipo 1 o también conocidas como fimbrias sensibles a la manosa han sido objeto de un amplio estudio. Esta clase de organelos son producidos por algunas bacterias como la *E. coli*, a la cual se le asocia con infecciones en vías urinarias así como con infecciones gastrointestinales.¹² Una bacteria presenta alrededor de 200 a 500 fimbrias tipo 1 en su pared celular, cada organelo tiene una longitud aproximada de 1 a 2 m μ y un diámetro de 7 nm y su estructura esta conformada por cuatro subunidades proteicas entre las que se encuentra la adhesina FimH. Esta proteína está intercalada a lo largo de la fimbria y también está presente en la punta, siendo esta última la que participa activamente durante la etapa de reconocimiento (**Figura 2.4**).¹³



Figura 2.4 Imagen de una fimbria tipo 1. La adhesina FimH se encuentra señalada por la flecha.

La adhesina FimH está formada por 279 residuos de aminoácidos distribuidos en dos dominios, uno de ellos es un barril que agrupa a los primeros 157 residuos en 11 plegamientos tipo β y además posee una cavidad receptora en donde se lleva a cabo la interacción con la manosa (**Figura 2.5**), por lo que a este dominio se le conoce como dominio receptor. El resto de los aminoácidos tienen la función de unir la adhesina a la fimbria.¹⁴

Entre las bacterias de la misma especie se encuentran cepas que producen variantes de la adhesina FimH y como consecuencia modifican la selectividad que presenta la bacteria hacia los carbohidratos derivados de la manosa. Por ejemplo, la *E. coli* de tipo uropatógeno produce una adhesina que reconoce a los monosacáridos derivados de la manosa, mientras que la *E. coli* de tipo gastrointestinal se adhiere a los trisacáridos de la manosa. Este comportamiento se atribuye a la variación en la secuencia de los residuos de aminoácidos de la adhesina.¹⁵

ANTECEDENTES



Figura 2.5 Dominio receptor de la adhesina FimH, en donde se puede apreciar la cavidad receptora de la manosa amplificada. La parte hidrófoba se encuentra señalada por los residuos de aminoácidos que la integran. La región azul corresponde a los residuos de aminoácidos con carga positiva y la región roja a los residuos con carga negativa

La cavidad receptora de la proteína FimH se encuentra rodeada por una región hidrófoba formada por isoleucina (Ile13 y Ile52), tirosina (Tyr48) y fenilalanina (Phe142) (ver **Figura 2.5**), debido a ello, la *E. coli* presenta una fuerte afinidad hacia los derivados aromáticos de la manosa, como son la p-aminofenil- α -D-manopiranósida, la p-nitrofenil- α -D-manopiranósida y la fenil- α -Dmanopiranósida. La interacción entre el carbohidrato y la adhesina FimH se realiza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del carbohidrato y los residuos de aminoácidos presentes en la cavidad receptora de la manosa. Otro tipo de interacciones que se llevan a cabo son las de carácter hidrófobo, las cuales favorecen el acoplamiento entre la parte aromática del carbohidrato y la región hidrófoba de la lectina.¹⁶

Debido a la alta selectividad que presentan los derivados aromáticos de la manosa, estos carbohidratos surgen como moléculas de reconocimiento ideales para la detección de bacterias como la *E. coli*, cuando se unen a la estructura de moléculas fluorescente como por ejemplo de polímeros conjugados. De esta manera, los carbohidratos se unen al gran número de moléculas biológicas que se emplean con fines de detección como son las enzimas, los anticuerpos, los receptores de membranas celulares así como los ácidos nucleicos, entre otros. Las ventajas que presentan los carbohidratos sobre este grupo de biomoléculas son que no se desnaturalizan ni

pierden actividad y debido a que tienen un tamaño relativamente pequeño comparado con las proteínas, se incrementa la densidad de enlaces y como consecuencia la sensibilidad de detección.

2.3 Los polímeros y oligómeros conjugados.

Los polímeros y oligómeros conjugados han sido objeto de una intensa investigación en las últimas décadas. Estos materiales presentan propiedades ópticas y eléctricas que sólo habían sido observadas en metales y materiales semiconductores (Si y GaAs).¹⁷ El estudio de estas propiedades ha estimulado el desarrollo de un gran número de aplicaciones en circuitos electrónicos, fotodetectores, celdas solares, diodos emisores de luz, baterías ligeras, dispositivos electrocrómicos y en biosensores.¹⁸

Generalmente a un polímero conjugado se le define como un material orgánico cuya estructura tiene enlaces dobles y/o triples alternados con enlaces sencillos a lo largo de su cadena principal. Sin embargo, gracias a la síntesis química ahora podemos encontrar polímeros conjugados con compuestos aromáticos o heterocíclicos formando parte de su estructura principal o con una amplia variedad de grupos sustituyentes que se introducen a la molécula con el propósito de modificar sus propiedades físicas, eléctricas y ópticas (**Figura 2.6**). De esta manera se han obtenido compuestos conjugados con aplicaciones muy específicas. De entre ellas y debido a la sensibilidad que presentan ante estímulos externos que incluyen cambios de temperatura, de solvente o por el ambiente químico, estos materiales tienen un futuro prometedor como moléculas de detección.¹⁹



Figura 2.6 Estructuras químicas de algunos polímeros conjugados.

En un principio, los polímeros conjugados eran empleados para inmovilizar moléculas biológicas sobre la superficie de un electrodo. De esta manera se diseñaron diversos dispositivos que empleaban enzimas principalmente, para determinar glucosa en sangre, urea o creatinina.^{18a, 20} En algunos casos, la propiedad de conductividad eléctrica característica de estos materiales fue utilizada para detectar compuestos como la penicilina.²¹ Hoy en día, se sintetizan materiales conjugados que poseen en su estructura moléculas de tipo químico o biológico que funcionan como sitios receptores o de reconocimiento, mientras que el polímero u oligómero conjugado funciona como elemento de transducción de la señal. Algunos de los compuestos que se emplean como elementos da reconocimiento son las proteínas, los péptidos o los carbohidratos, los cuales para poder incorporarlos a la estructura del polímero, deben contener grupos amino, hidroxilo o mercapto disponibles. Las señales que se generan a partir de la interacción analito-receptor son transformadas por la parte conjugada de la molécula de detección a señales eléctricas, fluorescentes, electroquímicas o cambios de color.²²

2.4. Oligómeros del tipo fenilenetinileno

Entre los polímeros conjugados de mayor potencial en aplicaciones optoelectrónicas se encuentran los poli(fenilenetinilenos),²³ sin embargo, una limitación de este tipo de materiales es su poca solubilidad debido a la fuerte interacción intramolecular π - π , fenómeno que provoca la formación de agregados, lo cual afecta las propiedades ópticas y optoelectrónicas. La introducción de cadenas alifáticas como sustituyentes laterales o de partes flexibles en el esqueleto principal, así como el empleo de oligómeros de tamaño controlado, son alternativas para solucionar este problema.²⁴ En este contexto, las ventajas de utilizar oligómeros respecto a sus polímeros homólogos son:

- Los oligómeros, al ser materiales monodispersos presentan un mayor grado de pureza, lo que les confiere propiedades ópticas y optoelectrónicas puras.
- Presentan una amplia gama de emisión en el espectro electromagnético.
- Presentan buena solubilidad en solventes como cloroformo, cloruro de metileno o tetrahidrofurano, y en general tienen menor tendencia a formar agregados.

Su síntesis aún cuando a veces es más laboriosa que la de los correspondientes polímeros, da productos con propiedades químicas y fisicoquímicas reproducibles. En el caso de los polímeros existen varios casos en la literatura, en los cuales las propiedades ópticas, macromoleculares y fisicoquímicas de un polímero varían de un artículo a otro, aún cuando en principio se utilizaron las mismas condiciones de síntesis.^{18b}

2.5 Reacción de acoplamiento de Sonogashira-Heck

La síntesis de oligómeros y polímeros del tipo fenilenetinileno se lleva acabo principalmente gracias a una reacción conocida como acoplamiento de Sonogashira-Heck.

En el año de 1975, Sonogashira y col.²⁵ y Heck y col.²⁶ reportaron que el hidrógeno de un acetileno terminal puede acoplarse fácilmente a un halogenuro de arilo por la acción catalítica del complejo dicloro bis(trifenilfosfina) paladio II [PdCl₂(PPh₃)₂] en presencia de trietilamina como solvente, bajo condiciones de reacción suaves, inclusive a temperatura ambiente.



El mecanismo de reacción propuesto por Sonogashira y sus colaboradores se muestra en la **figura** 2.7 e inicia con la formación del complejo bis(trifenilfosfina) dialquinil paladio(II) 2, el cual se genera por la acción catalítica del CuI sobre la Diclorobis(trifenilfosfina) paladio (II) 1 y HC=CR; posteriormente, se produce la especie catalítica bis(trifenilfosfina) paladio (0) 3 mediante la reducción de Pd(II) a Pd (0) y la eliminación reductiva de una molécula de diacetileno. Enseguida ocurre la adición oxidativa del haluro de arilo formándose el aducto 4, que posteriormente forma una especie aril-alquinil derivada del paladio 5. Por último, a través de una eliminación reductiva se obtienen el aril-etinileno 6 y la regeneración de la especie catalítica 3. Heck y col. propusieron un mecanismo similar al de Sonogashira, sólo difieren en que éste último emplea CuI como co-catalizador, ya que establece que la etapa de reducción de Pd(II) a Pd(0) así como la sustitución del acetileno al complejo de paladio es catalizada por el CuI en forma de acetiluros de cobre(II), proceso conocido como transmetalación



Figura 2.7 Mecanismo de reacción propuesto por Sonogashira-Heck para el acoplamiento de acetilenos terminales y halogenuros de arilo.

En 1993, Christian Amatore²⁷ propone un nuevo mecanismo de reacción para las sustituciones nucleofilicas catalizadas por complejos de paladio cero-valente. En base a estudios realizados por resonancia magnética nuclear de ³¹P y por métodos electroquímicos establece que el acoplamiento de acetilenos terminales con haluros de arilo se realiza en cuatro etapas (**Figura 2.8**).



Figura 2.8 Mecanismo de reacción propuesto por Amatore para el acoplamiento de acetilenos terminales y halogenuros de arilo.

En la primera etapa ocurre la reducción del paladio (II) a paladio (0). Los cationes producidos por el co-catalizador CuI actúan como agentes reductores participando en la formación de pares de iones a partir de $PdCl_2(PPh_3)_2$. El complejo de paladio (0) resultante da lugar a la formación de tres especies aniónicas que se encuentran en equilibrio, siendo **b** la mayoritaria (**Figura 2.9**).



Figura 2.9 Especies aniónicas producidas en la primera etapa del mecanismo de reacción propuesto por Amatore.

La siguiente etapa consiste en una rápida adición oxidativa de un haluro de arilo al complejo de paladio (0) obtenido en la etapa anterior, formándose de esta manera un complejo aniónico pentacoordinado estable *trans*-ArPd₂X(PPh₃)₂Cl, el cual es susceptible de reaccionar con el nucleófilo formado a partir del acetileno.



Figura 2.10 Adición oxidativa en la segunda etapa descrita por Amatore.

En la tercera etapa se lleva a cabo la sustitución nucleofilica del haluro por el acetileno, obteniéndose un nuevo complejo aniónico pentacoordinado de paladio. En esta etapa se libera el protón del acetileno y el haluro del complejo, formando junto con la trietilamina una sal insoluble que precipita. Finalmente, se efectúa la eliminación reductiva de los sutituyentes arilo y acetiluro, obteniéndose el arilenetinileno y la regeneración del complejo de paladio (0), el cual comienza un nuevo ciclo de acoplamiento. Para que esta etapa pueda realizarse, el complejo trans termodinámicamente estable debe isomerizarse a cis.

Cabe hacer énfasis que el mecanismo propuesto por Amatore ha tenido mayor aceptación entre la comunidad científica.

En cuanto a las condiciones de reacción es importante recalcar la importancia que tiene la remoción de oxígeno de la reacción para evitar la desactivación del catalizador y con ello minimizar el homoacoplamiento oxidativo de acetilenos terminales, esta reacción es catalizada por las sales de yodo cuando los acetiluros de cobre son expuestos a agentes oxidantes o al aire. Por tal motivo, las reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio y que emplean un co-catalizador como el CuI se realizan bajo atmósfera inerte. Sin embargo, no hay que perder de vista que Sonogashira propone en su mecanismo de reacción que la formación de diacetilenos es inevitable. También se debe evitar toda traza de humedad, debido a que el agua actúa como nucleófilo y rompe los complejos formados durante la reacción. Otras variables que también deben ser consideradas al realizar una reacción de acoplamiento son la elección del halogenuro de arilo, el efecto electrónico de los sustituyentes sobre dicho halogenuro de arilo, el tipo de catalizador, así como el disolvente.

Elección del halogenuro de arilo

Los compuestos halogenados que presentan mayor reactividad y por lo mismo son los que más se utilizan en reacciones de acoplamiento, son los yodo y los bromoarilos. La diferencia de reactividad existente entre uno y otro compuesto permite realizar reacciones muy selectivas. Los yoduros de arilo reaccionan a temperatura cercana a los 0°C, mientras que los bromoarilos requieren de la aplicación de energía para que se lleve a cabo la reacción.

Sustituyentes en el halogenuro de arilo

Considerando que el complejo de paladio (0) es una especie rica en electrones, la adición oxidativa del halogenuro de arilo al complejo de paladio (0) estará influenciada por la naturaleza de los grupos sustituyentes en el núcleo aromático. Entre más electroatractor sea el grupo sustituyente, más rápida será su adición al complejo de Pd (0). Por el contrario entre más electrodonador sea el sustituyente, más lenta será la adición oxidativa.

Tipo de catalizador

El dicloro bis(trifenilfosfina) paladio (II), $PdCl_2(PPh_3)_2$, ha sido el complejo tetracoordinado más utilizado por su estabilidad al aire y relativo bajo costo en relación a otros catalizadores como $Pd(PPh_3)_4$, $Pd(OAc)_2$ y el $Pd_2(dba)_3$.

Disolvente

El disolvente a emplear para una reacción de esta naturaleza debe tratarse de una base capaz de sustraer el protón del acetileno terminal y de esta manera realizar la sustitución nucleofílica del alquino en el complejo pentacoordinado de Pd (II). Principalmente, son las aminas quienes tienen un buen desempeño, entre las cuales destacan la trietilamina, la dietilamina y la diisopropilamina. Además, se pueden emplear co-solventes como tetrahidrofurano (THF), tolueno, N,N dimetilformamida (DMF), entre otros. Su función radica en difundir el compuesto organometálico en el medio y el de mantener a las especies monoméricas, oligoméricas o macromoleculares en solución conforme se van formando. Cabe resaltar que el THF es el más utilizado ya que tiene buenas propiedades de solvatación para los complejos metálicos y promueve la solubilidad de las cadenas laterales.

2.6 Estado del arte

Aunque los polímeros y los oligómeros conjugados constituyen un medio de detección de bacterias altamente selectivo cuando se encuentran funcionalizados con carbohidratos, hasta la fecha son pocos los trabajos que se encuentran reportados en la literatura. Entre los trabajos publicados destacan los del grupo de investigación de la Dra. Charych que se centran en las transiciones colorimétricas que presenta el polidiacetileno como consecuencia del reconocimiento molecular. Un estudio bastante interesante realizado por este grupo se relaciona con la detección del virus de la influenza. Cuando el virus interacciona con el ácido siálico del polidiacetileno (**Figura 2.11**), se observa un cambio de coloración de azul a rojo, debido a cambios conformacionales en el esqueleto conjugado.²⁸



Figura 2.11 Poli(diacetileno) funcionalizado con ácido siálico para la identificación del virus de la influenza.

En otras investigaciones, se han empleado poli(tiofenos) solubles en agua (**Figura 2.12**), los cuales son portadores de manosa (**a**) o de ácido siálico (**b**) como moléculas de reconocimiento de la bacteria *Escherichia coli* y del virus de la influenza, respectivamente. El principio de reconocimiento también se basa en transiciones colorimétricas. Una vez que el virus o la bacteria se han adherido al polímero, las interacciones intermoleculares que producen una distorsión del esqueleto son eliminadas y resulta un esqueleto más plano, lo que ocasiona un desplazamiento hacia el rojo.³



Figura 2.12. Politiofenos portadores de manosa (a) y de ácido siálico (b).

17

En otro trabajo más reciente, se reporta la identificación selectiva de la bacteria *Escherichia coli* por un polímero de tipo fenilenetinileno (**Figura 2.13**), el cual se encuentra funcionalizado con el monosacárido manosa y además es soluble en medio acuoso. La detección de la bacteria se basa en la formación de aglomerados celulares fluorescentes cuando la bacteria interacciona con la parte carbohidratada del polímero. Estos aglomerados pueden visualizarse fácilmente bajo luz ultravioleta.²⁹ Cabe señalar sin embargo que los resultados reportados en este trabajo dejan algunas dudas; primeramente es notorio que los polímeros de tipo fenilenetinileno presentan una alta tendencia a aglomerarse. Los autores muestran varias imágenes por microscopia confocal al variar la concentración de bacteria pero no mencionan con detalles que pasa al cambiar la concentración del polímero así que los aglomerados podrían deberse inclusive a interacciones entre cadenas polimericas. Además no se realiza un estudio por fluorescencia, solamente se reporta la foto de las soluciones bajo irradiación UV. Por otra parte la caracterización química y fisicoquímica del polímero es escasa. Puesto que el polímero se obtiene después de su funcionalización con la manosa de un polímero precursor, quedan muchos cuestionamientos sobre el éxito de su funcionalización selectivamente en los sitios indicados en la estructura.



Figura 2.13 Polímero de tipo fenilenetinileno funcionalizado con el monosacárido manosa para la detección de la bacteria *E. coli*.

3. HIPOTESIS

La coexistencia de una parte conjugada fotoluminiscente y de 4-Aminofenil- α -D-manopiranósida en la estructura química de los oligómeros de tipo fenilenetinileno permitirá obtener nuevos materiales fluorescentes útiles en la detección de cepas de *Escherichia coli* portadoras de fimbrias sensibles a la manosa.

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es obtener nuevos oligómeros conjugados del tipo fenilenetinileno fluorescentes y con la capacidad de reconocimiento molecular de cepas de *Escherichia coli* portadoras de fimbrias sensibles a la manosa. El cumplimiento de este objetivo conlleva a la realización de los siguientes objetivos específicos:

- Sintetizar trímeros del tipo fenilenetinileno funcionalizados con 4-aminofenil-α-Dmanopiranósida. Así como caracterizar éstos compuestos por Resonancia Magnética Nuclear ¹H y ¹³C, espectroscopía de fluorescencia y ultravioleta visible.
- 2. Estudiar el reconocimiento molecular de los oligómeros portadores del derivado de la manosa en cepas de *E. coli* mediante microscopía óptica, láser confocal y por espectroscopia de fluorescencia.

5. JUSTIFICACIÓN

Los biosensores han surgido como una tecnología alterna a los métodos clásicos de diagnóstico que permita el análisis de fluidos corporales de forma muy rápida y con aparatos sencillos que no requieren de personal capacitado para su uso. Sin embargo, los biosensores compactos requieren de solucionar varias etapas de fabricación que permitan incorporar los dos componentes esenciales (transductor y receptor) en un dispositivo. Una alternativa es desarrollar moléculas que combinen las dos funciones de transducción y de reconocimiento molecular y que se puedan agregar en solución a los medios de cultivo o muestras de fluidos corporales. En este sentido, el receptor tiene que ser altamente selectivo al microorganismo de estudio, mientras que el transductor debe presentar una propiedad física que se pueda aprovechar en solución y que varíe únicamente como consecuencia de la interacción receptor-microorganismo. Con la finalidad de desarrollar biosensores en solución para la detección de la bacteria E. coli, se ha diseñado la estructura química de las moléculas de estudio en donde, el grupo 4-aminofenil- α -Dmanopiranósida funciona como grupo de reconocimiento, dada su elevada afinidad hacia las fimbrias tipo 1 de esta bacteria uropatógena. La parte conjugada del oligómero de tipo fenilenetinileno brinda propiedades de emisión específicas. Se ha escogido limitar la talla molecular a tres unidades ya que los oligómeros presentan las siguientes ventajas con respecto a sus polímeros homólogos: 1) propiedades ópticas puras por ser materiales monodispersos, 2) menor tendencia a formar agregados insolubles lo cual afectaría las interacciones con la bacteria, 3) la síntesis de los polímeros difícilmente da resultados reproducibles en términos de rendimiento y pesos moleculares, 4) es más fácil insertar grupos funcionales como la manosa en estructuras pequeñas que en moléculas de alto peso molecular, 5) el balance entre la parte apolar (esqueleto conjugado) y la parte polar (manosa) es más equilibrado en oligómeros que en polímeros garantizando una mayor miscibilidad con medios acuosos, lo cual facilita la realización de ensayos microbiológicos. Como sistema conjugado se ha escogido los fenilenetinilenos no solamente por la experiencia del grupo de investigación en la síntesis y estudio de propiedades ópticas de fluorescencia de estos materiales sino también porque de los diferentes sistemas conjugados fluorescentes estos presentan altos rendimientos cuánticos
inclusive en moléculas de bajo peso molecular. Por otra parte estas moléculas muestran características distintivas como: son estructuras más planas con respecto a otros oligómeros o polímeros conjugados [por ejemplo a los poli(fenilenvinilidenos)], no presentan isomería cistrans, son más estables y por ende las variaciones en sus propiedades de fluorescencia en el caso especifico de este estudio se pueden relacionar *únicamente* a la interacción entre el carbohidrato y la bacteria. Finalmente cabe resaltar que las estructuras aquí propuestas a pesar de ser de fácil síntesis no han sido previamente reportadas.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Este capítulo se encuentra dividido en 4 secciones principales. En la sección 6.1 se muestra una lista del material y equipo empleado durante la fase experimental de este estudio. También se hace una descripción de los equipos que se utilizaron para realizar la caracterización de los compuestos químicos obtenidos. Las propiedades físicas de los reactivos y solventes ocupados durante la síntesis química y en las pruebas de reconocimiento bacteriano se presentan en la sección 6.2. El procedimiento que se siguió para la síntesis de cada uno de los monómeros y oligómeros, así como los resultados obtenidos en la caracterización de estos compuestos, se detalló en las secciones 6.3 y 6.4. Por último, en la parte 6.5 se describen las actividades realizadas en las pruebas preeliminares de reconocimiento bacteriano.

6.1 Material y equipo

Material

Matraz balón de dos bocas de 250 mL. Matraz balón de una boca de 25, 100 , 250 y 500 mL. Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 mL. Columnas para cromatografía. Refrigerante rosario. Trampa de humedad. Embudo de separación de 250 mL. Embudo de sadición de 25 mL. Embudo de tallo largo. Probetas de 15 y 100 mL. Jeringas de vidrio de 0.025, 2, 5 y 10 mL. Tubos de cultivo

Llave para gas. Termómetro. Trampa para vapores. Gradillas. Tubos con rosca. Micropipetas. Cajas petri. Mantilla de calentamiento. Parrilla de agitación. Agitador magnético. Cánula.

Equipos

- Rotavapor Büchi
- Lámpara UV Cole Parmer 9815-series lamps
- Autoclave Tuttnauer Brinkamnn 2540E
- Incubadora Lab-line Imperial II
- Centrífuga Unico DSC-158T
- Liofilizador Labconco Freeze Dry System/Freezone 4.5
- Fusiómetro Electrothermal Mel Temp
- Microscopio Leica ATC 2000
- Microscopio Láser confocal de barrido Carl-Zeiss LSM Pascal 5
- ♣ Espectrómetro de RMN ¹H y ¹³C Jeol Eclipse de 300 MHz. En la obtención de los espectros de resonancia magnética se utilizaron como solventes cloroformo-d₁, tetrahidrofurano-d₈ y dimetilsulfóxido-d₆ y se utilizó como referencia interna tetrametilsilano (TMS, δ= 0 ppm).
- Espectrofotómetro UV-Vis Shimatzu 2401 PC con un rango de detección de 190 a 800 nm, equipado con portamuestras para líquidos y para películas. La dimetilformamida (DMF) que se utilizó para realizar los análisis fue de grado espectroscópico.
- Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B equipado con polarizadores de excitación y emisión. Los espectros de emisión de los oligómeros sintetizados en este estudio fueron obtenidos en solución empleando DMF como solvente y realizando la excitación 10 nm por debajo de la longitud máxima de absorción que presenta cada compuesto.

6.2 Reactivos y solventes

Los reactivos fueron adquiridos en Aldrich Chemical Company y fueron empleados tal y como se recibieron, sin realizar alguna purificación adicional.

Reactivo	Fórmula química	Peso molecular g/mol	Densidad g/ml	Pureza %
Ácido acético	CH ₃ COOH	60.05	1.492	99
Ácido clorhídrico	HCl	36.46	1.192	36.5-38
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	98.08	1.84	98.3
Ácido 4-yodobenzoico	C ₇ H ₅ IO ₂	248	-	98
Alcohol bencílico	C ₆ H ₅ CH ₂ OH	108.141	1.038	99.3
4-Aminofenil α-D-manopiranósida	C ₁₂ H ₁₇ NO ₆	271.3		-
Bromo	Br ₂	159.82	3.102	99.5
1-bromododecano	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ Br	249.23	1.038	98
1-Bromo-2-(2-metoxi-etoxi)-Etano	C ₅ H ₁₁ BrO ₂	183.05	1.360	90
Clorofosfato de difenilo	C ₁₂ H ₁₀ ClO ₃ P	268.64	1.299	99
Diclorobis(trifenilfosfina) paladio II	$[(C_6H_5)_3P]_2PdCl_2$	701.89	-	98
Fluoruro de tetrabutilamonio	C ₁₆ H ₃₆ FN	261.47	0.903	-
Hidroquinona	C ₆ H₄OH	110.11	1.332	99
Hidróxido de potasio	КОН	56.11	2.044	99.99
Hidróxido de sodio	NaOH	40.01	2.130	98
2-Mercaptobenzoxazol	C ₇ H ₅ NOS	151.19	-	95
N-metil-2-pirrolidinona	C5H9NO	99.13	1.028	99
Sulfito de sodio	Na ₂ SO ₃	126.04	2.630	98
Trimetilsililacetileno	C ₅ H ₁₀ Si	98.22	0.709	98
Yodato de potasio	KIO ₃	214.02	3.89	-
Yodo	I ₂	253.82	4.660	-
4-Yodofenol	C ₆ H ₅ IO	220.01	-	99
Yoduro de cobre	CuI	190.44	-	98

Tabla 6.1 Reactivos empleados para el desarrollo de la etapa experimental.

Todos los solventes fueron suministrados por J. T. Baker. Algunos solventes como el benceno y el tolueno fueron secados con hidruro de sodio (NaH), la trietilamina fue secada con KOH, el THF fue secado primero con KOH y después con Na/benzoquinona, bajo atmósfera de nitrógeno.

Solvente	Estructura química	Peso molecular g/mol
Acetona	(CH ₃) ₂ CO	58.08
Benceno	C ₆ H ₆	78.11
Cloroformo	CHCl ₃	119.38
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	84.93
N, N-Dimetilformamida	C ₃ H ₇ NO	73.10
Etanol	C ₂ H ₅ OH	46.07
Éter dietílico	(C ₂ H ₅) ₂ O	74.12
Hexanos	C ₆ H ₁₄	86.18
Metanol	CH ₃ OH	32.04
Tetracloruro de carbono	CCl ₄	153.82
Tetrahidrofurano	C ₄ H ₈ O	72.11
Tolueno	C ₆ H ₅ CH ₃	92.14
Trietilamina	C ₆ H ₁₅ N	101.19

Tabla 6.2 Solventes empleados para el desarrollo de la etapa experimental.

6.3 Síntesis de monómeros

6.3.1 Síntesis de 1,4-Bis(dodecanoxi)benceno (2)



En un matraz balón de 500 mL, al cual se le adaptó un refrigerante rosario con una trampa de humedad, se disolvieron 10 g (0.0908 mol) de hidroquinona (1) en 40 mL de dimetilformamida (DMF). A esta solución se le añadió 9.10 g (0.2270 mol) de NaOH y 47.53 g (46 mL, 0.1907 mol) de bromododecano. La reacción se dejó bajo calentamiento (120-130 °C) y agitación durante 16 h. Posteriormente, se permitió que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se le adicionaron 100 mL de agua fría para precipitar el producto. El precipitado fue separado por filtración y recristalizado en 150 mL de etanol tibio (60 °C), dejando en agitación por 30 min. Después la mezcla se metió en un baño frío para que el producto terminara de precipitar, se filtró una vez más y al sólido se le realizaron lavados con etanol frío, hasta que el líquido filtrado fuera incoloro. Se obtuvieron 31.69 g (78 %) de hojuelas blancas de 1,4-bis(dodecanoxi)benceno (2) con un **punto de fusión (p.f.**) de 75-76°C. **RMN** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6.82 (s, 4H, Ar), 3.90 (t, 4H, -CH₂- α -O-), 1.76 (q, 4H, -CH₂- β -O-), 1.45 (q, 4H, -CH₂- γ -O-), 1.28 (s, 32H, -CH₂-), 0.9 (t, 6H, -CH₃). **RMN** ¹³**C** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 153.32 (C1, C4), 115.48 (C2, C3, C5, C6), 68.75 (-C- α -O-), 32.03 (-C- β -CH₃), 29.77- 29.46 (-CH₂-), 26.18 (-C- γ -O-), 22.79 (-C- α -CH₃), 14.19 (-<u>C</u>H₃).



6.3.2 Síntesis de 1-Bromo-2,5-bis(dodecanoxi)benceno (3)

A un matraz de 250 mL de dos bocas, se le adaptó un refrigerante rosario, al cual se le colocó una trampa para burbujear y licuar en agua, el bromuro de hidrógeno (HBr)_{gas} formado durante la reacción. En este matraz se colocaron un agitador magnético, 5 g (0.0112 mol) del compuesto (**2**) y 40 mL de tetracloruro de carbono (CCl₄). Después se adicionaron 1.79 g (0.58 mL, 0.0112 mol) de bromo. La mezcla de reacción se dejó en agitación y reflujo por 14 h. Posteriormente, el solvente fue evaporado y el producto purificado por cromatografía en columna empacada con sílica gel, utilizando como eluente una mezcla de hexanos:CH₂Cl₂ (9:1), obteniendo 4.29 g (73 %) de hojuelas blancas de 1-Bromo-2,5-bis(dodecanoxi)benceno (**3**) con **p.f.** 50-51°C. **Rf** = 0.5 (9:1, hexanos: CH₂Cl₂). **RMN** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.1 (d, 1H, H6), 6.80 (s, 1H, H3), 6.78 (d, 1H, H5), 3.94 y 3.87 (t, 4H, -CH₂-α-O-), 1.77 (m, 4H, -CH₂-β-O-), 1.46 (m, 4H, -CH₂-γ-O-), 1.27 (s, 32H, -CH₂-), 0.89 (t, 6H, -CH₃). **RMN** ¹³**C** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 153.68 (C1), 149.87 (C4), 119.59 (C3), 114.78 (C6), 114.43 (C5), 112.89 (C2), 70.30 y 68.89 (-C-α-O-), 32.03 (-C-β-CH₃), 29.76- 29.39 (-<u>C</u>H₂-), 26.11 (-C-γ-O), 22.80 (-C-α-CH₃), 14.0 (-<u>C</u>H₃).



6.3.3 Síntesis de 1-Bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4-yodobenceno (4)

A un matraz balón de dos bocas, se le colocó un refrigerante rosario, al cual se le adaptó una trampa para burbujear y licuar en agua, los vapores de yoduro de hidrógeno (HI)_{gas} generados en la reacción. En este matraz se colocaron un agitador magnético, 35 mL de una mezcla de ácido acético:agua:ácido sulfúrico (92:7:1 % volumen), 3.55 g (6.75 x 10⁻³ mol) del compuesto (3), 0.29 g (1.36 x 10⁻³ mol) de yodato de potasio y 0.86 g (3.38x10⁻³ mol) de yodo. La reacción se dejó en agitación a 120°C por 24 h. Posteriormente, se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente y se le adicionó una solución de sulfito de sodio al 20% hasta observar un cambio de color café a amarillo claro. El producto de la reacción fue precipitado en agua y disuelto en una mezcla de hexanos:CH₂Cl₂ (8:2). Se obtuvieron 3.88 g (88 %) de un sólido blanco con **p.f.** 65-67°C. **RMN** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.27 (s, 1H, H6-Ar), 6.98 (s, 1H, H3), 3.94 (m, 4H, -CH₂-α-O-), 1.79 (q, 4H, -CH₂-β-O-), 1.48 (m, 4H, -CH₂-γ-O-), 1.26 (s, 32H, -CH₂-), 0.88 (t, 6H, -CH₃). **RMN** ¹³**C** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 152.63 (C4), 150.51 (C1), 124.31 (C6), 117.15 (C3), 112.61 (C2), 84.88 (C5), 70.45 y 70.40 (-C-α-O-), 32.03 (-C-β-CH₃), 29.76- 29.40 (-<u>C</u>H₂-), 29.26 y 29.22(-C-β-O-), 26.13 y 26.03 (-C-γ-O-), 22.80 (-C-α-CH₃), 14.23 (-<u>C</u>H₃).



6.3.4 Síntesis de 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno (5)

En un matraz balón de 500 mL, se colocaron 46 mL de ácido acético, 3.5 mL de agua, 0.5 mL de H_2SO_4 , 5 g (0.0112 mol) del compuesto (2), 0.96 g de KIO₃ (4.49x10⁻³ mol) y 2.8412 g de I₂ (0.0112 mol). Al matraz de reacción se le adaptó un refrigerante con una trampa para burbujear los vapores de yoduro de hidrógeno en agua. La mezcla de reacción se mantuvo en reflujo (120 °C) y agitación por 24 h. Transcurrido este tiempo, se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se le adicionó una solución de sulfito de sodio al 20% hasta obtener un cambio de color de café a amarillo claro. El producto de la reacción fue precipitado en agua y disuelto en una mezcla de hexanos:CH₂Cl₂ (8:2). Obteniéndose 5.94 g (76 %) de hojuelas blancas de 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno (5) con un p.f. 67-68°C. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.17 (s, 2H, Ar), 3.92 (t, 4H, -CH₂- α -O-), 1.79 (q, 4H, -CH₂- β -O-), 1.49 (q, 4H, -CH₂- γ -O-), 1.27 (s, 32H, -CH₂-), 0.88 (t, 6H, -CH₃). RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 152.97 (C1, C4), 122.89 (C3, C6), 86.41 (C2, C5), 70.45 (-C- α -O-), 32.04 (-C- β -CH₃), 29.77- 29.40 (-<u>C</u>H₂-), 29.27 (-C- β -O-), 26.15 (-C- γ -O-), 22.81 (-C- α -CH₃), 14.25 (-<u>C</u>H₃).

6.3.5 Síntesis de 4-Yodobenzoato de bencilo (7)



En un matraz de dos bocas se colocaron 5 g (0.0202 mol) de ácido p-yodobenzoico (6), 40 mL de CH_2Cl_2 y un agitador magnético. Al matraz se le adaptó una trampa de humedad y se le adicionó 0.1 g (8.19x10⁴ mol) de dimetilaminopiridina y 2.18 g (2.12 mL, 0.0202 mol) de alcohol bencílico. La mezcla se agitó vigorosamente para disolver los reactivos. Posteriormente, el matraz fue colocado en un baño frío (0 °C) y se le adicionó gota a gota 4.16 g (0.0202 mol) de diciclohexilcarbodiimida (DCC) disuelta en DMF. La reacción se dejó a temperatura ambiente durante 16 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se filtró para separar el sólido formado y luego se le evaporó el solvente. El residuo se disolvió en CH_2Cl_2 y se lavó tres veces con una solución de HCl 1 N. La fase acuosa se desechó y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄. El producto fue purificado por cromatografia en columna. Se obtuvieron 4.73 g (69 %) de 4-Yodobenzoato de bencilo (7) con un p.f. 66-67°C. Rf= 0.78 (2:8, hexanos:CH₂Cl₂) RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.79 (s, 4H, Ar), 7.48-7.36 (m, 5H, Bz), 5.37 (s, 2H, -CH₂-). RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 166.02 (-C=O), 137.87 (C3, C5), 135.91 (-CH₂-C[Bz]), 131.28 (C2, C6), 129.70 (C1), 128.80-128.40 (C-Bz), 101.11 (C4), 67.09 (-CH₂-).

6.3.6 Procedimiento general para el acoplamiento de Sonogashira-Heck

En un matraz de 250 mL de 2 bocas (matraz de reacción), se coloca un agitador magnético y se adapta una llave para gas y un septum. Se remueve el aire del matraz con un ciclo vacío-N₂. Con una cánula se transfiere TEA y THF destilados, y se desgasifica con 3 ciclos continuos vacío-N₂. Una parte de los solventes, ya desgasificados, se transfiere a los matraces que contienen los compuestos a acoplar para disolverlos. Después de ello, al matraz de reacción se le adiciona una mezcla de catalizadores (diclorobis(trifenil) fosfina paladio II y yoduro de cobre), seguido del compuesto halogenado y se calienta por 10 min o se enfría a 0°C, según sea el caso. Por último, se agrega el compuesto acetilénico. La reacción se deja en atmósfera inerte, con agitación y calentamiento o a temperatura ambiente durante 18 h. Transcurrido este lapso de tiempo, se filtra para eliminar la sal de amonio y ésta se lava con THF, solvente que posteriormente se elimina del filtrado por evaporación. El producto crudo es purificado por cromatografía en columna empacada con sílica gel.

6.3.7 Síntesis de 4-[(trimetilsilil)etinilen] benzoato de bencilo (8)



Aplicando el procedimiento descrito en la sección 6.3.6, en el matraz de reacción se desgasificó una mezcla de TEA/THF destilados (15 mL/5 mL). Se adicionaron 0.1557 g (2.22X10⁴ mol) de diclorobis(trifenil) fosfina paladio II y 0.0211 g ($1.11x10^4$ mol) de yoduro de cobre. El matraz se colocó en un baño frío, después se añadió 2.5 g ($7.39x10^{-3}$ mol) del compuesto (**7**) disuelto en TEA/THF, se dejó en agitación por 10 min y enseguida se burbujeó 0.7262 g (1.05 mL, $7.39x10^{-3}$ mol) de trimetilsilil acetileno en la solución. El 4-[(trimetilsilil)etinilen] benzoato de bencilo (**8**) fue purificado por cromatografía en columna utilizando como eluente una mezcla de hexanos:CHCl₃ (3:7) y obteniéndose 1.58 g (69 %). **Rf**= 0.6 (3:7, hexanos:CHCl₃). **RMN** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.03 (d, 2H, H-Ar), 7.54 (d, 2H, H-Ar), 7.48-7.32 (m, 5H, Bz), 5.37 (s, 2H, -CH₂-), 0.30 (s, 9H, (CH₃)₃-Si). **RMN** ¹³**C** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 165.91 (-C=O), 136.02 (-CH₂-<u>C</u>[Bz]), 132.02 (C3, C5), 129.84 (C1), 128.74-128.39 (Bz), 129.64 (C2, C6), 128.05 (C4), 104.28 y 97.89 (-C=C-), 66.97 (-CH₂-), -0.02 ((<u>CH₃)₃-Si</u>).

6.3.8 Síntesis de 4-Etinilbenzoato de bencilo (9)



En un matraz de 100 ml de una boca, se disolvieron 2 g (6.48×10^{-3} mol) del compuesto (8) en 20 mL de THF, se agregaron 3 gotas de agua destilada y 0.903 g (1 mL, 3.45×10^{-3} mol) de fluoruro de tetrabutilamonio. La reacción se dejó a temperatura ambiente y con agitación durante 20 min. Posteriormente, la solución del matraz se pasó por un tapón de sílica gel usando THF como eluente, el cual posteriormente fue eliminado por rotaevaporación. Se obtuvieron 1.48 g (97 %) de un líquido viscoso de color café obscuro. **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.03 (d, 2H, H-Ar), 7.55 (d, 2H, H-Ar), 7.47-7.33 (m, 5H, Bz), 5.37 (s, 2H, -CH₂-), 3.27 (s, 1H, H-=). **RMN** ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 165.84 (-C=O), 135.95 (-CH₂-C[Bz]), 132.17 (C3, C5), 130.19 (C1), 129.70 (C2, C6), 128.74-128.39 (-Bz), 126.96 (C4), 82.91 y 80.30 (-C=C-), 67.04 (-CH₂-Bz).

6.3.9 Síntesis de 1-yodo-4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno (11)



A un matraz de dos bocas de 250 mL, se le adaptó un refrigerante rosario con una trampa de humedad, se disolvieron 2 g (9.09 $\times 10^{-3}$ mol) de 4-yodofenol (**10**) en 8 mL de DMF. A esta solución se le añadió 0.5454 g (0.0136 mol) de NaOH y 1.66 g (1.36 mL, 9.09 $\times 10^{-3}$ mol) de 1-Bromo-2-(2-metoxi-etoxi)-Etano. La reacción se dejó bajo calentamiento (120-130 °C) y agitación durante 16 h. Posteriormente, se permitió que la mezcla de reacción alcanzara la

temperatura ambiente y se le adicionaron 10 mL de agua fría para disolver las sales de bromuro de sodio formadas. Después se realizaron extracciones con CH₂Cl₂. El producto en bruto resultante al evaporar el CH₂Cl₂, se pasó por una columna empacada con sílica gel. Se obtuvieron 1.93 g (66 %) de un líquido de color rosado. **Rf**= 0.78 (9:1, hexanos:CH₂Cl₂) **RMN** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.26 (d, 2H, H2, H6), 6.42 (d, 2H, H3, H5), 3.76 (t, 2H, -CH₂- α -O-Ar), 3.53 (t, 2H, -CH₂- β -O-Ar), 3.40 (t, 2H, -CH₂- β -O-CH₃), 3.27 (t, 2H, -CH₂- α -O-CH₃), 3.09 (s, 3H, CH₃-O-). **RMN** ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 83.02 (C1), 138.09 (C2, C6), 117.08 (C3, C5), 158.65 (C4), 71.88 (<u>C</u>- α -O-CH₃), 69.50 (<u>C</u>- β -O-CH₃), 67.46 (C- β -O-Ar), 70.62 (C- α -O-Ar). 58.95 (-<u>C</u>H₃)

6.3.10 Síntesis de 4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-trimetilsililetinilenbenceno (12)



Las condiciones de reacción se describen en 6.3.6, en el matraz de reacción se desgasificó una mezcla de TEA/THF destilados (15 mL/5 mL). Se adicionaron 0.1307 g ($1.86X10^{-4}$ mol) de diclorobis(trifenil) fosfina paladio II y 0.0177 g ($9.31x10^{-5}$ mol) de yoduro de cobre. El matraz se colocó en un baño frío, después se añadió 2.0 g ($6.21x10^{-3}$ mol) del compuesto (11) disuelto en TEA/THF, se dejó en agitación por 10 min y enseguida se burbujearon en la solución 0.6098 g (0.88 mL, $6.21x10^{-3}$ mol) de trimetilsilil acetileno. El producto fue purificado por cromatografía en columna. Se obtuvieron 1.13 g (62 %). **Rf**= 0.5 (CHCl₃). **RMN** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.35 (d, 2H, H2, H6), 6.78 (d, 2H, H3, H5), 4.07 (t, 2H, -CH₂- α -O-Ar), 3.81 (t, 2H, -CH₂- β -O-Ar), 3.66 (t, 2H, -CH₂- β -O-CH₃), 3.52 (t, 2H, -CH₂- α -O-CH₃), 3.34 (s, 3H, CH₃-O-), 0.2 (s, 9H, (CH₃)₃-Si). **RMN** ¹³**C** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 115.38 (C1), 133.38 (C2, C6), 114.46 (C3, C5), 158.97 (C4), 105.32 y 92.32 (C=C),71.88 (C- α -O-CH₃), 70.63 (C- α -O-Ar), 69.56 (C- β -O-CH₃), 67.35 (C- β -O-Ar), 58.91 (-CH₃), -0.12 ((CH₃)₃-Si).

6.3.11 Síntesis de 1-Etinilen-4-[2(-2- metoxi-etoxi)-etoxi] benceno (13)



En un matraz balón de 100 mL fueron disueltos 0.98 g (1 mL, 3.35×10^{-3} mol) del compuesto (12) en 8 mL de THF, se agregaron 3 gotas de agua destilada y 0.903 g (1 mL, 3.45×10^{-3} mol) de fluoruro de tetrabutilamonio. La reacción se realizó a temperatura ambiente y con agitación durante 20 min. Posteriormente, la solución del matraz se pasó por un tapón de sílica gel seca usando THF como eluente, el cual posteriormente fue eliminado por rotaevaporación. Se obtuvieron 0.67 g (91 %) de un líquido viscoso de color café obscuro. **RMN** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.33 (d, 2H, H2, H6), 6.77 (d, 2H, H3, H5), 4.03 (t, 2H, -CH₂- α -O-Ar), 3.75 (t, 2H, -CH₂- β -O-Ar), 3.62 (t, 2H, -CH₂- β -O-CH₃), 3.48 (t, 2H, -CH₂- α -O-CH₃), 3.30 (s, 3H, CH₃-O-), 2.97 (s, 1H, H-=). **RMN** ¹³**C** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 114.32 (C1), 133.49 (C2, C6), 114.59 (C3, C5), 159.15 (C4), 83.69 y 76.39 (C=C), 71.86 (C- α -O-CH₃), 70.65 (C- α -O-Ar), 69.52 (C- β -O-CH₃), 67.40 (C- β -O-Ar), 58.90 (-<u>C</u>H₃).

6.4. Síntesis de oligómeros.

6.4.1 Síntesis del trímero fenilenetinileno con terminaciones bencil éster (oFE3Bz2)



Siguiendo el procedimiento general para el acoplamiento de Sonogashira-Heck, en el matraz de reacción se desgasificaron 15 mL de TEA y 10 mL de THF destilados. Después, se adicionaron 0.015 g (2.15×10^{-5} mol) de diclorobis(trifenil)fosfina paladio II y 4.09×10^{-3} g (2.15×10^{-5} mol) de

yoduro de cobre. Posteriormente, el matraz fue colocado en un baño de hielo y se le añadió 0.5 g (7.16x10⁻⁴ mol) de 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno disuelto en TEA/THF. La solución se dejó en agitación durante 10 min. Por último, se adicionó 0.34 g (1.43X10⁻³ mol) de 4-etinilbenzoato de bencilo disuelto en TEA/THF. La reacción se dejó a temperatura ambiente por 18 h. El producto fue purificado por cromatografía en columna usando como solvente una mezcla de hexanos:CH₂Cl₂ (5:5). Se obtuvieron 0.57 (87%)g del trímero oFE3Bz2 con un **punto de fusión** de 105-106°C. **Rf**= 0.38 (5:5, hexanos:CH₂Cl₂). **RMN** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.07 (d, 4H, H2, H6, H15, H17), 7.59 (d, 4H, H3, H5, H14, H18), 7.47-7.33 (m, 10H, Bz), 7.03 (s, 2H, H8, H11), 5.38 (s, 4H, -CH₂-Bz), 4.04 (t, 4H, -CH₂-α-O-), 1.86 (q, 4H, -CH₂-β-O-), 1.55 (q, 4H, -CH₂-γ-O-), 1.24 (s, 32H, -CH₂-), 0.88 (t, 6H, -CH₃). **RMN** ¹³**C** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 165.96 (C=O), 153.90 (C9, C12), 136.01 (-CH₂-<u>C</u>[Bz]), 131.56 (C3, C5, C14, C18), 129.75 (C2, C6, C15, C17), 129.54 (C1, C16), 128.73 (C4, C13), 128.43-128.34 (Bz), 116.94 (C8, C11), 114 (C7, C10), 94.42 y 89.14 (-C=), 69.69 (C-α-O), 66.98 (-<u>C</u>H₂-Bz), 32.02 (<u>C</u>-β-CH₃), 29.74-29.41 (-CH₂-, C-β-O), 26.16 (C-γ-O), 22.80 (C-α-CH₃), 14.24 (-<u>C</u>H₃). **UV** (DMF): λ_{max} = **320** nm, ε = 61.29 Lg⁻¹cm⁻¹.

6.4.2 Procedimiento general para la desprotección de grupos carboxilo

En un matraz de 100 mL de una boca, se coloca bajo atmósfera inerte, un agitador magnético y el compuesto a desproteger. Con una jeringa de vidrio, previamente purgada con nitrógeno, se adiciona tolueno seco y destilado para disolver el compuesto. Esta solución se desgasifica burbujeando nitrógeno durante 60 min. Después de este tiempo, se añade KOH en polvo y se coloca inmediatamente un refrigerante rosario. El matraz de reacción se calienta a ~111°C, se mantiene bajo atmósfera de nitrógeno y con agitación por 90 min. Posteriormente, se deja que la solución alcance la temperatura ambiente y se adiciona agua acidificada con HCl (pH=1) hasta la formación de un precipitado. El solvente se evapora, el agua se elimina del matraz y el sólido se redisuelve con THF o se realizan extracciones con CH₂Cl₂.



6.4.3 Síntesis del trímero fenilenetinileno con terminaciones carboxilo (oFE3COOH2)

Aplicando el método descrito en la sección 6.4.2, para la desprotección de grupos carboxilo, se disolvieron 0.18 g (1.94×10^{-4} mol) de **oFE3Bz2** en 15 mL de tolueno. Después de desgasificar, a esta solución se le adicionó 0.11 g (1.94×10^{-3} mol) de KOH y la reacción se dejó a reflujo por 90 min. y bajo atmósfera inerte. Después de este tiempo, se dejó que la solución alcanzara la temperatura ambiente y se le añadió agua acidificada hasta la formación de un precipitado. Luego, el solvente y el agua fueron removidos de la solución. El sólido formado fue disuelto en THF y reprecipitado en cloroformo en tres ocasiones. Se obtuvieron 0.1205 g (90.19%) de oFE3COOH2 con **p.f.** 245-246°C. **RMN** ¹**H** (300 MHz, THF-*d*₈) δ (ppm) 8.02 (d, 4H, H2, H6, H15, H17), 7.57 (d, 4H, H3, H5, H14, H18), 7.11 (s, 2H, H8, H11), 4.06 (t, 4H, -CH₂-α-O-), 1.85 (q, 4H, -CH₂-β-O-), 1.58 (q, 4H, -CH₂-γ-O-), 1.27 (s, 32H, -CH₂-), 0.88 (t, 6H, -CH₃). **RMN** ¹³**C** (300 MHz, THF-*d*₈) δ (ppm) 166.08 (C=O), 153.97 (C9, C12), 131.09 (C3, C5, C14, C18), 130.48 (C1, C16), 129.63 (C2, C6, C15, C17), 127.88 (C4, C13), 116.57 (C8, C11), 113.95 (C7, C10), 93.92 y 88.79 (C=C), 69.18 (C-α-O), 31.97 (C-β-CH₃), 29.77-29.42 (-CH₂-, C-β-O), 26.17 (C-γ-O), 22.66 (C-α-CH₃), 13.54 (-<u>C</u>H₃). **UV** (DMF): λ_{max} = 317 nm, ε = 68.78 Lg⁻¹cm⁻¹. **Fluorescencia**: λ_{max} = 408 nm.



6.4.4 Síntesis de difenil(2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil)fosfonato (17)

A un matraz de dos bocas de 250 mL, se le adaptó un embudo de adición y se le agregó 4.53 g (0.03 mol) de mercaptobenzoxazol (16) y 35 mL de benceno destilado. Luego se le adicionó 3.0357 g (4.2 mL, 0.03 mol) de TEA destilada y se dejó en agitación. Mientras tanto, en el embudo de adición se disolvieron 8.0592 g (6.2 mL, 0.03 mol) de clorofosfato de difenilo (15) en 10 mL de benceno, la solución resultante fue añadida al matraz gota a gota. La reacción se realizó en atmósfera inerte, a temperatura ambiente y con agitación durante 110 min. Posteriormente, la mezcla de reacción se pasó por una columna de cromatografía empacada con sílica gel, para eliminar las sales formadas, empleando como fase móvil una mezcla de hexanos: CH₂Cl₂ (2:8). Se obtuvieron 11.3 g de un líquido amarillo con alta viscosidad, el cual solidifica parcialmente con el tiempo. **RMN** ¹**H** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.65 (s, 1H, H-γ-N), 7.53 (d, 1H, H-β-O-), 7.43-7.21 (m, 10H, H-Ar[-OPO-]), 7.13 (m, 2H, H-γ-O y C-β-N-). **RMN** ¹³**C** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 160.08 (C=S), 152.50 (C-α-O-), 151.77 y 151.68 (C-Ar[-OPO-]), 141.86 (C-α-N-), 130.17 (C-*meta*-Ar[-OPO-]), 1126.18 (C-*para*-Ar[-OPO-]), 125.54 (C-γ-N), 125.08 (C-γ-O), 120.64 y 120.58 (C-*orto*-Ar[-OPO-]), 119.99 (C-β-N-), 111.14 (C-β-O-). **UV** (CH₃OH): λ_{max} =298 nm, ε = 64.70 Lg⁻¹ cm⁻¹ (2.5 x 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹).



6.4.5 Síntesis del trímero fenilenetinileno con terminaciones manosa (oFE3Man2)

En un matraz balón de 25 mL, se disolvieron 0.0754 g (1.03 x 10⁻⁴ mol) de oFE3COOH2 v 0.1179 (3.09 x 10⁻⁴ mol) g del agente activante (17) en 1.5 mL de N-metil-2-pirrolidinona (calentando ligeramente para ayudar a la disolución). Esta solución se dejó en agitación por 3 min. y después se agregaron 0.0208 g (28.44 µL, 2.06 x 10⁻⁴ mol) de TEA destilada. Por último se adicionaron 0.0557 g (2.06 x 10^4 mol) de 4-Aminofenil α -D-manopiranósida disuelta en 2 mL de N-metil-2-pirrolidinona. La reacción se realizó a temperatura ambiente y con agitación por 4 días. Transcurrido este periodo de tiempo, la solución del matraz se vertió en una mezcla etanol:agua (10:0.5), para precipitar el producto crudo, el sólido formado se recuperó por centrifugado. La purificación del oligómero oFE3Man2 se realizó disolviéndolo en N-metil-2pirrolidinona y reprecipitando en una mezcla etanol:agua (10:0.5) en dos ocasiones. Posteriormente se realizaron tres lavados con THF. Se obtuvieron 0.0979 g (76.87%). P.f. 245-246°C. **RMN** ¹H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 10.26 (s, 2H, NH), 8.01 (d, 4H, H2, H6, H15, H17), 7.66 (t, 8H, H3, H5, H14, H18 y 4H-meta-Ar[Man]), 7.23 (s, 2H, H8, H11), 7.09 (d, 4H, Horto-Ar[Man]), 5.33 (s, 2H, Hanomérico), 5.04 (d, 2H, HO-CH-), 4.85 (d, 2H, HO-CH-), 4.77 (d, 2H, <u>HO</u>-CH-), 4.49, (t, 2H, <u>HO</u>-CH₂-), 4.07 (s, 4H, -CH₂- α -O-), 3.82 (s, 2H, H2-Man), 1.75 (s, 4H, -CH₂- β -O-), 1.51 (s, 4H, -CH₂- γ -O-), 1.35 (s, 32H, -CH₂-), 0.79 (m, 6H, -CH₃). **RMN** ¹³C (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 164.78 (C=O), 153.84 (C9, C12), 153.28 (C-Ar[Man]), 135.22(C-Ar[NHCO]), 133.93 (C1, C6), 131.61 (C3, C5, C14, C18), 128.55 (C2, C6, C15, C17), 126.06 (C4, C13), 122.35 (C-meta-Ar[Man]), 117.57 (C-orto-Ar[Man]), 117.27 (C8, C11), 113.80 (C7, C10), 99.84 (Canomérico), 94.76 y 88.85 (C=C), 75.43 (C2-Man), 71.29 (C5-Man), 70.71 (C3-Man), 69.49 (C-α-O), 67.34 (C4-Man), 61.64 (C6-Man), 31.84 (C-β-CH₃), 29.66-29.42 (-CH₂-, C-β-O), 26.13 (C-γ-O), 22.64 (C-α-CH₃), 14.46 (-<u>C</u>H₃). UV (DMF): λ_{max}= 321 nm, ε = 142.11 Lg⁻¹cm⁻¹. Fluorescencia: λ_{max} = 420.5 nm.



6.4.6 Síntesis de 4[4-bromo-2,5-bis-(dodecanoxi)fenilenetinilen] benzoato de bencilo (14)

La reacción se realizó como se indica en la sección 6.3.6. En el matraz de reacción se desgasificaron TEA/THF (25/5 mL) y se adicionaron 0.0970 g (1.38×10^4 mol) de diclorobis(trifenil) fosfina paladio II y 0.0132 g (6.91×10^{-5} mol) de yoduro de cobre. El matraz se colocó en un baño frío, se le adiciono 3 g (4.60×10^{-3} mol) del compuesto (4) disuelto en TEA/THF y se dejó en agitación durante 10 min. Después se adicionaron 1.09 g (4.60×10^{-3} mol) del compuesto (9) disuelto en TEA/THF. El producto fue purificado por cromatografía en columna empleando como eluente una mezcla de hexanos:CH₂Cl₂ (6.5:3.5). Se obtuvieron 2.28 g (65%) de un sólido de color crema con **p.f.** 51-52°C. **Rf**=0.4. **RMN** ¹**H** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.06 (d, 2H, H2, H6), 7.58 (d, 2H, H3, H5), 7.47-7.33 (m, 5H, -Bz), 7.11 (s, 1H, H11), 7.02 (s, 1H, H8), 5.38 (s, 2H, -CH₂-Bz), 3.98 (t, 4H, -CH₂- α -O-), 1.82 (s, 4H, -CH₂- β -O-), 1.50 (s, 4H, -CH₂- γ -O-), 1.26 (d, 32H, -CH₂-), 0.89 (m, 6H, -CH₃). **RMN** ¹³**C** (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 165.94 (C=O), 154.45 (C12), 149.57 (C9), 136.03 (-CH₂-**C**[Bz]), 131.49 (C3, C5), 129.74 (C2, C6), 129.48 (C1), 128.73-128.34 (C4, Bz), 118.02 (C8), 117.58 (C11), 114.14 (C10), 112.04 (C7), 93.32 y 88.75 (C=C), 70.19 y 69.87 (C- α -O), 66.97 (-<u>C</u>H₂-Bz), 32.05 (C- β -CH₃), 29.77-29.30 (-<u>C</u>H₂-C, C- β -O), 26.10 (C- γ -O), 22.82 (C- α -CH₃), 14.25 (-<u>C</u>H₃).



6.4.7 Síntesis del trímero fenilenetinileno con terminaciones glicol bencil éster (oFE3GBz)

En base al método general de acoplamiento descrito en la sección 6.3.6, en el matraz de dos bocas se desgasificaron 20 mL de TEA destilada. Se adicionaron 0.0166 g (2.37x10⁻⁵ mol) de diclorobis(trifenil)fosfina paladio II y 2.26x10⁻³ g (1.18x10⁻⁵ mol) de yoduro de cobre. Luego se agregaron 0.6 g $(7.9 \times 10^{-4} \text{ moles})$ de (14) disuelto en TEA desgasificada. Esta mezcla fue calentada a ~70 °C por 10 min. Finalmente, 0.1739 g (7.9x10⁴ moles) de (13), disuelto en TEA, fueron adicionados al matraz de reacción. La reacción se dejó a una temperatura de 60-70 °C durante 18 h. El producto crudo, libre de sales, se purifica por cromatografía en columna (eluente CH₂Cl₂), obteniéndose 0.4950 g (69.72 %) del trímero oFE3GBz, el cual presenta un punto de fusión de 55-57°C. Rf= 0.38 (CH₂Cl₂). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.04 (d, 2H, H2, H6), 7.57 (d, 2H, H3, H5), 7.49-7.31 (m, 7H, H14, H18 y Bz), 6.99 (s, 2H, H8, H11), 6.88 (d, 2H, H15, H17), 5.36 (s, 2H, -CH2-Bz), 4.15 (t, 2H, (-CH2-a-O-Ar), 4.02 (t, 4H, -CH2-a-O-), 3.86 (t, 2H, -CH₂-β-O-Ar), 3.72 (t, 2H, -CH₂-α-O-CH₃), 3.58 (t, 2H, -CH₂-β-O-CH₃), 3.39 (s, 3H, CH₃-O-), 1.84 (q, 4H, -CH₂-β-O-), 1.53 (q, 4H, -CH₂-γ-O-), 1.24 (s, 32H, -CH₂-), 0.87 (t, 6H, -CH₃). **RMN** ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 165.89 (C=O), 159.01 (C-Ar[O-((CH₂)₂-O)₂-CH₃]), 153.98 (C12), 153.49 (C9), 136.03 ((-CH₂-C[Bz]), 133.16 (C14, C18), 131.51 (C3, C5), 129.74 (C2, C6), 129.37 (C1), 128.70-128.30 (C4, Bz), 116.99 (C8), 116.73 (C11), 115.79 (10), 115.24 (C7), 114.73 (C15, C17), 112.83 (C13), 95.46-84.82 (C=C) , 72.05 (<u>C</u>-α-O-CH₃) 70.89 (C-α-O-Ar), 69.58 (<u>C</u>-β-O-CH₃), 67.52 (C-β-O-Ar), 69.70 (C-α-O), 66.93 (-<u>C</u>H₂-Bz), 59.15 (<u>C</u>H₃-O), 32.04 (C-β-CH₃), 29.77-29.30 (-<u>C</u>H₂-, C-β-O), 26.19 (C-γ-O), 22.82 (C-α-CH₃), 14.26 (-<u>C</u>H₃). **UV** (DMF): λ_{max} = 378.5 nm, ε = 42.28Lg⁻¹cm⁻¹.

6.4.8 Síntesis del trímero fenilenetinileno con terminaciones glicol carboxilo (oFE3GCOOH)



De acuerdo al método para desproteger grupos carboxilo, sección 6.4.2, en el matraz se disolvieron 0.1319 g (1.47x10⁴ mol) de oFEGBz en 10 mL de tolueno. Posteriormente, se adicionaron 0.0411 g (7.33 $\times 10^4$ mol) de KOH (previamente secado en el liofilizador). Después del tiempo de reacción y de acidificar la solución, se eliminó el tolueno y se realizaron tres extracciones con CH2Cl2 a la fase acuosa resultante. El solvente de la fase orgánica fue evaporado y el sólido obtenido fue purificado por cromatografía en columna, empacada con sílica gel, utilizando una mezcla de CHCl₃:CH₃OH (9.8:0.2). Se obtuvieron 0.1031 g (86.90%) de oFE3GCOOH. P.f. 87-89°C. Rf= 0.33 (9.8:0.2, CHCl₃:CH₃OH). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.07 (d, 2H, H2, H6), 7.60 (d, 2H, H3, H5), 7.50 (d, 2H, H14, H18), 7.00 (s, 2H, H8, H11), 6.88 (d, 2H, H15, H17), 4.14 (t, 2H, -CH₂-α-O-Ar), 4.01 (t, 4H, -CH₂-α-O-), 3.86 (t, 2H, -CH₂-β-O-Ar), 3.73 (t, 2H, $-CH_2-\alpha-O-CH_3$), 3.58 (t, 2H, $-CH_2-\beta-O-CH_3$), 3.40 (s, 3H, CH_3-O-), 1.84 (q, 4H, -CH₂- β -O-), 1.51 (q, 4H, -CH₂- γ -O-), 1.24 (s, 32H, -CH₂-), 0.84 (t, 6H, -CH₃). RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 158.99 (<u>C</u>-Ar[O-((CH₂)₂-O)₂-CH₃]), 154.05 (C12), 153.50 (C9), 133.16 (C3, C5, C14, C18), 131.57 (C2, C6), 130.23 (C1), 129.25 (C4), 117.10 (C8), 116.80 (C11), 115.79 (C10), 115.34 (C7), 114.72 (C15, C17), 112.83 (C13), 95.48-84.73 (C≡C), 72.09 (C-α-O-CH₃) 70.85 (C-α-O-Ar), 69.76 (C-α-O), 69.67 (C-β-O-CH₃), 67.53 (C-β-O-Ar), 59.13 (CH₃-O), 32.00 (C-β-CH₃), 29.79-29.46 (-CH₂-, C-β-O), 26.16 (C-γ-O), 22.80 (C-α-CH₃), 14.20

(-<u>C</u>H₃). UV (DMF): λ_{max} = 375 nm, ε = 47.81 Lg⁻¹cm⁻¹. Fluorescencia: λ_{max} = 391 nm.



6.4.9 Síntesis del trímero fenilenetinileno con terminaciones glicol manosa (oFE3GMan)

En un matraz balón de 25 mL se colocó un agitador magnético. 0.07 g (8.65 x 10⁻⁵ mol) de oFE3GCOOH, 0.0498 g (1.30 x 10⁴ mol) del agente activante (17) y 1.5 mL de N-metil-2pirrolidinona. Esta solución se dejó en agitación por 5 min. para disolver los primeros dos compuestos y después se agregaron 8.75 x 10^{-3} g (12 µL, 8.65 x 10^{-5} mol) de TEA destilada. Por último se adicionaron 0.0235 g (8.65 x 10^{-5} mol) de 4-Aminofenil α -D-manopiranósida disuelta en 1.5 mL de N-metil-2-pirrolidinona. La reacción se realizó a temperatura ambiente y con agitación por 4 días. Transcurrido este periodo de tiempo, la solución del matraz se vertió en una mezcla etanol:agua (3:7) para precipitar el producto crudo, se dejó en agitación por 20 minutos y el sólido formado se recuperó por centrifugado. La purificación del oligómero oFE3GMan se realizó por cromatografía en columna empleando como eluente una mezcla de CHCl₃:CH₃OH (8.5:1.5). Se obtuvieron 0.07 g (75 %). P.f. 171-173°C. Rf= 0.55 (8.5:1.5, CHCl₃:CH₃OH). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) 10.25 (s, 1H, NH), 8.00 (d, 2H, H2, H6), 7.68 (d, 2H, H-meta-ArMan), 7.62 (d, 2H, H3, H5), 7.42 (d, 2H, H14, H18), 7.15 (s, H, H8), 7.12 (s, 1H, H11), 7.08 (d, 2H, H-orto-ArMan), 6.98 (d, 2H, H15, H17), 5.33 (s, 1H, H_{anomérico}), 5.04 (d, 1H, HO-CH-), 4.86 (d, 1H, HO-CH-), 4.78 (d, 1H, HO-CH-), 4.49, (t, 1H, HO-CH₂-), 4.11 (t, 2H, -CH₂-α-O-Ar), 4.02 (d, 4H, -CH₂-α-O-), 3.83 (s, 1H, H2-Man), 3.73 (t, 2H, -CH₂-β-O-Ar), 1.73 (s, 4H, -CH₂-β-O-), 1.48 (s, 4H, -CH₂-γ-O-), 1.18 (d, 32H, -CH₂-), 0.8 (m, 6H, -CH₃). δ (ppm) RMN ¹³C (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 164.17 (C=O), 159.41 (C-Ar[O-((CH₂)₂-O)₂-CH₃]), 153.85 (C12), 153.45 (C9), 153.24, (C-Ar[O-Man], 135.09 (C-Ar[NHCO]), 133.93 (C1), 133.30 (C14, C18), 131.56 (C3, C5), 128.54 (C2, C6), 126.15 (C4), 122.32 (C-meta-Ar[Man]), 117.54 (C-orto-Ar[Man]), 117.09 (C8), 116.89 (C11), 115.44 (C15, C17), 115.13 (C7), 114.74 (C10), 112.70 (C13), 99.76 (Canomérico), 95.69-85.35 (C=C), 75.43 (C2-Man), 71.85 (<u>C</u>-α-O-CH₃), 71.26 (C5-Man), 70.69 (C3-Man), 70.30 (C-α-O-Ar), 69.37 (C-α-O, C-β-O-CH₃), 67.88 (C-β-O-Ar), 67.27 (C4-Man), 61.59 (C6-Man), 58.63 (<u>C</u>H₃-O), 31.88 (C-β-CH₃), 29.68-29.32 (-<u>C</u>H₂-, C-β-O), 26.13 (C-γ-O), 22.68 (C-α-CH₃), 14.51 (-<u>C</u>H₃). **UV** (DMF): λ_{max} = 376 nm, ε= 81 Lg⁻¹cm⁻¹. Fluorescencia: λ_{max} = 424 nm.

6.5 Pruebas preeliminares de reconocimiento bacteriano

6.5.1 Condiciones de cultivo.

El cultivo de *Escherichia coli* de tipo uropatógeno fue proporcionado por el Laboratorio de Análisis Clínicos Especializados de Saltillo, S. A. de C. V. (Saltillo, Coah., México). Con el fin de estimular la producción de fimbrias, la bacteria fue inoculada en 75 mL de caldo Luria e incubada bajo condiciones estáticas a 37°C por 48 h. Posteriormente se realizó una segunda inoculación, en la cual 2 mL del cultivo anterior fueron adicionados a otros 75 mL de caldo Luria, se dejó que las bacterias crecieran bajo las condiciones ya mencionadas.³⁰ Al término del segundo periodo de incubación, 15 mL del cultivo fueron centrifugados a 13000 rpm por 3 min., el paquete de células así formado fue resuspendido en 15 mL de una solución de buffer fosfatos salino (PBS) a pH 7.2 y centrifugado de nuevo. Este procedimiento se realizó 3 veces y la biomasa fue resuspendida finalmente en 5 mL de PBS. Para verificar la dispersión de las bacterias se colocó una gota de la solución sobre un portaobjetos utilizando un asa de platino y la muestra fue observada al microscopio. La solución fue agitada hasta que ya no se observaron aglomerados celulares en las muestras preparadas.

La preparación del caldo Luria consistió en disolver 750 mg de Bacto peptona, 380 mg de extracto de levadura, 750 mg de NaCl, 75 mg de glucosa y 75 mg de MgCl₂•6H₂O en 75 mL de agua destilada contenida en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y esterilizar la solución obtenida a 121 °C por 30 min. Cabe hacer énfasis que todo el material empleado durante el manejo de bacterias fue previamente esterilizado a 121° durante 15 min.

6.5.2. Reconocimiento bacteriano mediante el uso de los oligómeros oFE3GMan y oFE3Man2

Los oligómeros oFE3GMan y oFE3Man2 fueron disueltos en dimetilformamida (DMF) a una concentración de 1 gL⁻¹. Se preparó un blanco para cada oligómero y un blanco que solo contenía células de *E. coli*. Los ensayos se realizaron en tubos de cultivo, en los cuales se colocaron 3 ml de PBS y posteriormente se adicionaron 40 μ L de la bacteria, se verificó la dispersión de las células bacterianas empleando el método descrito en el apartado **6.5.1**. Después se añadieron 90 y 60 μ L del oligómero, se homogeneizó la solución con agitación, se incubó a 37°C y se dejó agitando a 250 rpm por 40 min. Transcurrido este lapso de tiempo, el control bacteriano fue agitado hasta asegurar la desintegración de los agregados celulares que pudieron haberse formado, con el fin de verificar que esto ocurriera se tomó una muestra y se observó en el microscopio. El tiempo de agitación al que fue sometida la solución y en el cual ya no se observaron aglomerados celulares fue de 10 s. El resto de las soluciones también fueron sometidas al mismo periodo de agitación. Con el propósito de visualizar con mayor facilidad a la bacteria, a partir de estas soluciones se prepararon algunos frotis que fueron sometidos a una tinción de Gram (ver **Apéndice**).

Por último, las células fueron centrifugadas (9000 rpm X 10 min) y lavadas con 3 ml de una solución de PBS-DMF (60 μ L) en dos ocasiones. El paquete de células fue finalmente resuspendido en 3 ml de PBS y agitado por 30 s. Con un asa de platino se prepararon muestras para observarlas por microscopía óptica y por microscopía láser confocal. Mientras que las soluciones fueron caracterizadas por fluorescencia.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Síntesis de monómeros

7.1.1 Rutas de síntesis

La ruta de síntesis de los monómeros necesarios para preparar los oligómeros de tipo fenilenetinileno se presenta en las **figuras 7.1**, **7.2** y **7.3**. Los mecanismos de reacción correspondientes a cada etapa se encuentran descritos en la sección **7.1.2**.



Figura 7.1 Ruta de síntesis de los monómeros 1-Bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4-yodobenceno 4 y 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno 5. ^{*a*} $C_{12}H_{25}Br/NaOH/DMF$, 120-130 °C, 16h. ^{*b*} CCl₄, Br₂, reflujo, 14 h. ^{*c*} (i) CH₃COOH/H₂O/H₂SO₄, KIO₃, I₂, reflujo, 24 h.

La ruta de síntesis del monómero 4 se presenta en la **figura 7.1** e inicia con la doble alquilación de la hidroquinona 1 con 1-bromododecano en medio alcalino formándose así el 1,4-bis(dodecanoxi)benceno 2, reacción a la que se le conoce como alquilación de Williamson. Posteriormente, el compuesto 2 se hace reaccionar con un equivalente de bromo en tetracloruro

de carbono para obtener el compuesto monohalogenado 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)benceno **3.** Este último compuesto es sometido a una reacción de yodación, en la cual se emplea yodo molecular, KIO₃ como agente oxidante y se lleva a cabo en medio ácido, de esta manera se obtiene el compuesto dihalogenado 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4-yodobenceno **4**. La síntesis de 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno **5** también se muestra en la **figura 7.1** y consiste en realizar una doble sustitución de yodo en las posiciones orto a ambos grupos dodecanoxi del compuesto **2**, el procedimiento para prepararlo es similar al descrito para el compuesto **4**.

La figura 7.2 muestra la ruta sintética de 4-etinilbenzoato de bencilo 9. La síntesis de esta molécula comienza con una reacción de esterificación (conocida como de Steglich) del ácido 4yodobenzoico con el alcohol bencílico en presencia de diciclohexilcarbodiimida DCC como agente activante, dimetilaminopiridina DMAP como catalizador y cloruro de metileno como disolvente. De este modo se obtiene el 4-yodobenzoato de bencilo 7.



Figura 7.2 Ruta de síntesis del monómero 4-etinilbenzoato de bencilo 9. ^{*a*} CH₂Cl₂, DMAP, C₆H₅CH₂OH, DCC/DMF, 0 °C, 16 h. ^{*b*} TEA/THF, diclorobis(trifenil)fosfina paladio II, CuI, (CH₃)₃SiCCH, temperatura ambiente, 18 h, N₂. ^{*c*} THF/H₂O/FTBA.

La preparación del 4-[(trimetilsilil)etinilen]benzoato de bencilo 8 se realiza a través de la reacción de acoplamiento de Sonogashira-Heck entre el producto 7 y un equivalente de trimetilsilil acetileno. Finalmente, el compuesto 9 se obtiene mediante una reacción rápida y sencilla, en la cual el grupo acetileno es desprotegido empleando fluoruro de tetrabutilamonio (FTBA).

El 1-etinilen-4-[2(-2- metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13 es preparado a partir del 4-yodofenol (Figura 7.3), el cual se hace reaccionar en un medio básico con el 1-bromo-2-(2-metoxi-etoxi)etano obteniendo de esta manera el compuesto 11. A este último compuesto se le acopla un equivalente de trimetilsilil acetileno dando como resultado la molécula **12**, la que por último y con el objetivo de obtener el compuesto **13** es desprotegida usando FTBA.



Figura 7.3 Ruta de síntesis del monómero 1-etinilen-4-[2(-2- metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13. ^{*a*} CH₃(O (CH₂)₂)₂Br/NaOH/DMF, 120-130 °C, 16h. ^{*b*} TEA/THF, diclorobis(trifenil)fosfina paladio II, CuI, (CH₃)₃SiCCH, temperatura ambiente, 18 h, N₂. ^{*c*} THF/H₂O/FTBA.

7.1.2 Mecanismos de reacción

7.1.2.1 Síntesis de Williamson

La alquilación de Williamson (**Figura 7.4**) es una reacción que implica la formación inicial de grupos fenolato mediante el tratamiento de hidroquinona con hidróxido de sodio. Posteriormente, ocurre la alquilación a través de una sustitución nucleofílica, que genera en este caso, una molécula simétrica doblemente alquilada.³¹



Figura 7.4 Mecanismo de reacción involucrado en la alquilación de Williamson.

La síntesis de 1-yodo-4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 11 ocurre bajo un mecanismo de reacción similar al ya descrito.

7.1.2.2 Sustitución electrofílica aromática

La bromación de 2 (figura 7.5) se realiza mediante una reacción de sustitución electrofílica aromática.³² El bromo molecular reacciona rápidamente, sin la necesidad de emplear un catalizador, debido a que los grupos electrón donadores como lo es el grupo dodecanoxi, activan al anillo aromático y además orientan la sustitución en las posiciones *orto* y *para*.



Figura 7.5 Mecanismo de reacción para la formación de 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)benceno 3.

La yodación de compuestos aromáticos también procede a través de un mecanismo de sustitución electrofílica. Sin embargo a diferencia de la bromación y debido a que el yodo es el elemento con menor reactividad dentro del grupo de los halógenos, es necesario transformarlo en una especie electrófila adecuada. En compuestos cuyo anillo aromático se encuentra activado por grupos funcionales como el grupo dodecanoxi, la sustitución se efectúa con especies electrófilas débiles

como el I^+ . La preparación del ion I^+ se realiza oxidando I_2 con KIO₃ en presencia de cantidades catalíticas de H₂SO₄, en medio ácido.³³ La sustitución del catión en el anillo bencénico ocurre de manera similar a la bromación (**figura7.6**).



7.1.2.3 Esterificación de Steglich

Para este estudio en particular, el grupo carboxilo del ácido p-aminoyodobenzoico es de gran importancia en la preparación de los compuestos finales, debido a la reactividad que le confiere el carbonilo es necesario realizar la protección del grupo carboxilo mediante su esterificación con alcohol bencílico, ya que durante la síntesis de los oligómeros del tipo fenilenetinileno, esta molécula participa en una o dos etapas intermedias, en las cuales puede sufrir reacciones de sustitución nucleofílica dando origen a compuestos no deseados.

La síntesis de ésteres a partir de ácidos carboxílicos y de alcoholes procede bajo condiciones de reacción suaves cuando se emplea una carbodiimida como agente activante. La esterificación del ácido *p*-yodobenzoico 6 con alcohol bencílico se lleva a cabo a bajas temperaturas, en presencia de un agente activante como la diciclohexilcarbodiimida DCC y de dimetilaminopiridina DMAP como catalizador.

El mecanismo de la reacción se presenta en la **figura 7.7** y empieza con la formación de Oacilisourea **EI-1**, una especie intermediaria que se genera a partir del ataque nucleofílico de los electrones no enlazados del grupo –OH del ácido carboxílico al carbono del agente activante. Posteriormente, la piridina **DMAP** reacciona con el grupo carbonilo de **EI-1** dando lugar a la formación de N-acilpiridinio **EI-2**, el cual es un segundo intermediario que finalmente reacciona con el grupo –OH del alcohol bencílico dando como producto final de la reacción 4yodobenzoato de bencilo 7 y la regeneración del catalizador.³⁴



Figura 7.7 Mecanismo de reacción para obtener el 4-yodobenzoato de bencilo 7.

7.1.2.4 Reacción general de acoplamiento de Sonogashira-Heck

El acoplamiento de acetilenos terminales a haluros de arilo es un proceso cíclico catalizado por el complejo diclorobis(trifenil)fosfina paladio II, así como por el yoduro de cobre. El mecanismo de reacción que se lleva a cabo comprende las siguientes etapas:

- Una primera etapa en la cual ocurre la reducción del complejo de paladio II a paladio cero por la acción catalítica del CuI: (PPh₃)₂Pd⁰Cl.
- Posteriormente, el haluro de arilo Ar-X se adiciona al complejo de paladio cerovalente causando su oxidación a paladio divalente: Ar-Pd²X(PPh₃)₂Cl.
- 3. En la siguiente etapa, el grupo -X es desplazado del complejo mediante un ataque nucleofílico promovido por el compuesto acetilénico.
- 4. Por último, mediante una eliminación reductiva se obtiene el arilenetinileno y se regenera el complejo de paladio cerovalente, el cual comienza un nuevo ciclo de acoplamiento.

7.1.2.5 Desprotección del grupo trimetilsililacetileno.

Para remover el grupo trimetilsilil que protege al grupo acetilénico de la molécula se emplea fluoruro de tetrabutilamonio $FNBu_4$ y THF como solvente. La afinidad electrónica que presenta el flúor por el silicio permite realizar esta reacción bajo condiciones suaves y de forma rápida. Cuando el flúor reacciona con el compuesto sililado se forma un fluorosiliconato, especie intermediaria de la cual posteriormente es eliminado el fluoruro de trimetilsililo y el nucleófilo resultante es estabilizado por el catión *t*-butilamonio ^{\oplus}NBu₄. La función acetilénica terminal es regenerada a partir de la protonación del nucleófilo con agua del medio de reacción (**figura 7.8**).

La alta reactividad que presenta el agua frente al fluoruro de trimetilsililo origina la formación de hidroxitrimetilsilano, ácido fluorhídrico HF y finalmente hexametildisiloxano. Siendo el HF capaz de promover *n* ciclos de desprotección de moléculas sililadas.



Figura 7.8 Mecanismo de reacción que se lleva a cabo durante la desprotección de grupos acetilenos. ^aBu₄NF/THF. ^bH₂O.

7.1.3 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear

En el presente estudio, las técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono (RMN ¹H y de ¹³C) fueron de gran utilidad para corroborar las estructuras químicas de los compuestos preparados en el laboratorio. Los espectros de RMN ¹H y de ¹³C obtenidos a partir de las moléculas sintetizadas se presentan agrupados con la intención de mostrar los cambios que van sucediendo a cada compuesto intermediario previo a la obtención de una molécula específica.

Por último, en la **tabla 7.1** se presentan los desplazamientos químicos (δ) de protones residuales y de ¹³C de los solventes deuterados ocupados para la caracterización por RMN. Así mismo se presentan sus multiplicidades entre paréntesis.

Solvente	Desplazamientos químicos δ (ppm)		
	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	
Cloroformo-d ₁	7.24 (1)	77 (3)	
Dimetilsulfoxido- d_{δ}	2.49(5)	39.5 (7)	
	3.3* H ₂ O		
Tetrahidrofurano-d ₈	3.58 (br)	67.4 (5)	
	1.73 (br)	25.3 (br)	

Tabla 7.1 Desplazamientos químicos de solventes deuterados.

*Estos valores pueden variar mucho dependiendo del soluto, la concentración y la temperatura.

7.1.3.1 Resonancia Magnética Nuclear ¹H

En esta sección se presenta el análisis de la información recabada a partir de los espectros de RMN ¹H de los compuestos involucrados en las rutas de síntesis de las figuras 7.1, 7.2 y 7.3. La figura 7.9 muestra de manera comparativa los espectros del reactivo hidroquinona 1 y de los compuestos 1,4-bis(dodecanoxi)benceno 2, 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)benceno 3, 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4-yodobenceno 4 y de 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno 5. Los espectros 4-yodobenzoico 7. del ácido 6, 4-yodobenzoato de bencilo 4-[(trimetilsilil)etinilen]benzoato de bencilo 8 y 4-etinilbenzoato de bencilo 9 se agrupan en la figura 7.10. Mientras que en la figura 7.11 se presentan los espectros correspondientes al 4yodofenol 10, 1-yodo-4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 11, 4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]trimetilsililetinilenbenceno 12, y 1-Etinilen-4-[2(-2- metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13.

La síntesis de los compuestos 4 y 5 comienza con la alquilación de la hidroquinona 1 (ver figura 7.1); por tal motivo, primero se realizará una descripción del espectro de este reactivo y posteriormente se irá analizando cada uno de los espectros que también se encuentran en la figura 7.9. En el espectro de la hidroquinona se observan dos singuletes en la región aromática a 8.66 y 6.63 ppm, los cuales corresponden a los protones de los grupos hidroxilo y a los del anillo bencénico respectivamente. Cuando la hidroquinona ha reaccionado con el 1-bromododecano obteniéndose el producto intermediario 1,4-bis(dodecanoxi)benceno 2, las señales generadas inicialmente por los protones de los grupos hidroxilo de 1 desaparecen, observándose solo un singulete a 6.82 ppm asignado a los protones aromáticos. Mientras tanto a campos altos se

observan las señales correspondientes a los protones de las cadenas alifáticas: un triplete (a) a 0.9 ppm generado por los protones del grupo metilo, un singulete (b) a 1.28 ppm atribuido a los grupos metileno restantes de la cadena alifática, un quinteto (c) a 1.45 ppm que corresponde al -CH₂- γ -O-, un quinteto (d) con un desplazamiento químico de 1.76 ppm generado por el --CH₂- β -O- y finalmente un triplete (e) a 3.90 ppm asignado al $-CH_2-\alpha$ -O-. Como puede apreciarse en la misma figura, los protones de las cadenas alifáticas de los diferentes compuestos presentan desplazamientos químicos similares a 2. Sin embargo, en algunos casos el número y la multiplicidad de las señales se ven afectados por algunos grupos sustituyentes del anillo aromático. El ejemplo más ilustrativo lo constituye el espectro del 1-bromo-2,5bis(dodecanoxi)benceno 3. Al introducir un átomo de bromo en la estructura química de 2, éste modifica el ambiente químico de los protones de carbonos adyacentes e incluso de los protones de la cadena alifática más cercana y como consecuencia se observan diferencias notables en el espectro del compuesto resultante 3. A campos bajos se observa un singulete (6.80 ppm) y dos dobletes (6.78 y 7.10 ppm), los cuales corresponden a los protones H₃, H₅ y H₆ del anillo bencénico. En cuanto a las cadenas alifáticas, la señal del -CH2-β-O- se observa como un multiplete (d) (δ 1.77) y los protones –CH₂- α -O- de cada cadena producen un triplete (e) (3.94 y 3.87 ppm). Finalmente, en el espectro del 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4-yodobenceno 4 se observa que ha desaparecido el doblete asignado al protón H_5 del compuesto 3, cuando éste ha sido reemplazado por un átomo de yodo. Así mismo, la multiplicidad de H₆ (δ 7.27) cambia de doblete a singulete, en tanto que el singulete del protón H₃ se desplaza a 6.98 ppm. Los desplazamientos químicos de los protones de las cadenas son similares a 2 y sólo se observa cambios en la multiplicidad de - CH_2 - α -O-.

En relación al compuesto 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno 5, como puede apreciarse en la **figura 7.9**, su espectro es similar al del compuesto 2; sin embargo la intensidad de las señales es proporcional al número de protones de la estructura esperada.



Figura 7.9 Espectros de RMN ¹H de la hidroquinona 1, 1,4-bis(dodecanoxi)benceno 2, 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)benceno 3, 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4-yodobenceno 4 y del 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno 5 en $CDCl_3$.

En la figura 7.10 se muestran los espectros de los compuestos sintetizados 7, 8 y 9, así como el de la materia prima 6. De manera general, en los espectros de los compuestos obtenidos se observan algunas señales en común, las cuales corresponden a los protones del grupo bencílico: a 5.37 ppm se observa el singulete producido por el metileno (-CH₂-), mientras que entre 7.48 y 7.36 ppm se presenta un multiplete derivado de los protones aromáticos (Bz). La diferencia entre los espectros de estos compuestos radica esencialmente en las señales generadas por los diferentes grupos sustituyentes del anillo bencénico principal. Como puede apreciarse en esta figura, el espectro del ácido yodobenzoico 6 muestra dos dobletes a 7.87 ppm (H_2 y H_6) y 7.69 ppm (H₃ y H₅), los cuales se transforman en un singulete (δ 7.79 ppm) en el momento en el que 6 es esterificado con alcohol bencílico para obtener 4-yodobenzoato de bencilo 7. Al acoplar este último compuesto a un equivalente de trimetilsililacetileno TMSA se obtiene 4-[(trimetilsilil)etinilen]benzoato de bencilo 8, en cuyo espectro ahora se observan dos dobletes (δ 8.03 y δ 7.54 ppm) que corresponden a los protones aromáticos y un singulete (0.30 ppm) producido por los protones metílicos del trimetilsililo $(-Si-(CH_3)_3)$. Posteriormente, cuando se remueve el grupo trimetilsililo que protege a la función acetilénica de la molécula 8, la señal que éste forma desaparece y a 3.27 ppm aparece un singulete generado por el protón acetilénico (H=) del compuesto 4-etinilbenzoato de bencilo 9. Los desplazamientos químicos de los protones aromáticos de este último compuesto son similares a los presentados por el compuesto 8.

A continuación describiremos los espectros de los compuestos 10, 11, 12 y 13, los cuales se encuentran agrupados en la figura 7.11. De acuerdo a la ruta de síntesis descrita en la figura 7.3, la preparación del 1-etinilen-4-[2(-2- metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13 inicia a partir del 4yodofenol 10. En el espectro de este reactivo se observan dos dobletes, el primero a 7.50 ppm producido por los protones H_2 y H_6 ; mientras que a 6.62 ppm se observa el segundo doblete derivado de los protones H_3 y H_5 del anillo aromático. El pico ancho producido por el protón del grupo hidroxilo a 5.36 ppm solo se detecta al amplificar la región que comprende los 6.0 y 4.6 ppm del espectro, ver figura insertada en el espectro de 10.


Figura 7.10 Espectros de RMN ¹H correspondientes al ácido 4-yodobenzoico 6, 4-yodobenzoato de bencilo 7, 4-[(trimetilsilil)etinilen]benzoato de bencilo 8 y 4-etinilbenzoato de bencilo 9.

Como puede notarse en los tres últimos espectros de la figura, el número de señales generadas por los protones aromáticos al igual que su multiplicidad, no se ven afectados por los grupos sustituyentes que se encuentran en las diferentes moléculas. Este mismo comportamiento se observa en las señales del 2-(2-metoxi-etoxi)-etilo que aparecen entre 4.07 y 3.09 ppm. En estos

casos, la diferencia entre las señales de un compuesto a otro se observa en los desplazamientos químicos que éstas presentan.

El espectro del 1-yodo-4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 11 presenta dos dobletes a 7.26 (H_2 y H_6) y 6.42 ppm (H_3 y H_5). A diferencia del espectro de 10, no se detecta la señal del protón hidroxilo al amplificar la zona entre los 6.0 y 4.6 ppm. En su lugar se observan cuatro tripletes (δ 3.76, 3.53, 3.40 y 3.27 ppm) correspondientes a los grupos metileno α -O-Ar (j), β -O-Ar (i), β -O-CH₃ (h) y α -O-CH₃ (g), así como un singulete asignado a los protones metílicos (f) (δ 3.09 ppm) del 2-(2-metoxi-etoxi)-etilo.

Una vez acoplado el TMSA a 11 se obtiene el 4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]trimetilsililetinilenbenceno 12, el espectro de este compuesto presenta el singulete intenso característico del trimetilsililo ($-Si-(CH_3)_3$) a 0.2 ppm. El resto de las señales presentan desplazamientos químicos significativos con respecto a los señalados para la molécula 11. Cuando el TMSA se acopla a la molécula origina un desapantallamiento de los protones del anillo bencénico, de este modo, los dobletes de los protones aromáticos se desplazan a campos bajos a 7.35 (H_2 y H_6) y 6.78 (H_3 y H_5) ppm. Sucediendo de igual manera para los tripletes generados por los metilenos del 2-(2-metoxi-etoxi)-etilo (δ 4.07, 3.81, 3.66 y 3.52 ppm), así como para el singulete del grupo metílico (8 3.34 ppm). Por último, cuando el trimetilsililo es eliminado de la estructura química de 12 por el FTBA, la señal que éste genera a 0.2 ppm desaparece y el singulete característico del protón acetilénico (H-=) del 1-etinilen-4-[2(-2metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13 se observa a 2.97 ppm. En la región de los aromáticos, los protones H_2 y H_6 producen un doblete a 7.33 ppm, y los protones H_3 y H_5 generan otro doblete a 6.77 ppm. A 4.03, 3.75, 3.62 y 3.48 ppm se observan los tripletes de los grupos metileno y a 3.30 ppm se observa el singulete de los protones metílicos del 2-(2-metoxi-etoxi)-etilo.



Figura 7.11 Espectros de RMN ¹H correspondientes al 4-yodofenol 10, 1-yodo-4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 11, 4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-trimetilsililetinilenbenceno 12, y 1-Etinilen-4-[2(-2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13. Figura insertada: Región amplificada del espectro de RMN ¹H del 4-yodofenol 10. La banda ancha con δ 5.36 ppm corresponde al protón del grupo hidroxilo.

7.1.3.2 Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C

Habiendo realizado la discusión de los espectros de RMN ¹H, en seguida abordaremos el análisis de los espectros de RMN ¹³C. Los desplazamientos teóricos de las señales generadas por los carbonos de los compuestos sintetizados fueron calculados empleando los paquetes de simulación Spartan 04 y ChemDraw 3D. Tomando como referencia estos datos se realizó la asignación de los desplazamientos experimentales para los carbonos de cada una de las moléculas. Una característica importante que también fue considerada al momento de asignar las señales fue su intensidad de resonancia, ya que los carbonos sustituidos presentan señales de menor intensidad que los carbonos no sustituidos. Los espectros obtenidos a partir de los diferentes compuestos sintetizados fueron agrupados en las **figuras 7.12, 7.13** y **7.14**. Los desplazamientos teóricos recabados, así como los experimentales se muestran en las **tablas 7.2, 7.3** y **7.4**. A partir de esta información solo se destacaron los aspectos más relevantes de cada espectro.

Como puede apreciarse en los espectros de las figuras 7.12, 7.13 y 7.14, los grupos funcionales de los diferentes compuestos sintetizados dan origen a nuevas señales en los espectros y/o algunos cambios importantes en los desplazamientos químicos principalmente de los carbonos del anillo aromático. En la figura 7.12 se muestran los espectros del reactivo hidroquinona 1 y de los compuestos 1,4-bis(dodecanoxi)benceno 2, 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)benceno 3, 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4-yodobenceno 4 y 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno 5. En el caso del compuesto 2, a campos bajos se observan las señales correspondientes a los carbonos aromáticos, cuyos desplazamientos son similares a los del reactivo 1, ver tabla 7.2. En cuanto a las señales que se observan a campos altos, éstas corresponden a los carbonos de las cadenas alifáticas: el carbono del grupo metilo (a) genera una señal a 14.19 ppm, mientras que los carbonos que se encuentran en las posiciones α (b₁) y β (b₂) al metilo producen las señales que se localizan a 22.79 y 32.03 ppm; los carbonos de los grupos metileno restantes (-b-) junto con el carbono β al oxígeno (d) presentan un conjunto de señales entre 29.76 y 29.46 ppm y por último, los carbonos α (e) y γ (c) al oxígeno muestran señales a 68.75 y 26.18 ppm. Cabe mencionar que las señales de las cadenas alifáticas de los compuestos 3, 4 y 5 muestran desplazamientos químicos muy similares a los descritos para el compuesto 2, aunque se presentan algunas excepciones éstas serán discutidas en su momento.

Compuesto	Desplazamientos químicos teóricos					De	splazami	entos quí	micos exp	erimenta	les	
	C1	C2	C3	C4	C5	C 6	C1	C2	C3	C4	C5	C 6
1	149.9	117.1	117.1	149.9	117.1	117.1	150.32	116.36	116.36	150.32	116.36	116.36
2	150.4	114.8	114.8	150.4	114.8	114.8	153.32	115.48	115.48	153.32	115.48	115.48
3	153.7	109.4	118.1	152.6	113.8	117	153.68	112.89	119.59	149.87	114.43	114.78
4	155.3	108.3	119.7	161.5	82.6	125.9	150.51	112.61	117.15	152.63	84.88	124.31
5	160.9	82.5	125.3	160.9	82.5	125.3	152.97	86.41	122.89	152.97	86.41	122.89

Tabla 7.2 Desplazamientos químicos experimentales y teóricos de la hidroquinona 1, 1,4-bis(dodecanox1)benceno 2,
1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)benceno 3, 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4-yodobenceno 4 y del 1,4-bis(dodecanoxi)-
2.5-divodobenceno 5.de solventes deuterados.

Al introducir un átomo de bromo en la posición *orto* con respecto a una de las cadenas dodecanoxi del anillo aromático de **2**, las señales de cada uno de los carbonos aromáticos experimentan cambios significativos en sus desplazamientos químicos, como lo podemos constatar en el espectro del compuesto resultante **3**. Otro ejemplo de la influencia del halógeno sobre los desplazamientos de la señales y que se puede visualizar fácilmente en el espectro, lo constituyen las señales que se encuentran a 70.30 y 68.89 ppm, las cuales son producidas por el - C- α -O- (**e**) de cada una de las cadenas alifáticas. Por último, cuando se incorpora un átomo de yodo en el carbono 5 del anillo bencénico de **3**, obteniéndose de este modo el compuesto **4**, el cambio más notable que se observa en el espectro es el desplazamiento de la señal que produce dicho carbono hacia campos altos (δ 82.6 ppm). Debido a la diferencia de electronegatividades entre ambos halógenos, también se presentan señales producidas independientemente por cada una de las cadenas alifáticas y que corresponden a los -C- α -O- (**e**) (70.45 y 70.40 ppm), -C- β -O- (29.26 y 29.22 ppm) (**d**) y al -C- γ -O- (**c**) (26.13 y 26.03); sin embargo, estas señales no pueden distinguirse fácilmente en el espectro puesto que se encuentran semitraslapadas con otras señales o bien es necesario ampliar la imagen para poder apreciarlas.



Figura 7.12 Espectros de RMN 13 C de la hidroquinona 1, 1,4-bis(dodecanoxi)benceno 2, 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)benceno 3, 1-bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4-yodobenceno 4 y del 1,4-bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno 5.

En relación al espectro de RMN ¹³C del compuesto **5** y a diferencia de su espectro de RMN ¹H, éste presenta cambios más evidentes respecto al espectro del compuesto **2**, por un lado las señales de los carbonos no sustituidos se encuentran a 122.89 ppm, mientras que los carbonos sustituidos con yodo (C_2 y C_5) presentan un desplazamiento a 86.41 ppm. En el espectro de **2**, éstos carbonos solo generan una señal a 115.48 ppm.

4-yodobenzoico 6. 4-vodobenzoato de bencilo 7. 4-Los espectros del ácido [(trimetilsilil)etinilen]benzoato de bencilo 8 y 4-etinilbenzoato de bencilo 9 se agrupan en la figura 7.10. Entre las señales más relevantes que muestran los espectros de los compuestos sintetizados destacan la que genera el carbono carbonilo a 166 ppm y las señales propias del grupo bencílico, tales como la del carbono del anillo bencénico (Bz) que se encuentra unido directamente al grupo metileno (k) a 136 ppm, el conjunto de señales que genera el mismo anillo (Bz) entre 128.80 y128.40 ppm, y la señal del grupo metileno (-CH₂-) a 67 ppm.

El compuesto 8 se obtiene al acoplar TMSA a 7, en su espectro se observan además de las señales de los carbonos aromáticos (revisar tabla 7.3) y las relacionadas con el grupo bencílico, las señales de los grupos metilo unidos al silicio $((-Si-CH_3)_3)$ a -0.02 ppm y las de los carbonos etinilénicos a 104.28 y 97.89 ppm (C=C). Al remover el $((-Si-CH_3)_3)$ de la estructura química de 8, la señal de los carbonos de este grupo desaparece y se observa un desplazamiento de los carbonos acetilénicos a 82.91 y 80.30 ppm (C=C).

Compuesto	esto Desplazamientos químicos teóricos				De	splazami	entos quí	micos exp	erimenta	les		
	C1	C2	C3	C4	C5	C 6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
6	129.5	131.7	137.3	102.5	137.3	131.7	130.86	131.64	138.12	101.69	138.12	131.64
7	129.4	131.3	137.3	101.6	137.3	131.3	129.70	131.28	137.87	101.11	137.87	131.28
8	130.2	129.3	132.0	126.6	132.0	129.3	129.84	129.64	132.02	128.05	132.02	129.64
9	130.2	129.3	132.0	126.6	132.0	129.3	130.19	129.70	132.17	126.96	132.17	129.70

Tabla 7.3 Desplazamientos químicos experimentales y teóricos del ácido 4-yodobenzoico 6, 4-yodobenzoato de bencilo 7, 4-[(trimetilsilil)etinilen]benzoato de bencilo 8 y 4-etinilbenzoato de bencilo 9.



Figura 7.13 Espectros de RMN ¹³C correspondientes al ácido 4-yodobenzoico 6, 4-yodobenzoato de bencilo 7, 4-[(trimetilsili)etinilen]benzoato de bencilo 8 y 4-etinilbenzoato de bencilo 9.

Enseguida analizaremos los espectros correspondientes al 4-yodofenol 10, 1-yodo-4-[2-(2metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 11, 4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-trimetilsililetinilenbenceno 12 y del 1-etinilen-4-[2(-2- metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13, los cuales se encuentran agrupados en la figura 7.14. En la tabla 7.4 se muestran los desplazamientos químicos teóricos y experimentales de las señales correspondientes a los carbonos aromáticos de los compuestos antes mencionados.

 Tabla 7.4 Desplazamientos químicos de 4-yodofenol 10, 1-yodo-4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 11, 4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 11, 4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13.

Compuesto	Desplazamientos químicos teóricos						
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
10	89.9	138.8	117.3	156.2	117.3	138.8	
11	88.9	138.0	115.8	157.7	115.8	138.0	
12	113.9	132.7	113.8	158.5	113.8	132.7	
13	113.9	132.7	113.8	158.5	113.8	132.7	

Desplazamientos químicos experimentales							
C1	C2	C3	C4	C5	C6		
82.92	138.58	117.96	155.36	117.96	138.58		
83.02	138.09	117.08	158.65	117.08	138.09		
115.38	133.38	114.46	158.97	114.46	133.38		
114.32	133.49	114.59	159.15	114.59	133.49		

Los espectros de los compuestos preparados a partir del 4-yodofenol tienen en común las señales que aparecen entre 72 y 58 ppm, las cuales corresponden a los metilenos y al metilo del grupo sustituyente 2-(2-metoxi-etoxi)-Etilo. El carbono del metilo (**f**) produce una señal a 58.95 ppm. Mientras que los metilenos mostraron las siguientes características: las señales α (**j**) y β (**i**) al -O-Ar presentan un desplazamiento químico de 70.62 y 67.46 ppm, y las señales α (**g**) y β (**h**) al -O-CH₃ se encuentran a 71.88 y 69.50 ppm.

Después de acoplar el TMSA a la estructura química de 11, obteniendo de esta manera el compuesto 12, el espectro de éste último presenta como características principales: la señal producida por los grupos metilos del trimetilsililo ($(-Si-CH_3)_3$), la cual se localiza a -0.12 ppm y las señales de los carbonos etinilénicos que se encuentran a 92.32 y 105.32 ppm (C=C). Cuando la función acetilénica es desprotegida, la señal del trimetilsililo desaparece y se observa el desplazamiento de los carbonos del grupo acetileno a 83.69 y 76.39 ppm (C=C).



Figura 7.14 Espectros de RMN ¹³C correspondientes al 4-yodofenol 10, 1-yodo-4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 11, 4-[2-(2-metoxi-etoxi)-etoxi]-trimetilsililetinilenbenceno 12, y 1-etinilen-4-[2(-2-metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13.

7.2 Síntesis de oligómeros

En la mayor parte de los trabajos, los cuales es necesario mencionarlo son contados, que se emplean oligómeros o polímeros conjugados y que están funcionalizados con monosacáridos como la manosa,^{3, 35} los grupos OH siempre están protegidos para no afectarlos durante las diferentes etapas de síntesis. Estas protecciones por lo regular se llevan a cabo con grupos acetilo, subsecuentemente la manosa es sometida a un proceso de desacetilación con el tedioso trabajo de

aislar los diferentes compuestos que aún tienen manosa con grupos acetilo sin hidrolizar, además se debe tener en cuenta la presencia de otros grupos funcionales en la molécula que puedan ser susceptibles a la hidrólisis. En este capítulo, reportamos la síntesis de oligómeros con 3 unidades fenilenetinileno terminados con uno o dos ácidos carboxílicos protegidos con grupos bencilo. Después de la desprotección de los ácidos carboxílicos, éstos fueron activados con difenil(2,3dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil)fosfonato, el cual una vez sustituido se convierte en un buen grupo saliente después del ataque nucleofílico de la amina 4-aminofenil- α -D-manopiranósida. La amidación mediante esta ruta no requiere que los grupos hidroxilo sean protegidos.

Para hidrolizar el grupo bencilo, evaluamos diferentes métodos (a temperatura ambiente y calentando) tales como el que involucra condiciones ácidas CF3CO2H en CH2Cl2, o condiciones básicas KOH/H2O en THF y empleando (CH3)3MeSiCl/NaI en CH3CN.36 Sin embargo, por los tres métodos los rendimientos fueron menores al 30 %. Aún más, si el desgasificado de los solventes en condiciones ácidas o básicas no se lleva a cabo rigurosamente, la degradación total de las funciones etinilénicas ocurre rápidamente, la cual a su vez se puede monitorear por TLC por la aparición de muchas manchas en la sílica y la desaparición de la mancha muy fluorescente del trímero. Después de muchos intentos, el método que se usa para hidrolizar el grupo protector polar de acetilenos, el 2-metil-ol, se evaluó y se adecuó con éxito.³⁷ En nuestro caso encontramos que en vez de utilizar butanol o propanol que hacen precipitar al trímero, el uso de tolueno burbujeado con nitrógeno por una hora previamente a la reacción era suficiente. También se debe de usar un exceso de KOH (5 equivalentes por grupo bencilo) para obtener los trímeros con terminaciones ácido carboxílico en rendimientos de alrededor de los 89 %. Para la reacción de amidación con la 4-aminofenil- α -D-manopiranósida, también se evaluaron diferentes métodos. Primeramente fue el típico uso del agente deshidratante DCC/DMAP, el cual no fue el adecuado, ya que encontramos que si los OH de la manosa no estaban protegidos se obtenía una mezcla de productos difíciles de aislar incluso a bajas temperaturas de reacción y la amidación se llevaba a cabo en solo un ~ 3 %. El uso de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC), el cual es conocido por volverse un buen grupo saliente al sustituirse en el ácido carboxílico y es además muy selectivo al ataque nucleófilo de aminas, también arrojo bajos rendimientos ~ 15 %, acompañado de un gran número de subproductos que hicieron el aislamiento extremadamente tedioso. En ambos métodos, la correspondiente urea que se forma fue difícil de eliminar por completo. Otro agente activante que se emplea para las amidaciones con ácidos carboxílicos aromáticos muy impedidos estéricamente es el difenil(2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil)fosfonato,^{36b, 38} Ueda y col. reportaron que las aminas aromáticas reaccionan más rápido y selectivamente que los alcoholes y fenoles debido a la diferencia de reactividad nuceófila, y sin embargo éste agente ha sido poco explotado. Una vez que este agente se sustituye en el ácido, éste se convierte en un buen grupo saliente después del ataque nucleofílico de la amina de la 4-aminofenil- α -D-manopiranósida. Aplicando esta ruta de amidación, los grupos hidroxilo no son afectados y el producto se obtiene en buen rendimiento.

7.2.1 Rutas de síntesis

La ruta de síntesis de los oligómeros oFE3Bz2, oFE3COOH2 y oFE3Man2 se muestra en la **figura 7.15**. En donde, la preparación del trímero oFE3Bz2 consiste en acoplar dos equivalentes de 4-etinilbenzoato de bencilo **9** a un equivalente del compuesto aromático dihalogenado 1,4bis(dodecanoxi)-2,5-diyodobenceno **5**, empleando los catalizadores diclorobis(trifenil)fosfina paladio II y yoduro de cobre en TEA/THF. La obtención de oFE3COOH2 se realiza a partir del oFE3Bz2, removiendo de su estructura a los grupos bencílicos que protegen a ambas funciones carboxílicas. La remoción de dichos grupos de protección se lleva a cabo de manera fácil y rápida en un medio alcalino (KOH/tolueno), obteniendo rendimientos del 90 %. La presencia de los grupos carboxilo terminales en el trímero oFE3COOH2 permiten que éstos puedan ser funcionalizados con algunas moléculas de interés biológico como por ejemplo la 4-aminofenil- α -D-manopiranósida. Esta reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente y en presencia de un agente activante del grupo carboxílico como lo es el difenil(2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil)fosfonato **17**, N-metil-2-pirrolidinona como solvente, trietilamina y 4-aminofenil- α -D-manopiranósida. De esta manera se obtuvo un rendimiento del 77 % del compuesto doblemente funcionalizado oFE3Man2.



Figura 7.15 Ruta de síntesis de los trímeros **oFE3B22**, **oFE3COOH2** y de **oFE3Man2**. ^{*a*} TEA/THF, diclorobis(trifenil)fosfina paladio II, CuI, 60-70 °C, 18 h. ^{*b*} (i) Tolueno, KOH, reflujo, 90 min. N₂. (ii) H₂O/HCl. (pH 1). ^{*c*} Difenil (2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil) fosfonato, 1-metil-2- pirrolidinona, TEA, 4- aminofenil α -D-manopiranósida.

La síntesis de los oligómeros oFE3GBz, oFE3GCOOH y oFE3GMan comienza con la preparación del dímero 4[4-bromo-2,5-bis-(dodecanoxi)fenilenetinilen] benzoato de bencilo 14 (figura 7.16), el cual se obtiene al acoplar los compuestos 1-Bromo-2,5-bis(dodecanoxi)-4yodobenceno 4 y 4-etinilbenzoato de bencilo 9 empleando como catalizadores la diclorobis(trifenil)fosfina paladio II y el yoduro de cobre en TEA/THF como solventes. Posteriormente para sintetizar el trímero oFE3GBz, se realiza nuevamente una reacción de acoplamiento entre el dímero 14 y el 1-etinilen-4-[2(-2- metoxi-etoxi)-etoxi] benceno 13. Con el fin de poder funcionalizar al trímero así obtenido con 4-aminofenil- α -D-manopiranósida, se procede a su desprotección eliminando el grupo bencílico de su estructura molecular, obteniendo de esta manera el oFE3GCOOH y el trímero funcionalizado oFE3GMan por sucesiva amidación, con un rendimiento del 87 % y 75 % respectivamente. La desprotección así como la funcionalización de los oligómeros se llevan a cabo de forma similar a la descrita en la ruta de síntesis anterior.



Figura 7.16 Ruta de síntesis del 4[4-bromo-2,5-bis-(dodecanoxi)fenil etinilen] benzoato de bencilo 14 y de los oligómeros oFE3GBz, oFE3GCOOH y oFE3GMan. ^{*a*} TEA, diclorobis(trifenil)fosfina paladio II, CuI, 60-70 °C, 18 h. ^{*b*} (i) Tolueno, KOH, reflujo, 90 min. N₂. (ii) H₂O/HCl. (pH 1). ^{*c*} Difenil (2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil) fosfonato, 1-metil-2- pirrolidinona, TEA, 4-aminofenil α -D-manopiranósida.

La síntesis del agente activante difenil(2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil)fosfonato 17 se lleva a cabo en una sola etapa. Es una reacción sencilla que se realiza a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte haciendo reaccionar mercaptobenzoxazol 16 con clorofosfato de difenilo 15 en presencia de TEA, empleando como solvente benceno seco (figura 7.17).





7.2.2 Mecanismos de reacción

7.2.2.1 Acoplamiento Sonogashira-Heck

La síntesis del dímero 14 y de los trímeros oFE3Bz2 y oFE3GBz sigue el mismo mecanismo de reacción descrito en la parte 7.1.2.4 para la preparación de los compuestos 8 y 12.

7.2.2.2 Desprotección de grupos carboxilo

El mecanismo de reacción para regenerar grupos carboxílicos a partir de ésteres se muestra en la **figura 7.18**. La reacción se realiza en un medio alcalino e inicia con la formación de una especie intermediaria de tipo tetraédrico IT producto de la adición nucleofílica del ión hidróxido al carbono carbonilo. Enseguida ocurre el desplazamiento del ion alcóxido de la molécula, obteniendo de esta manera el ácido carboxílico correspondiente. Sin embargo, la reacción no termina aquí, ya que el ion alcóxido extrae el protón de la función carboxílica resultante, dando como productos finales el ión carboxilato y un alcohol. Por último, como etapa adicional, el compuesto carboxílico se obtiene de su sal agregando ácido en solución acuosa.³⁹



Figura 7.18 Mecanismo de reacción para la desprotección de funciones carboxílicas en medio alcalino.

7.2.2.3 Síntesis del agente activante de grupos carboxílicos.

La síntesis de difenil(2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil)fosfonato 17 procede a través de una sustitución nucleofílica que inicia con la formación de una especie nucleófila EN a partir del mercaptobenzoxazol 16, la cual posteriormente desplaza al ion cloruro del clorofosfato de difenilo 15 (Figura 7.19). En tanto, la trietilamina y el ácido clorhídrico forman una sal que precipita.



Figura 7.19 Mecanismo de reacción para obtener el difenil(2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil)fosfonato 17.

7.2.2.4 Reacción de amidación

La funcionalización de oligómeros con compuestos como la 4-aminofenil- α -D-manopiranósida, consiste esencialmente en una reacción de amidación asistida por el agente activante difenil(2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil)fosfonato 17. Esta reacción se lleva a cabo en dos etapas, en la primera se realiza la activación de la función carboxílica y en la segunda etapa ocurre una reacción de condensación con la amina. En la **figura 7.20** se ilustra el mecanismo de reacción, en donde el agente activante 17 reacciona con el compuesto carboxílico, obteniéndose de este modo un primer compuesto intermediario altamente reactivo y un nucleófilo, los cuales reaccionan

inmediatamente formando una amida activa como segundo intermediario. Por último, la amina se adiciona al carbono carbonilo del compuesto activado.³⁸

ETAPA 1



ETAPA 2



Figura 7.20 Mecanismo de reacción para la funcionalización de compuestos carboxílicos con aminas.

7.2.3 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear

7.2.3.1 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de ¹H

En cuanto al análisis de los espectros de cada uno de los oligómeros sintetizados, los cuales se encuentran agrupados en las **figuras 7.21 y 7.22**, se puede señalar que en todos los espectros se observan las señales correspondientes a los protones de las cadenas alifáticas: un triplete (**a**) a 0.85 ppm de los protones del grupo metilo, un singulete (**b**) a 1.25 ppm atribuido a ocho de los grupos metileno de la cadena alifática, un quinteto (**c**) a 1.53 ppm que corresponde al metileno γ al oxígeno, un quinteto (**d**) con un desplazamiento químico de 1.81 ppm generado por el metileno β al oxígeno y por último un triplete (**e**) a 4.03 ppm asignado al metileno α al oxígeno. Para el caso particular de los compuestos **oFE3Bz2**, del dímero 14 y del **oFE3GBz**, sus espectros muestran las señales generadas por el grupo bencílico, es decir, un singulete a 5.37 ppm producido por los protones metilénicos (**-CH₂-**) y un multiplete entre 7.49 y 7.31 ppm generado por los protones aromáticos (**Bz**).

Como consecuencia del acoplamiento entre un equivalente del monómero 5 y dos del monómero 9, en el espectro del compuesto resultante oFE3Bz2 (figura 21) se observan, además de las señales de las cadenas alifáticas y las del grupo bencílico ya descritas, las señales correspondientes a los protones de los anillo bencénicos de las moléculas acopladas. Los dobletes que se encuentran a 8.07 y 7.59 ppm corresponden a los protones en posición *orto* (H2, H6, H15 y H17) y *meta* (H3, H5, H14 y H18) al carbonilo. También se observa un singulete a 7.03 ppm, el cual está relacionado a los protones aromáticos que se encuentran en posición *orto* a las cadenas alifáticas (H8 y H11). Por otro lado, puesto que el oligómero oFE3Bz2 tiene en su estructura dos grupos bencílicos terminales, al momento de integrar se obtiene que la señal del grupo metileno corresponde a cuatro protones, mientras que la señal de los protones aromáticos integra para diez. A partir de estos datos se hace evidente la simetría que presenta esta molécula producto de la sustitución que ha experimentado el compuesto 5 en ambos extremos.

Al remover ambos grupos bencilo de la estructura química de oFE3Bz2 se obtiene el trímero **oFE3COOH2**. En el espectro de este compuesto ya no se observan las señales de los protones

aromáticos (**Bz**) ni la de los metilénicos ($-CH_2-$). Permaneciendo, las señales de las cadenas alifáticas y las de los anillos aromáticos. Las señales de éstos últimos conservan su multiplicidad y presentan desplazamientos químicos similares a los del compuesto protegido con el grupo bencílico.

Antes de iniciar el análisis del espectro del trímero con terminación manosa **oFE3Man2**, es necesario hacer las siguientes observaciones: 1) La numeración de los protones de la manosa se realiza en el orden en el que se indica en la estructura de abajo. 2) Para referirse a un protón específico de la manosa, se colocará el número del protón seguido de las letras Man, por ejemplo: H2-Man para citar al protón número dos del monosacárido. 3) Al protón H1-Man también se le conoce como protón anomérico y en los espectros lo designaremos como H_{anomérico}.



En el espectro del oligómero **oFE3Man2** se observan además de las señales propias de esta familia de oligómeros, las que corresponden a los protones tanto de la manosa misma como de su sustituyente aromático. En primer lugar, nos enfocaremos en los cambios que ocurrieron en la región aromática del espectro y posteriormente continuaremos con los cambios directamente relacionados con la estructura cíclica de la manosa. Como puede apreciarse en el espectro, se observa un singulete a 10.26 ppm, el cual integra para dos protones que corresponden a cada una de las funciones amida de la molécula. La señal de los protones *orto* al carbonilo (H2, H6, H15 y H17) se localiza a 8.01 ppm como un doblete. A 7.66 ppm se encuentra un triplete, el cual integra para ocho protones: los cuatro correspondientes a la posición *meta* al carbonilo (H3, H5, H14 y H18) y los cuatro protones de la parte aromática de la manosa que se encuentran en posición *meta* (m) a dicho monosacárido. La señal de los protones del anillo aromático central del oligómero (H8 y H11) se observa como un singulete a 7.23 ppm. En cuanto a los protones que se encuentran en posición *orto* (n) con respecto a la manosa, estos generan un doblete a 7.09 ppm, el cual integra para los cuatro. Respecto a las señales producidas por el monosacárido destacan las siguientes: a) La que produce el protón anomérico (H_{anomérico}) a 5.33 ppm como un singulete que

integra para dos protones. b) Las señales de los grupos hidroxilo a 5.04, 4.85, 4.77 y 4.49 ppm, cabe mencionar que cada una integra para dos protones. Y por último c) El singulete a 3.82 ppm del protón H2 de la estructura cíclica (H2-Man) que integra para dos protones. Las señales producidas por el resto de los protones de la estructura cíclica de la manosa (entre 3.67 y 3.47 ppm) se encuentran parcialmente traslapadas con la señal del solvente. Sin embargo, se ha obtenido información suficiente para concluir que la molécula del trímero se encuentra doblemente sustituida por el derivado aromático de la α -D-manopiranósida. Por otro lado, es importante destacar que la presencia de los grupos hidroxilo libres en la molécula, son de suma importancia durante el desarrollo de los ensayos de reconocimiento bacteriano con esta clase de oligómeros, ya que estos interaccionan directamente con la bacteria, específicamente con la proteína FimH que se encuentra en las puntas de las fimbrias bacterianas.

Los espectros de los oligómeros 14, oFE3GBz, oFE3GCOOH y oFE3GMan se muestran en la figura 7.22, a partir de ellos se pueden apreciar las siguientes características generales: a) Todos los compuestos presentan las señales asociadas a las cadenas alifáticas. b) Los compuestos 14 y oFE3GBz también muestran las señales relacionadas con el grupo bencílico. c) En los espectros de los trímeros se observan las señales correspondientes al 2-(2-metoxi-etoxi)-Etilo, las cuales serán descritas a continuación, los protones metílicos (f) de los compuestos oFE3GBz y oFE3GCOOH producen una señal a 3.40 ppm, la señal del oligómero funcionalizado con la manosa no se visualiza en el espectro, debido a que esta traslapada por la señal del solvente. En cuanto a los metilenos, los protones α (j) y β (i) al -O-Ar presentan señales a 4.13 y 3.85 ppm, y los protones α (g) y β (h) al -O-CH₃ se encuentran a 3.73 y 3.58 ppm.

Cuando la reacción de acoplamiento entre los monómeros 4 y 9 ha ocurrido, el singulete característico del protón acetileno (H==) que se localizaba a 3.27 ppm en el espectro de 9, ya no se observa en el espectro del producto obtenido (4[4-bromo-2,5-bis-(dodecanoxi)fenilenetinilen] benzoato de bencilo 14). Por otro lado, en la región aromática se observa que los protones *orto* al carbonilo presentan un doblete a 8.06 ppm (H2, H6), en tanto que los protones *meta* generan otro doblete a 7.58 ppm (H3, H5). Por su parte, cada uno de los protones *orto* a las cadenas alifáticas producen un singulete a 7.11 y 7.02 ppm (H11 y H8).





Figura 7.21 Espectros de RMN ¹H correspondientes a los trímeros con terminaciones bencil éster (oFE3Bz2), carboxilo (oFE3COOH2) y manosa (oFE3Man2).

El espectro del oligómero oFE3GBz presenta las siguientes características que resultan de haber acoplado el monómero 13 y el dímero 14, la señal de los protones H14 y H18 se encuentran traslapadas con la señal de los protones aromáticos del grupo bencílico y por lo tanto se observa como un multiplete entre 7.49 y 7.33 ppm. La señal de los protones H15 y H17 se observa como un doblete a 6.88 ppm. A diferencia del dímero, los protones *orto* a las cadenas alifáticas (H11 y H8) producen un singulete a 6.99 ppm. También se hace patente, la presencia de las señales correspondientes al 2-(2-metoxi-etoxi)-Etilo, cuyos desplazamientos ya fueron descritos al iniciar el análisis de la figura 7.22. En relación a las señales generadas por los protones *orto* (H2, H6) y *meta* al carbonilo (H3, H5), estas tienen desplazamientos químicos similares a los del compuesto 14 y de igual forma conservan su multiplicidad.

Entre los aspectos más relevantes que pueden destacarse del espectro de **oFE3GCOOH** son la ausencia de las señales de los protones del metileno y de los protones aromáticos del grupo bencílico. Como resultado de la eliminación de éste grupo, se visualiza fácilmente el doblete (δ 7.50) generado por los protones H14 y H18 de la molécula. También se observan los dobletes producidos por los protones *orto* (H2, H6) y *meta* (H3, H5) al carbonilo, y por los protones H15 y H17 a 8.07, 7.60 y 6.88 ppm respectivamente. Además, se encuentra un singulete a 7.00 ppm de los protones H11 y H8.





Figura 7.22 Espectros de RMN ¹H correspondientes al 4[4-bromo-2,5-bis-(dodecanoxi)fenilenetinilen] benzoato de bencilo 14 y a los trímeros con terminaciones glicol bencil éster (oFE3GBz), glicol carboxilo (oFE3GCOOH) y glicol manosa (oFE3GMan).

En cuanto a las señales representativas de la parte cíclica polihidroxilada del monosacárido, tenemos al singulete del protón anomérico que se localiza a 5.33 ppm, a las señales de los grupos hidroxilo que se encuentran a 5.04, 4.86, 4.78 y 4.49 ppm, cada una integra para un protón. Finalmente, se observa el singulete del protón **H2-Man** a 3.83 ppm. El resto de las señales que genera este carbohidrato están traslapadas con las señales del grupo 2-(2-metoxi-etoxi)-etilo y

con la señal del solvente. Mediante la información aquí expuesta, queda demostrado que se ha obtenido una molécula monofuncionalizada con 4-aminofenil-α-D-manopiranósida a partir del trímero oFE3GCOOH. Además, los grupos hidroxilo del nuevo compuesto se encuentran libres en la molécula, es decir no experimentaron reacción alguna durante la etapa de amidación.

La figura 7.23 muestra los espectros de RMN ¹H del mercaptobenzoxazol 16 y del difenil(2,3dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil)fosfonato 17. Como se puede apreciar en el primer espectro de la figura, el protón H3 de 16 genera un doblete a 7.37 ppm; mientras que los protones H4, H5 y H6 producen un multiplete a 7.15 ppm. En cuanto al agente activante, los protones H5 y H3 de la molécula, generan un singulete y un doblete a 7.65 ppm y 7.53 ppm, respectivamente. En tanto, los protones aromáticos del fosfato de difenilo producen un multiplete entre 7.43 y 7.21 y por último, la señal de los protones H4 y H6 se observa como un multiplete a 7.13 ppm.



Figura 7.23 Espectros de RMN ¹H correspondientes al mercaptobenzoxazol 16 y al difenil(2,3-dihidro-2tioxo-3-benzoxazolil)fosfonato 17.

7.2.3.2 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C

Los espectros de RMN de ¹³C de los oligómeros sintetizados se agrupan en las **figuras 7.24** y **7.25**. En ambas figuras se puede apreciar que los compuestos presentan las señales características de las cadenas alifáticas. Como por ejemplo, las señales del carbono metílico (**a**) y las de los carbonos que se encuentran en posición α (**b**₁) y β (**b**₂) a dicho carbono, estas señales se localizan a 14.10, 22.74 y 32.00 ppm. También se observan las señales del metileno α (**e**) y γ (**c**) al oxígeno con un desplazamiento de 69.65 y 26.15 ppm, el resto de los metilenos (-**b**-) junto con el que se encuentra en posición β al oxígeno (**d**) presentan un conjunto de señales entre 29.77 y 29.30 ppm.

En la **tabla 7.5** se muestran los desplazamientos teóricos y experimentales que presentan las estructuras carbonadas principales de los oligómeros oFE3Bz2, oFE3COOH2 y oFE3Man2. Como puede apreciarse, estos compuestos presentan desplazamientos similares, la diferencia entre ellos radica en la presencia o ausencia de determinados grupos sustituyentes en la molécula. Las señales del grupo bencilo en el oligómero oFE3Bz2 se observan a 136.01 ppm para el carbono aromático (**k**) enlazado directamente al metileno, entre 128.43 y 128.34 aparecen las señales de los carbonos aromáticos (**Bz**) y a 66.98 ppm se encuentra la señal del metileno (-**CH₂-Bz**). Además se observan las señales del carbono carbonilo (165.96 ppm) y las del triple enlace (94.42 y 89.14 ppm). Cuando se desprotege a ambas funciones carboxílicas, las señales de los grupos bencilo desaparecen del espectro.

Las señales que destacan en el espectro de oFE3Man2 están relacionadas con el sustituyente 4aminofenil- α -D-manopiranósida. Por lo que, la numeración de los carbonos de la parte cíclica del carbohidrato seguirá el mismo orden indicado para los protones. Las señales de los carbonos aromáticos unidos a la manosa y al grupo amida se encuentran a 153.28 y 135.22 ppm. En cuanto a los protones en posición *orto* (**n**) y *meta* (**m**) respecto al carbohidrato, tenemos que presentan un desplazamiento de 122.35 y 117.57 ppm. Sin duda una de las señales más importantes que presenta éste monosacárido, es la del carbono anomérico, la cual se observa a 99.84 ppm. Los carbonos C2, C3, C4, C5 y C6 presentan los siguientes desplazamientos: 75.43, 70.71, 67.34, 71.29 y 61.64 ppm.

Desplazamientos químicos							
		Teóricos			Experimentale	S	
Carbono	oFE3Bz2	oFE3COOH2	oFE3Man2	oFE3Bz2	oFE3COOH2	oFE3Man2	
C1, C16	130.2	130.3	133.2	129.54	130.48	133.93	
C2, C6, C15, C17	129.3	129.7	126.9	129.75	129.63	128.55	
C3, C5, C14, C18	132	132	132.2	131.56	131.09	131.61	
C4, C13	126.6	127.5	125.7	128.73	127.88	126.06	
C7, C10	108.3	108.3	108.3	114	113.95	113.80	
C8, C11	118	118	118	116.94	116.57	117.27	
C9,C12	153.6	153.6	153.6	153.90	153.97	153.84	

Tabla 7.5 Desplazamientos químicos teóricos y experimentalesde los trímeros oFE3Bz2, oFE3COOH2 y de oFE3Man2.

A continuación analizaremos la información obtenida a través de los espectros agrupados en la **figura 7.25** y que corresponden a los oligómeros **14**, **oFE3GBz**, **oFE3GCOOH** y **oFE3GMan**. Los desplazamientos teóricos y experimentales de estos oligómeros se presentan en la **tabla 7.6**. Como puede apreciarse en la figura, los trímeros presentan además de las señales de las cadenas alifáticas, las señales del 2-(2-metoxi-etoxi)-Etilo que lo diferencian de los oligómeros ya descritos. La señal del metilo (f) presenta un desplazamiento de 58.93 ppm, en tanto, las señales de los metilenos α (j) y β (i) al -O-Ar, así como las señales de los metilenos α (g) y β (h) al -O-CH₃ se localizan a 70.68, 67.64 ppm, 72.00 y 69.54 ppm.



Figura 7.24 Espectros de RMN ¹³C correspondientes a los trímeros con terminaciones bencil éster (oFE3Bz2), carboxilo (oFE3COOH2) y manosa (oFE3Man2).

Las señales más representativas que se observan en el espectro del dímero 4[4-bromo-2,5-bis-(dodecanoxi)fenilenetinilen] benzoato de bencilo 14 son: a) La del carbono carbonilo a 165.94 ppm, b) Las señales propias del grupo bencílico, como la señal del carbono aromático unido al metileno (k) a 136.03 ppm, la señal que producen los carbonos aromáticos (Bz) entre 128.73 y 128.34 ppm y la señal del metileno (-CH₂-Bz) a 66.97 ppm. y c) Las dos señales de los C≡C que tienen un desplazamiento químico de 93.32 y 88.75 ppm. La molécula de oFE3GBz siendo preparada a partir de 14 presenta de igual forma, las señales descritas para el dímero con desplazamientos químicos similares. Sin embargo, como era de esperarse, en su espectro se observa un incremento en el número de señales, tanto en la región aromática como en la que comprende los 72.00 y 58.93 ppm que es en donde aparecen las señales del 2-(2-metoxi-etoxi)-Etilo. Asimismo se observan dos señales más correspondientes a los C=C de la molécula acoplada al dímero, las cuales se encuentran entre 95.45 y 84.81 ppm. Con relación al espectro del oligómero oFE3GCOOH, sobresalen dos aspectos importantes, en primer lugar, la desaparición de las señales del grupo bencílico, que resulta de haber desprotegido a la función carboxílica. Como segundo término, la ausencia de la señal del carbono carbonilo de esta molécula, la cual se atribuye a las fuertes interacciones intermoleculares asociadas a la concentración de la muestra así como por efecto del solvente. Como es sabido, los compuestos con funciones carboxílicas forman dímeros estables mediante puentes de hidrógeno en solventes no polares.

Para finalizar, examinaremos la información que proporciona el espectro de **oFE3GMan**. Como puede apreciarse en la figura, al funcionalizar al oligómero con la 4-aminofenil- α -D-manopiranósida, el espectro de la molécula resultante se vuelve un tanto complejo, principalmente por que las señales de la estructura cíclica del monosacárido se traslapan con las del 2-(2-metoxi-etoxi)-Etilo del oligómero. A diferencia del espectro anterior, sí se observa la señal del carbono carbonilo (164.17 ppm). En cuanto a las señales relacionadas directamente con el derivado de la manosa, tenemos que la señal de los carbonos aromáticos unidos al carbohidrato y al grupo amido se observan a 153.24 y 135.09 ppm. Las señales de los carbonos *orto* (**n**) y *meta* (**m**) a la estructura cíclica de la manosa tienen un desplazamiento de 117.54 y 122.32 ppm y las señales del carbono anomérico así como las de los carbonos C2, C3, C4, C5 y C6 se localizan a 99.76, 75.43, 70.69, 67.27, 71.26 y 61.59.

Desplazamientos químicos											
	Teóricos Experimentales										
Carbono	14	oFE3GBz	oFE3GCOOH	oFE3GMan	14	oFE3GBz	oFE3GCOOH	oFE3GMan			
C1	130.2	130.2	130.3	133.2	129.48	129.37	130.23	133.93			
C2, C6	129.3	129.3	129.7	126.9	129.74	129.74	131.57	128.54			
C3, C5	132.0	132	132	132.2	131.49	131.51	133.16	131.56			
C4	126.6	126.6	127.5	125.7	128.41	128.39	129.25	126.15			
C7	107.6	108.3	108.3	108.3	112.04	115.24	115.34	115.13			
C8	117.7	118.0	118.0	118.0	118.02	116.99	117.10	117.09			
С9	156.2	153.6	153.6	153.6	149.57	153.49	153.50	153.45			
C10	109.1	108.3	108.3	108.3	114.14	115.79	115.79	114.74			
C11	117.7	118.0	118.0	118.0	117.58	116.73	116.80	116.89			
C12	156.2	153.6	153.6	153.6	154.45	153.98	154.05	153.85			
C13		113.9	113.9	113.9	· · ,	112.83	112.83	112.70			
C14, C18		132.7	132.7	132.7		133.16	133.16	133.30			
C15, C17		113.8	113.8	113.8		114.73	114.72	115.44			
C16		158.5	158.5	158.5		159.01	158.99	159.41			

Tabla 7.6 Desplazamientos químicos teóricos y experimentales del dímero 4[4-bromo-2,5-bis-(dodecanoxi)fenil etinilen] benzoato de bencilo 14 y de los oligómeros oFE3GBz, oFE3GCOOH y oFE3GMan.



oFE3GMan





Figura 7.25 Espectros de RMN ¹³C correspondientes al 4[4-bromo-2,5-bis-(dodecanoxi)fenilenetinilen] benzoato de bencilo 14 y a los trímeros con terminaciones glicol bencil éster (oFE3GBz), glicol carboxilo (oFE3GCOOH) y glicol manosa (oFE3GMan).

Los espectros de RMN ¹³C del mercaptobenzoxazol 16 y del difenil(2,3-dihidro-2-tioxo-3benzoxazolyl)fosfonato 17 se muestran en la figura 7.26. Iniciaremos describiendo el espectro del compuesto 16, en el cual se observa la señal correspondiente al (=C-SH) a 180.63 ppm (C1); mientras que las señales producidas por los carbonos α , β y γ al oxígeno se localizan a 148.61 (C2), 110.32 (C3) y 124.09 (C4) ppm. Por último, las señales α , β y y al nitrógeno se encuentran a 131.69 (C7), 110.91 (C6) y 125.46 (C5) ppm. Cuando el mercaptobenzoxazol 16 ha reaccionado con el clorofosfato de difenilo 15, el agente activante 17 obtenido muestra un espectro en el cual se observan las señales relacionadas a los grupos aromáticos del fosfato de difenilo, como son, la señal del carbono unido al grupo -OPO- (151.73 ppm) (C8) y las señales correspondientes a los carbonos en las posiciones orto (C9, C13), meta (C10, C12) y para (C11) a dicho grupo (120.61, 130.17 y 126.18 ppm). También pueden apreciarse las señales asociadas al C=S a 160.08 ppm (C1), así como las señales de los carbonos α , β y y al oxígeno a 152.50 (C2), 111.14 (C3) y 125.08 (C4) ppm.; al igual que las señales de los carbonos α , β y γ al nitrógeno que se localizan a 141.86 (C7), 119.99 (C6) y 125.54 (C5) ppm. Como puede notarse, los carbonos C2, C6 y C7 presentan desplazamientos significativos hacia campos bajos, como consecuencia de su proximidad al sitio donde se efectúa la reacción.



Figura 7.26 Espectros de RMN ¹³C correspondientes al mercaptobenzoxazol 16 y al difenil(2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolyl)fosfonato 17.

7.2.4 Caracterización por Ultravioleta-Visible y fluorescencia

En la figura 7.27 se reportan los espectros UV-Vis y de fluorescencia correspondientes al compuesto oFE3Man2. El espectro UV-Vis presenta dos bandas de absorción: la banda a menor longitud de onda se encuentra a 321 nm y se atribuye a las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ de los anillos sustituidos con el grupo electrón-donador dodecanoxi de acuerdo con el espectro del monómero (dato no reportado). La banda a mayor longitud de onda presenta un máximo a 381 nm y corresponde a las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ del sistema conjugado.



Figura 7.27 Espectro de absorción y de emisión del compuesto oFE3Man2 en DMF.

Los espectros de absorción de los otros oligómeros son prácticamente idénticos al de la **figura 7.27**. En **tabla 7.7** se reportan las longitudes de onda y los coeficientes de absorción molar.

Compuesto	λ (nm) e	n DMF	ε (Lg ⁻¹ cm ⁻¹)	
oFE3COOH2	317	380	68.78	
oFE3Man2	321	381	142.11	
oFE3GCOOH	314.5	375	47.81	
oFE3GMan	316	376	81	

Tabla 7.7 Longitudes de absorción y coeficientes de extinción molar de los oligómeros oFE3Bz2, oFE3COOH2, oFE3Man2, oFE3GBz, oFE3GCOOH y oFE3GMan.

La similitud existente en las propiedades de absorción entre los diferentes oligómeros indica que los grupos sustituyentes al carbonilo de la molécula como son el grupo bencílico, hidroxilo y la 4-Aminofenil α -D-manopiranósida no tienen efectos electrónicos significativos y por lo tanto sus propiedades de absorción están regidas principalmente por el sistema π conjugado. Este resultado no es sorpresivo si se toma en cuenta que tales sustituyentes no se encuentran directamente enlazados con la cadena conjugada.

Los espectros de emisión de todas las moléculas presentan una sola banda ancha debida a la emisión de la cadena conjugada así como se muestra en la **figura 7.27** para el compuesto oFE3Man2 como ejemplo. En la **tabla 7.8** se reportan las longitudes de máxima emisión de todos los compuestos así mismo el desplazamiento de Stokes (diferencia entre los máximos de absorción y de emisión). La emisión de estos compuestos se lleva a cabo en la región del azul que es una luz de elevada energía. A diferencia de los espectros de UV-Vis, en los espectros de emisión se observa un desplazamiento hacia el rojo (efecto batocrómico) de la banda de emisión de los compuestos funcionalizados con el carbohidrato manosa (oFE3Man2 y oFE3GMan) respecto a los oligómeros con terminaciones carboxilo (oFE3COOH2 y oFE3GCOOH). Puesto que no se vieron diferencias significativas en los máximos de absorción, este desplazamiento no puede ser debido a efectos electrónicos sino posiblemente a diferentes arreglos moleculares en el estado excitado, i.e. a que las moléculas con manosa presentan un estado electrónico excitado más planar (y por lo tanto más conjugado) que las correspondientes con carboxilo; como consecuencia, estos compuestos presentan un mayor desplazamiento de Stokes con respecto a los análogos con carboxilo.

Tabla 7.8 Longitudes de máxima emisión de los oligómeros oFE3COOH2, oFE3Man2, oFE3GCOOH y oFE3GMan.

Compuesto	Emisión	Desplazamiento
	λ _{máx} (nm) en DMF	de Stokes (nm)
oFE3COOH2	408	28
oFE3Man2	420.5	39.5
oFE3GCOOH	391	16
oFE3GMan	424	48

Aunque el rendimiento cuántico de estas moléculas no fue determinado, la fluorescencia que presentan los oligómeros sustituidos con manosa se puede apreciar bajo la iluminación de una

lámpara de luz ultravioleta-visible para cromatografía de capa fina y en solución. Esta observación nos indica que el efecto "quenching" de los grupos hidroxilo del carbohidrato no es suficiente para anular la emisión del sistema conjugado.

7.3 Pruebas preeliminares de reconocimiento bacteriano

El procedimiento seguido para el desarrollo de las pruebas de reconocimiento de E. coli por parte de los oligómeros de tipo fenilenetinileno sintetizados, se ha descrito detalladamente en la sección **6.5**. Este inició con el cultivo y aislamiento de la bacteria E. coli; posteriormentente, se realizaron los ensayos en los que se hizo interaccionar al oligómero con la bacteria y por último, se llevó a cabo la caracterización por microscopía óptica y de láser confocal de los frotis preparados después de efectuar los ensayos. Mientras que las soluciones se caracterizaron por espectroscopía de fluorescencia.

7.3.1. Reconocimiento de E. coli mediante el uso de los oligómeros oFE3GMan y oFE3Man2

7.3.1.1 Caracterización por microscopía óptica

En este estudio, la dispersión de la bacteria en las soluciones fue de gran importancia al comenzar las pruebas de reconocimiento. Debido a que la formación de agregados celulares durante las diversas etapas de centrifugado da lugar a resultados erróneos, si estos no son dispersados antes de los ensayos. Por tal motivo, la microscopía óptica constituyó un método rápido y sencillo para comprobar la homogeneidad de las soluciones empleadas para las pruebas. La imagen de la figura 7.28a se obtuvo a partir del frotis de una de las soluciones, la cual fue agitada hasta la disipación de los paquetes celulares. En esta imagen, las bacterias se ven como puntos negros. Cuando la misma imagen es tratada con un programa de edición de fotos (PhotoImpression) se obtiene la figura 7.28b, en la que incluso se puede apreciar la morfología que presenta la bacteria *E. coli*. Como puede comprobarse en ambas figuras, las bacterias se encuentran dispersas en la solución. La figura 7.28c muestra las imágenes de las bacterias señaladas con un círculo punteado de color blanco.



- -

Figura 7.28 Imágenes obtenidas de un frotis para verificar la dispersión de la bacteria en solución, previo al inicio de la pruebas de reconocimiento bacteriano. a) Imagen del frotis tal y como se observa en el microscopio óptico 1000X. b) La imagen modificada empleando el programa de edición de fotos PhotoImpression. c) Imágenes de las bacterias de *E. coli* señaladas con un círculo punteado de color blanco en las figuras anteriores.

Durante la etapa en la que se llevó a cabo la interacción de la bacteria con el oligómero y después del periodo de incubación, a simple vista se observaron pequeños aglomerados. Para descartar que la formación de estos aglomerados fuera debido a interacciones intercelulares, el tubo de cultivo donde se realizó la prueba fue agitado por un tiempo igual al que se utilizó para dispersar a las bacterias del control bacteriano, persistiendo la presencia de dichos aglomerados. Después de tres ciclos de centrifugado-lavado se prepararon varios frotis, los cuales también fueron examinados en el microscopio óptico. En los frotis preparados a partir de soluciones de los oligómeros oFE3Man2 y oFE3GMan, se observaron bacterias aglomeradas. En algunos casos hasta presentaban cierto ordenamiento, como se muestra en la figura 7.29b. La imagen de la figura 7.29a fue tratada de manera similar a la de la figura anterior y permite visualizar con mayor facilidad la morfología que presenta el aglomerado.
RESULTADOS Y DISCUSIONES



Figura 7.29 Imágenes de un aglomerado formado durante la interacción entre el trímero oFE3Man2 y la bacteria *E. coli.* a) Imagen del aglomerado tal y como se obtuvo con el microscopio óptico 400X. b) Imagen modificada del aglomerado empleando el programa de edición de fotos PhotoImpression.

Durante el desarrollo de los ensayos, se observó que los oligómeros bifuncionalizados con manosa (oFE3Man2) formaban aglomerados de mayor tamaño en comparación con los formados por el oligómero monofuncionalizado (oFE3GMan) (ver figura 7.30a), esto podría atribuirse a la interacción de la molécula del oFE3Man2 con las fimbrias de diferentes bacterias al tener un monosacárido en cada extremo, como puede apreciarse en la figura 7.30c. Para la molécula con una manosa, podría encontrarse un mayor número de células aisladas debido a que solo se adhiere una molécula del oligómero a cada fimbria. (Figura 7.30b).



Figura 7.30 a) Imágenes de aglomerados formados durante la interacción entre los trímeros oFE3GMan y oFE3Man2 con la bacteria *E. coli*. En donde pueden notarse las diferencias de tamaños existentes entre los aglomerados que forma cada compuesto. Imágenes obtenidas por microscopía óptica 1000X. Mecanismo propuesto para la interacción entre la adhesina FimH de la bacteria *E. coli* con los oligómeros: b) oFE3GMan y c) oFE3Man2.

7.3.1.2 Caracterización por microscopía de láser confocal

Para el análisis por microscopía de láser confocal, los frotis se observaron sin aplicar el método de tinción de Gram. Se encontró que los aglomerados presentaban regiones con alta fluorescencia y regiones obscuras como consecuencia de que la superficie examinada no es plana (figura 7.31a y 7.31b). La figura 7.31b corresponde a un aglomerado formado durante la interacción *E. coli*-oFE3GMan, en el cual se observan algunas bacterias aisladas como la que se señala en el círculo de color blanco. Al enfocar exclusivamente esta región (figura 7.31c), se puede apreciar la morfología de la bacteria mediante la fluorescencia que presenta, lo que indica que el oligómero se ha adherido a la bacteria a través de la parte carbohidratada de su estructura química.



Figura 7.31 Imágenes de los aglomerados formados durante la interacción entre los trímeros oFE3Man2 (a) y oFE3GMan (b) con la bacteria *E. coli.* (c) Imagen de la bacteria señalada con un círculo punteado de color blanco en (b), en la cual puede apreciarse la fluorescencia que esta presenta. Estas imágenes fueron obtenidas con un microscopio de láser confocal.

Como ya se había mencionado en los antecedentes, la *E. coli* se adhiere a la manosa mediante una proteína llamada FimH que se encuentra en la punta de las fimbrias tipo I de su superficie. Esta proteína posee una cavidad receptora de manosa y es ahí donde se lleva a cabo la interacción, la cual involucra la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del monosacárido y los residuos de aminoácidos de dicha cavidad. También habíamos mencionado que esta cavidad se encuentra adyacente a una región hidrófoba, lo cual favorece el acoplamiento con la parte aromática de la manosa.

7.3.1.3 Espectroscopía de UV-vis y fluorescencia

En la **figura 7.32** se observan las soluciones bajo luz ultravioleta del blanco con la bacteria (C) y las correspondientes a los oligómeros oFE3GMan y oFE2Man2, sin bacteria (A) y con bacteria (B). Como puede apreciarse en la figura, las soluciones con la bacteria unida al oligómero son tan fluorescentes como los oligómeros sin bacteria. El blanco control C no presenta fluorescencia.



Figura 7.32 Soluciones del blanco de la bacteria (C) y de los oligómeros oFE3GMan y oFE3Man2 sin bacteria (A) y con bacteria (B) bajo la lámpara de luz ultravioleta.

En la figura 7.33 se muestran los espectros de emisión de los oligómeros oFE3GMan y oFE3Man2 con la bacteria, los cuales presentan una longitud de emisión máxima de 446 y 469

nm respectivamente. En relación a los espectros de emisión de los mismos oligómeros pero sin la bacteria, estos tienen una forma similar a los presentados en esta figura, así como la misma longitud de emisión máxima. La ausencia de nuevos picos de emisión o ensanchamiento de la banda de emisión en los oligomeros probados indica que no existen interacciones π - π entre las cadenas de un mismo oligómero.



Figura 7.33 Espectros de emisión de los oligómeros oFE3GMan y oFE3Man2 con la bacteria *E. coli*.

8. CONCLUSIONES

- Se logró la síntesis de dos nuevos oligómeros del tipo fenilenetinileno portadores de uno y dos grupos terminales 4-aminofenil-α-D-manopiranósida.
- En los oligómeros derivados de la manosa sintetizados no fue necesario proteger y desproteger los grupos OH del monosacárido, simplificando así las etapas de obtención y purificación de los productos. Esto se reflejó en altos rendimientos (alrededor del 77%) y en la obtención de moléculas con los grupos OH de la manosa libres.
- La estructura química y pureza de los oligómeros así como de los productos intermediarios fue comprobada por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear ¹H y ¹³C.
- El estudio de las propiedades ópticas de los oligómeros en solución demuestra que ambos materiales emiten en la región del azul, correspondiente a una luz de alta energía. Aunque todavía no se determinó el rendimiento cuántico de estas moléculas, la fluorescencia de los oligómeros sustituidos con manosa se puede apreciar simplemente bajo la iluminación de una lámpara de luz ultravioleta-visible para cromatografía de capa fina y en solución. Esta observación nos indica que el efecto "quenching" del carbohidrato no es suficiente para anular la emisión del esqueleto conjugado.
- La presencia del monosacárido manosa, así como de sus grupos hidroxilo libres, permite la interacción de los oligómeros con la bacteria *E. coli* en medio acuoso.
- El estudio de reconocimiento molecular de *E. coli* se realizó por microscopía óptica, microscopía laser confocal y espectroscopia de fluorescencia. Por microscopía óptica se detectó la formación de agregados en la presencia de los oligomeros derivados de la manosa. La ausencia de nuevos picos de emisión o ensanchamiento de la banda de emisión en los

oligomeros probados indica que no hay interacciones π - π entre las cadenas de un mismo oligómero.

A la luz de los resultados obtenidos en este trabajo podemos considerar que oligómeros del tipo fenilenetinileno portadores de derivados aromáticos de la manosa pueden funcionar como moléculas de reconocimiento molecular selectivo para *E. coli* uropatógena.

9. TRABAJO A FUTURO

- Determinar el rendimiento cuántico de los oligómeros portadores de manosa y de sus precursores sustituidos con los grupos carboxilo para evaluar cuantitativamente el efecto "quenching" de la parte cíclica polihidroxilada de la manosa.
- Realizar los ensayos de reconocimiento molecular variando el número de células de *E.coli* y la concentración de oligómeros que permitan soportar la hipótesis aquí planteada en relación al mecanismo de interacción molecular.
- Aislar y purificar la proteína FimH componente de la fimbria tipo 1 de *E. coli*. Esta proteína contiene un dominio receptor que interacciona con la manosa. Con la proteína purificada repetir los ensayos de reconocimiento molecular utilizando los oligómeros funcionalizados con la manosa para corroborar la interacción molecular.
- Cuantificar la variación de fluorescencia de los oligómeros antes y después del reconocimiento molecular en función del número de células de *E. coli* para construir una curva de calibración que permita usar el sistema como biosensor.
- > Determinar resolución, sensibilidad y reproducibilidad del biosensor.

Tinción de Gram

Principio

La cubierta celular de una bacteria es el conjunto de capas integrales que la rodean, llamadas de manera específica membranas celulares y pared celular. Las bacterias grampositivas tienen una cubierta de dos capas que constan de una membrana citoplásmica interna y una pared celular gruesa formada por péptidoglucano. En cambio, las bacterias gramnegativas tienen una membrana citoplásmica, una pared celular delgada y una membrana externa formada por polisacárido. El fundamento de la tinción de Gram radica en la diferencia de la cantidad de lípidos que se encuentran en las dos cubiertas celulares. Cuando se agrega lugol (I2/KI) durante el procedimiento de tinción, el cristal violeta y el yodo forman complejos en el interior de la célula. Como la cubierta celular grampositiva tiene una cantidad hasta cierto punto baja de lípidos, pero una pared celular gruesa, el agente decolorante acetona-alcohol deshidrata la pared celular y atrapa los complejos cristal violeta-yodo en el interior de la célula, lo que le confiere a la bacteria un color azul o púrpura. Por el contrario, la membrana externa de una bacteria gramnegativa está formada por lípidos y lipoproteínas, y su pared celular es delgada. El decolorante extrae los lipidos de la membrana exterior sin ocasionar que la pared forme una barrera impermeable. Por lo tanto, el color sale del interior de la bacteria en este momento y por ello es necesario teñir la célula con safranina para visualizarla.40

Método de tinción

- a) Preparar el frotis, secar y fijar la bacteria en un portaobjetos.
- b) Cubrir con cristal violeta durante un minuto.
- c) Lavar suavemente con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
- d) Cubrir con lugol. El lugol actúa como mordiente aumentando la afinidad del colorante por la bacteria.
- e) Lavar con agua el exceso de lugol.

- f) Gotear alcohol-acetona de forma continua hasta que la preparación deje de perder color, lavar enseguida con agua abundante.
- g) Cubrir el frotis con safranina por un minuto.
- h) Lavar con agua y secar al aire, observar con el objetivo 40X y posteriormente con el objetivo de inmersión (100X) del microscopio óptico.

Preparación de las soluciones

1. Cristal violeta

- a) Disolver 2 g de cristal violeta en 20 ml de etanol al 95%.
- b) Disolver 0.8 g de oxalato de amonio en 80 ml de agua.
- c) Mezclar ambas soluciones perfectamente.

2. Safranina

Disolver 25 mg de safranina en 10 ml de etanol al 95%, luego adicionar 100 ml de agua y agitar. Por último filtrar la solución obtenida.

3. Lugol

Triturar finamente 1 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio en un mortero, bajo una campana de extracción. Posteriormente, añadir una pequeña cantidad de agua para lavar el material, luego adicionar agua hasta completar 300 ml y agitar.

4. Alcohol-Acetona

Mezclar 700 ml de etanol al 95% con 300 ml de acetona.

[1] Dwek, R. A. Chem. Rev. 1996, 96, 683-720. (b) Yang, Z.; Cao, Z.; Zhiyi.; Panjwani, N. Infect. Immun. 1997, 65, 439-445.

[2] Haseley, S. R. Anal. Chim. Acta 2002, 457, 39-45.

[3] Baek, M. G.; Stevens, R. C. and Charych, D. H. Bioconjugate Chem. 2000, 11, 777-788.

[4] Zhang, L. G.; Fan, Y.; Ma, B. L.; Xu, X. Y.; Kong, X. G.; Shen, D. Z.; Li, Y. J. Thin Solid Films 2002, 419, 194-198.

[5] Charych, D.; Cheng, Q.; Reichert, A.; Kuziemko, G.; Stroh, M.; O Nagy, J.; Spevak, W.; Stevens, R. Chemistry & Biology 1996, 3, 113-120.

[6] Sharon, N.; Lis, H. Scientific American 1993, 82-89.

[7] Wizemann, T. M.; Adamou, J. E.; Langermann, S. Synopses 1999, 5, 395-403.

[8] Reichert, A.; Nagy, J. O.; Spevak, W.; Charych, D. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 829-830.

[9] Krogfelt, K. A.; Bergmans, H.; Klemm, P. Infect. Immun. 1990, 58, 1995-1998.

[10] Wilson, J. W.; Schurr, M. J.; LeBlanc, C. L.; Ramamurthy, R.; Buchanan, K. L.; Nickerson, C. A. Postgrad. Med. J. 2002, 78, 216-224.

[11] Russell, P. W.; Orndorff, P. E. J. Bacteriol. 1992, 174, 5923-5935.

[12] (a) Struve, C.; Krogfelt, K. A. *Microbiology* 1999, 145, 2683-2690. (b) Lindhorst, T. K.;
Kötter, S.; Kubisch, J.; Krallmann-W., U.; Ehlers, S.; Kren, V. *Eur. J. Org. Chem.* 1998, 1669-1674.

[13] (a) Schilling, J. D.; Mulvey, M. A. J. Infect. Dis. 2001, 183, S36-S40. (b) Ponniah, S.;
Endres, R. O.; Hasty, D. L.: Abraham, S. N. J. Bacteriol. 1991, 173, 4195-4202. (c) Bullitt, E.;
Makowski, L. Biophys. J. 1998, 74, 623-632.

[14] Choudhury, D.; Thompson, A.; Stojanoff, V.; Langermann, S.; Pinkner, J.; Hultgren, S. J.; Knight, S. D. Science **1999**, 285, 1061-1066.

[15] (a) Hung, C.-S.; Bouckaert, J.; Hung, D.; Pinkner, J.; Widberg, C.; DeFusco, A.; Auguste, C.
G.; Strouse, R.; Langermann, S.; Waksman, G.; Hultgren, S. J. Mol. Microbiol. 2002, 44, 903915. (b) Schembri, M. A.; Sokurenko, E. V.; Klemm, P. Infect. Immun. 2000, 68, 2638-2646.

[16] (a) Firon, N.; Ofek, I.; Sharon, N. Infect. Immun. 1984, 43, 1088-1090. (b) Li, J.; Zacharek, S.; Chen, X.; Wang, J.; Zhang, W.; Janczuk, A.; Wang, P. G. Bioorganic & Medicinal Chemistry 1999, 7, 1549-1558. (c) Qian, X.; Metallo, S. J.; Choi, I. S.; Wu, H.; Liang, M. N.; Whitesides, G. M. Anal. Chem. 2002, 74, 1805-1810. (d) Ofek, I.; Hasty, D. L.; Sharon, N. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2003, 38, 181-191.

[17] (a) Beildeck, C.; Lucht, B. L.; Euler, W. B. Polymer Preprints 2001, 42(2), 211. (b) Heeger,
P. S.; Heeger, A. J. PNAS 1999, 96, 12219-1222.

[18] (a) Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D. *Biosens. Bioelectron.* 2002, 17, 345. (b) Arias M., E.; Arnault, J. C.; Guillon, D.; Maillou, T.; Le Moigne, J.; Geffroy, B.; Nunzy, J. M. *Langmuir* 2000, 16, 4309-4318.

[19] Wang, D.; Gong, X.; Heeger, P. S.; Rininsland, F.; Bazan, G. C.; Heeger, A. J. PNAS 2002, 99, 49-53.

[20] Borole, D. D.; Kapadi, U. R.; Mahulikar, P. P.; Hundiwale, D. G. J. Appl. Polym. Sci. 2004, 94, 1877.

[21] Nishizawa, M.; Matsue, T.; Uchida, I. Anal. Chem. 1992, 64, 2642-2644.

[22] Englebienne, P. J. Mater. Chem. 1999, 9, 1043-1054.

[23] (a) J. Campbell y G. G. Malliaras. The Chemistry, Physics and Engineering of Organic Light-Emitting Diodes, En: "Conjugated Polymers", Edit. por: G. Hadziioannou y P. F. Van Hutten, Wiley-VCH, New York, 1999, pp.411-461. (b) Friend, R. H.; Gymer, R.W.; Holmes, A.B.; Burroughes, J.H.; Marks, R.N.; Taliani, C.; Bradley, D.D.C.; Dos Santos, D.A.; Brédas, J.L.; Lögdlund, M.; Salaneck, W.R. *Nature* 1999, 397, 121.

[24] Giesa, R. Synthesis and Properties of Conjugated Poly(Aryleneethynylene)s. En: "J. M. S.-Rev. Macromol. Chem. Phys." 1996, C36(4), pp. 631-670.

[25] Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. Tetrahedron Lett. 1975, 50, 4467-4470.

[26] H. Dieck, R.F. Heck; J. Organomet. Chem. 1975, 93, 259

[27] Amatore, C.; Jutand, A.; Suárez, A. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 9531-9541.

[28] Spevak, W.; Nagy, J. O.; Charych, D. H.; Schaefer, M. E.; Gilbert, J. H.; Bednarski, M. D. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 1146-1147.

[29] Disney, M. D.; Zheng, J.; Swager, T. M.; Seeberger, P. H. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 13343-13346.

[30] (a) O'Hanley, P.; Cantey, J. R. Infect. Immun. 1978, 21, 874-878. (b) Schaeffer, A. J.;
Amundsen, S. K.; Schmidt, L. N. Infect. Immun. 1979, 24, 753-759. (c) Ofek, I.; Mosek, A.;
Sharon, N. Infect. Immun. 1981, 34, 708-711. (d) Lim, J. K; Gunther IV, N. W.; Zhao, H.;
Johnson, D. E.; Keay, S. K.; Mobley, H. L. T. Infect. Immun. 1998, 66, 3303-3310.

[31] Pine, S. H.; Hendrickson, J. B.; Cram, D. J.; Hammond, G. S. Química Orgánica, McGraw-Hill **1991**, México.

[32] Morrison, R. T.; Boyd, N. R. Química Orgánica 1990, Addison-Wesley Iberoamericana, EUA.

[33] (a) Skulski, L. Molecules 2000, 5, 1331-1371. (b) Zielinska, A.; Skulski, L. Molecules 2005, 10, 1307-1317.

[34] Vanhaecht, B.; Teerenstra, M. N.; Suwier, D. R.; Koning, C. E. Pure Appl. Chem. 2000, A37(6), 633-643.

[35] (a) Ror, R.; Das, S.K.; Santoyo-González, F.: Hernández-Mateo, F.; Dam, T.K.; Brewer, C.F. Chem. Eur. J. 2000, 6, 1-6. (b) Dondoni, A.; Marra, A.; Zampolli, M.G. Synlett 2002, 11, 1850-1854. (c) Ratner, D.M.; Plante, O.J.; Seeberger, P.H. Eur. J. org. Chem. 2002, 826-833. (d) Alzeer, J.; Vasella, A. Helvetica Chimica Acta 1995, 78, 177-193.

[36] (a) Nierengarten, J.F.; Ecker, J.F.; Rio, Y.; Carreón, M.P.; Gallani, J.L.; Guillén, D. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 9743-9748. (b) Gehringer, L.; Guillon, D.; Donnio, B. Macromolecules 2003, 36, 5593-5601. (c) Olah, G.A.; Narang, S.C.; Gupta, B.G.B.; Malhotra, R. J. Org. Chem. 1979, 44. 1247-1251.

[37] Melissaris, A.P.; Litt, M.H. J. Org. Chem. 1992, 57, 6998-6999.

[38] Ueda, M.; Kameyama, A.; Hashimoto, K. Macromolecules 1988, 21, 19-24.

[39] (a) Carey, F. A. Organic Chemistry, MacGraw-Hill 2003, 5a ed. (b) Smith, M. B.; March, J. Advanced Organic Chemistry, Wiley Interscience 2003, 5a. ed.

[40] Walker, T. S. Microbiología, MacGraw-Hill 2001, México.