



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS DE BODIPY-  
CUMARINA CON POSIBLE APLICACIÓN COMO SENSORES  
FLUORESCENTES EN CÉLULAS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**PRESENTA**

**ELIZABETH MUNGUÍA VIVEROS**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: M. en C. JOSÉ MANUEL MÉNDEZ STIVALET

**VOCAL:** Profesor: Dr. JOSÉ NORBERTO FARFÁN GARCÍA

**SECRETARIO:** Profesor: M en C. JAVIER ORDÓÑEZ HERNÁNDEZ

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Dr. JOSÉ OSCAR HUMBERTO PÉREZ DÍAZ

**2° SUPLENTE:** Profesor: Dr. HÉCTOR GARCÍA ORTEGA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA,  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA, LABORATORIO 225**

**ASESOR DEL TEMA:**

**M. en C. JAVIER ORDÓÑEZ HERNÁNDEZ**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Dr. HÉCTOR GARCÍA ORTEGA**

**SUSTENTANTE:**

**ELIZABETH MUNGUÍA VIVEROS**

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	4
<b>1.</b>	<b>Fluorescencia y fosforescencia</b>	7
	1.1 Fluorescencia de cumarinas	9
	1.2 Fluorescencia de BODIPYs	10
<b>2.</b>	<b>Sensores fluorescentes</b>	11
<b>3.</b>	<b>Rotores moleculares</b>	13
	3.1 Viscosidad	15
	3.2 Efecto de la viscosidad sobre la fluorescencia de moléculas sometidas a rotaciones internas	16
	3.3 Aplicaciones de rotores moleculares	17
<b>4.</b>	<b>Sensores fluorescentes derivados de sistemas BODIPY-Cumarina</b>	19
	4.1 Fluorescencia dentro de células	19
	4.2 Sensores de viscosidad mitocondrial	20
	4.3 Sensores de viscosidad y polaridad en respuesta al estrés del retículo endoplásmico	22
	4.4 Sensores de polaridad sensibles a la viscosidad selectiva a membrana	23
<b>5.</b>	<b>Síntesis y reacciones de BODIPYs y Cumarinas</b>	25
	5.1 BODIPYs	25
	5.1.1 Propiedades fundamentales	25
	5.2 Síntesis de BODIPYs	27
	5.2.1 Síntesis de BODIPYs simétricos	28
	5.2.1.1 Síntesis a partir de pirrol y cloruro de ácido o anhídrido	28
	5.2.1.2 Síntesis a partir de pirrol y aldehído	28
	5.2.2 Síntesis de BODIPYs asimétricos	29
	5.2.2.1 Síntesis a partir de pirrol, aldopirrol y cetopirrol	29
	5.3 Reacciones de BODIPYs	30
	5.3.1 Reacciones de sustitución electrofílica aromática ( $S_{EAr}$ )	30
	5.3.1.1 Sulfonación	30
	5.3.1.2 Nitración	30
	5.3.1.3 Halogenación	31

5.3.2	Reacciones de sustitución nucleofílica aromática (S <sub>N</sub> Ar)	31
5.3.3	Reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio	32
5.3.3.1	Acoplamiento de Sonogashira	32
5.3.3.2	Acoplamiento de Suzuki	33
5.3.3.3	Acoplamiento de Stille	33
5.3.3.4	Acoplamiento de Heck	34
5.3.3.5	Acoplamiento de Negishi	34
5.4	Cumarinas	34
5.4.1	Propiedades fundamentales	34
5.5	Síntesis de cumarinas	35
5.5.1	Síntesis de Pechman	35
5.5.2	Síntesis de Knoevenagel	36
5.5.3	Reacción de Perkin	36
5.5.4	Ciclocondensación catalizada por Pd <sup>0</sup>	37
5.6	Reacciones de cumarinas	37
<b>III.</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>40</b>
<b>IV.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>41</b>
	Instrumentación y Reactivos	41
	Síntesis	42
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
	<b>Esquema general de síntesis</b>	<b>47</b>
	<b>Espectroscopia de RMN para los compuestos 1-6</b>	<b>49</b>
	Espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H y RMN <sup>13</sup> C	49
	<b>Espectroscopia de RMN para el compuesto 7</b>	<b>58</b>
	Espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H	58
	Espectroscopia de RMN <sup>13</sup> C	59
	Espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H bidimensional HSQC	60
	Espectroscopia de RMN <sup>1</sup> H bidimensional HMBC	61
	Espectroscopia de RMN <sup>11</sup> B	63
	Espectroscopia de RMN <sup>19</sup> F	64
	<b>Espectroscopia de absorción de UV/Vis y de emisión fluorescente</b>	<b>65</b>

Espectros de absorción UV/Vis	65
Gráfica de Fluorescencia	66
<b>Análisis solvatocrómico para el compuesto 7</b>	67
<b>Análisis de emisión fluorescente para el compuesto 7 a diferente pH</b>	68
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	69
<b>VII. ANEXO</b>	70
Espectros de IR para los compuestos <b>5-7</b>	70
Espectros de masas para los compuestos <b>5-7</b>	71
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	73

## I. INTRODUCCIÓN

El término rotor molecular se usa comúnmente para describir una molécula fluorescente que tiene la capacidad de experimentar un movimiento de torsión intramolecular en el estado fluorescente excitado. Un rotor molecular consta de tres subunidades, una unidad donadora de electrones, una unidad aceptora de electrones y una unidad espaciadora rica en electrones que se encuentra constituida por un sistema de enlaces simples y dobles alternados, constituyendo un sistema *push-pull*. Este sistema contiene un grupo electrodonador y un grupo electroatractor, facilitando así el flujo de electrones y asegurando la superposición mínima de los orbitales del aceptor y donador de electrones.<sup>1</sup> En esta configuración, la molécula responde a la fotoexcitación con una transferencia de carga intramolecular (TIC) del grupo donador al aceptor. Mientras que los tres subgrupos asumen una configuración planar o casi plana en el estado fundamental, las fuerzas electrostáticas inducen un movimiento de torsión intramolecular de los subgrupos entre sí.<sup>2</sup> La molécula entra en un estado no plano (torcido) con una energía de estado excitado inferior, y la relajación del estado torcido se asocia con una emisión de fluorescencia desplazada hacia el rojo o relajación no fluorescente, dependiendo de la estructura molecular. Una de las aplicaciones de los rotores moleculares es como sensores fluorescentes.<sup>3,4</sup>

La viscosidad intracelular es un parámetro físico fundamental que indica el funcionamiento de las células. Además, influye en la difusión de procesos biológicos, como la apoptosis celular, el transporte de solutos y otros organelos celulares.<sup>5</sup> Se ha demostrado que los cambios anormales de la viscosidad intracelular están relacionados con una gran variedad de enfermedades y patologías, como son las infecciones e infartos<sup>6</sup>, hipertensión<sup>7</sup>, envejecimiento normal<sup>8</sup> y, además, uno de los efectos adversos del tabaquismo es la elevada viscosidad plasmática<sup>9</sup>, que puede ser el vínculo entre el consumo de cigarrillos y las enfermedades cardiovasculares.<sup>10</sup> En vista del importante papel de la viscosidad celular en el funcionamiento celular y las condiciones patogénicas, es necesario el desarrollo de sensores de viscosidad celular, para comprender la cinética de la reacción intracelular y el desarrollo de estrategias de investigación biológica y de diagnóstico clínico.

La imagenología de fluorescencia, es una técnica para estudiar sistemas biológicos en células vivas debido a su alta sensibilidad y fácil visibilidad. Actualmente, para

determinar la viscosidad celular se emplean rotores moleculares, utilizando la intensidad de emisión de fluorescencia, para el desarrollo de sensores de microviscosidad.<sup>5,11</sup> La mayoría de estas moléculas fluorescentes, se encuentran basadas en un mecanismo de transferencia de carga intramolecular (TIC). Sin embargo, la mayoría de estos sensores muestran una distribución intracelular no específica, lo que dificulta determinar cambios en la viscosidad de organelos específicos. Con el fin de monitorear estos cambios, se requieren nuevos métodos con maneras simples y eficientes de diseñar sensores de viscosidad fluorescente. La eficiencia del rotor se ha convertido en un obstáculo en el desarrollo de sensores de viscosidad.

Por otro lado, para el estudio de la integridad celular, se ha empleado el uso del pH, la célula en su homeostasis posee un pH ~7, pero se ha descrito que la acidificación del medio en el que se encuentra es debido a la presencia de cáncer u otras enfermedades degenerativas. Uno de los organelos celulares mayormente estudiados es la mitocondria, esto por su importancia en el funcionamiento celular, debido que tiene una gran regulación en la oxigenación y metabolismo celular, posee una matriz alcalina (pH ~8), por lo que es de gran interés el poder monitorear la integridad de la mitocondria. Una de las herramientas más atractivas para la medicina es el uso de la fluorescencia a través del pH, por lo que se requieren moléculas que sean sensibles a la variación del pH y su fluorescencia se vea modulada al cambio de éste, facilitando así el monitoreo celular.

En la actualidad, existe una necesidad continua y urgente del desarrollo de nuevos sensores fluorescentes, fáciles de sintetizar y de bajo costo. Los compuestos BODIPY-Cumarina se emplean como sensores de fluorescencia y viscosidad, debido a sus altos coeficientes de absorción molar, amplios rendimientos cuánticos y su sensibilidad al pH, a la polaridad y a la viscosidad del medio. Los datos experimentales muestran que, al incrementar la viscosidad del disolvente, la intensidad de fluorescencia del compuesto BODIPY-Cumarina aumenta. Este comportamiento sensible a la viscosidad ofrece una amplia gama de aplicaciones, por ejemplo, en mecánica de fluidos, química de polímeros, fisiología celular y ciencias alimentarias.<sup>11</sup> Se ha demostrado que los compuestos derivados de BODIPY-Cumarina son adecuados para tener una imagen de fluorescencia en células vivas, teniendo un efecto citotóxico bajo y buena estabilidad interna.



Por lo que en este trabajo presentamos la síntesis y las propiedades fluorescentes de un compuesto *push-pull* derivado de BODIPY-Cumarina con la finalidad de poderlo aplicar como un sensor fluorescente en células.

La arquitectura del derivado BODIPY-Cumarina está basado en un sistema *push-pull* en donde el grupo dietilaminocumarina funciona como grupo electrodonador, mientras que el núcleo del BODIPY actúa como electroattractor, ambos núcleos poseen propiedades fluorescentes y se encuentran conectados por medio de un enlace triple carbono-carbono y un núcleo de tiofeno, este espaciador le confiere propiedades de rotor molecular ayudando a que la fluorescencia dependa de la viscosidad del medio, ya que en sistemas poco viscosos la fluorescencia es baja debido a que la molécula puede girar libremente, y en sistemas más viscosos la fluorescencia debe aumentar debido a que la rotación está restringida y puede haber una mayor transferencia de carga intramolecular.

## II. ANTECEDENTES

La palabra luminiscencia proviene del Latín (*lumen* = luz). El primero en introducir el término luminiscencia en la historia fue el físico Eilhardt Wiedemann (1888). La luminiscencia se ha considerado como una luz fría, contrario a la incandescencia que se considera como luz caliente. La luminiscencia se define como: una emisión espontánea de radiación proveniente de especies electrónicamente excitadas o de especies que provienen de un estado vibracional excitado que no se encuentran en un equilibrio térmico dentro de su micromambiente<sup>12</sup>. Hay varios tipos de luminiscencia que se encuentran clasificados acorde al modo de excitación.

Tabla 1. Tipos de luminiscencia.<sup>13</sup>

Fenómeno	Modo de excitación
Fotoluminiscencia (fluorescencia, fosforescencia, fluorescencia retardada)	Absorción de luz (fotones)
Radioluminiscencia	Radiación ionizante (rayos-x, $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )
Catodoluminiscencia	Rayos catódicos (haces de electrones)
Electroluminiscencia	Campo electrónico
Termoluminiscencia	Calentamiento previo al almacenamiento de energía (ej. Irradiación radioactiva)
Quimioluminiscencia	Reacción química (ej. Oxidación)
Bioluminiscencia	Reacción bioquímica <i>In vivo</i>
Triboluminiscencia	Fuerzas de fricción y electrostáticas
Sonoluminiscencia	Ultrasonido

Los compuestos luminiscentes pueden ser de diferentes tipos:

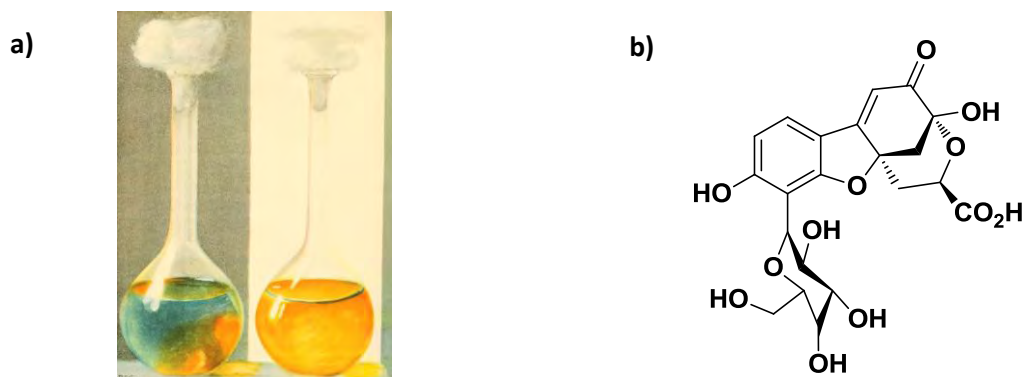
- ❖ Compuestos orgánicos: hidrocarburos aromáticos (naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno, etc.) y derivados, colorantes (fluoresceína, rodaminas, cumarinas, oxazinas), polienos, difenilpolienos, algunos aminoácidos (Trp, Tir, Fen), etc.
- ❖ Compuestos inorgánicos: ion uranil ( $\text{UO}_2^+$ ), iones lantánidos ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ), vidrios dopados (ej. con Nd, Mn, Ag), cristales (ZnS, CdS, ZnSe), nanocristales semiconductores, cúmulos metálicos, nanotubos de carbono y algunos fullerenos, etc.

- ❖ Compuestos organometálicos: complejos metalados de porfirina, complejos con rutenio, cobre, con iones lantánidos, con agentes quelantes fluorogénicos (oxína), etc.

Los aspectos teóricos y experimentales de la fluorescencia y fosforescencia fueron comprendidos después del surgimiento de la teoría cuántica.

El término fosforescencia proviene del Griego:  $\phi\omega\varsigma$  = luz (caso genitivo:  $\phi\omega\tau\omicron\varsigma$  → fotón) y  $\phi\omicron\phi\epsilon\iota\nu$  = llevar. Por lo que la palabra fósforo significa “que lleva luz”.

En contraste con la fosforescencia, la etimología de fluorescencia no es tan obvia. El término fluorescencia fue introducido por Sir. George Gabriel Stokes. Pero antes de que Stokes pudiera explicar éste término, la primera observación impresa de la fluorescencia fue realizada por un médico español, Nicolás Monardes (1565). Informó sobre el maravilloso color azul peculiar (Figura 1)<sup>14,15</sup> de una infusión de una madera traída de México usada para tratar enfermedades renales y urinarias: palo para los males de los riñones y de orina (más tarde llamado *Lignum nephriticum*). Esta madera, cuyo peculiar efecto de color y propiedades diuréticas ya eran conocidas por los aztecas, era una medicina escasa y costosa. Por lo tanto, era interesante detectar la madera no auténtica. Este método para la detección de un objeto falsificado puede considerarse como la primera aplicación del fenómeno que más tarde se denominaría fluorescencia. La especie química responsable de la intensa fluorescencia azul se identificó recientemente en una infusión de *Lignum nephriticum* (*Eysenhardtia*): una tetrahidrometano-benzofuro[2,3-d]oxacina (matlalina) de cuatro anillos. Este compuesto no está presente en la planta, pero es el producto final de una oxidación espontánea de al menos uno de los flavonoides del árbol.



**Figura 1.** a) Comparación del agua que pinta la madera de la que no auténtica, si pintaba de color azul el agua era auténtica y si era amarilla el agua, no era genuina. b) Estructura química de la matlalina.

En contraste con la incandescencia (luz emitida por los cuerpos calentados a altas temperaturas), la luminiscencia como la fluorescencia y la fosforescencia, no requiere altas temperaturas y generalmente no produce calor notable. Este tipo de emisión se denominó "luz fría" por esta razón. Tal luz fría fue objeto de una interesante polémica en el siglo XIX. La primera distinción teórica entre fluorescencia y fosforescencia fue proporcionada por Francis Perrin en su tesis doctoral<sup>16</sup>: "Si las moléculas pasan, entre absorción y emisión, a través de un estado intermedio estable o inestable, hay fosforescencia".

Para describir los procesos posteriores a la absorción de luz por una molécula, se encontró conveniente usar un diagrama de energía en el que los estados electrónicos de la molécula están representados junto con flechas que indican las posibles transiciones entre ellas. La Figura 2 muestra un diagrama simplificado, llamado diagrama de Jablonski (Aleksander Jablonski).<sup>17,18</sup> Jean Perrin usó un diagrama de niveles de energía que muestra la absorción y emisión de la luz, donde se explica correctamente el fenómeno de la fluorescencia retardada activada térmicamente incluyendo un estado metaestable en su diagrama.<sup>19-20</sup>

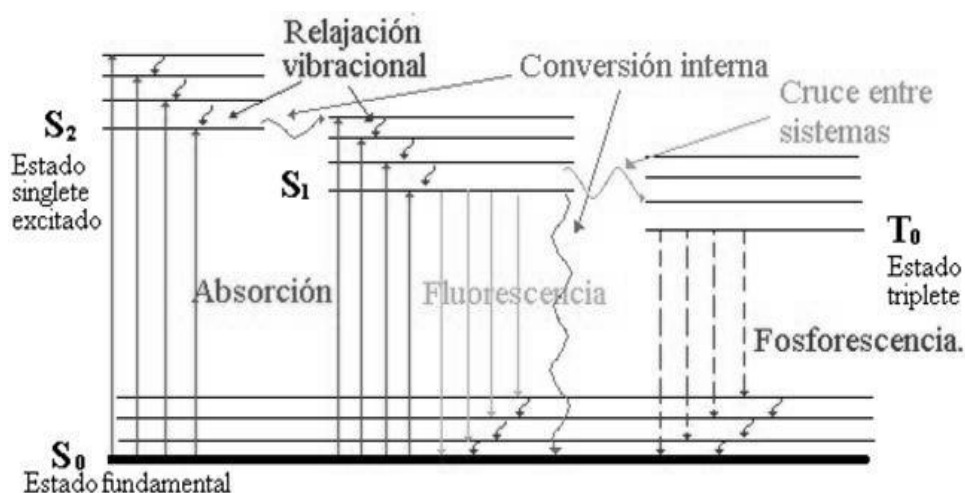


Figura 2. Diagrama de Jablonski.

El diagrama de Jablonski permite visualizar los procesos de una molécula asociados a la irradiación con luz: absorción fotónica y excitación del estado fundamental (S<sub>0</sub>) a un nivel energético electrónico o rotacional superior (S<sub>1</sub>), y recuperación del estado fundamental S<sub>0</sub> a través de diferentes estados electrónicos singlete S<sub>1</sub> y/o triplete T<sub>1</sub>, con emisión de fluorescencia o fosforescencia<sup>21</sup>.

David Brewster explicó la fluorescencia de manera general como una dispersión de luz por partículas diminutas en suspensión. La fluorescencia observada fue considerada por él, como un fenómeno superficial y lo llamó dispersión epipólica, también encontró que la fluorescencia no estaba polarizada. En 1920 Weigert encontró que la fluorescencia de colorantes disueltos en disolventes viscosos como el glicerol estaba parcialmente polarizada: "El grado de polarización de la luz fluorescente aumenta con el aumento de la masa molecular, con el incremento de la viscosidad del medio, con la disminución de la temperatura y también con la reducción de la movilidad de la partícula."<sup>22</sup>

### 1. Fluorescencia y fosforescencia

En todo el contexto histórico teórico y experimental, se dan a conocer las definiciones de fluorescencia y fosforescencia, tal como se describen en el *Glosario de Términos Utilizados en Fotoquímica* publicado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada<sup>12</sup> son las siguientes:

**Fluorescencia:** Emisión espontánea de radiación (luminiscencia) de una entidad molecular excitada con retención de la multiplicidad de espín.

**Fosforescencia:** Fenomenológicamente, término utilizado para describir la luminiscencia de larga vida. En la fotoquímica mecanicista, el término designa la luminiscencia que implica el cambio en la multiplicidad del giro, típicamente del triplete al singlete o viceversa.

Cabe mencionar que estas definiciones se aplican a las moléculas orgánicas y pueden ser aplicadas a otras especies como nanocristales, semiconductores y nanopartículas metálicas que poseen gran interés debido a sus diferentes aplicaciones.

En términos generales, la fluorescencia es una emisión de un estado excitado que puede alcanzarse por fotoexcitación directa, mientras que la fosforescencia es emitida desde otro estado excitado, con una correspondiente transición radiativa. La irradiación crea electrones y agujeros. Cuando un electrón y un agujero se recombinan inmediatamente, la luz emitida puede llamarse fluorescencia. Pero no se recombinan rápidamente si están atrapados en algunos estados metaestables, entonces, la liberación de las trampas requiere energía, y la recombinación subsiguiente es

acompañada por la emisión de un fotón. En ese caso, la emisión se llama fosforescencia y depende de la temperatura en contraste con la fluorescencia. Esta distinción basada en la temperatura entre la fluorescencia y la fosforescencia no se aplica a las especies orgánicas para las cuales el rendimiento cuántico de la fluorescencia depende de la temperatura.

Una de las características de la fluorescencia es que depende fuertemente de la naturaleza y estructura química de las moléculas orgánicas. La mayoría de los compuestos fluorescentes son aromáticos. Generalmente, al incrementar el sistema  $\pi$ -electrónico (grado de conjugación) conduce a un desplazamiento de los espectros de absorción y fluorescencia a longitudes de onda más larga. Esta simple regla es ilustrada por la serie de los HPA (hidrocarburos policíclicos aromáticos) como el naftaleno, antraceno, pentaceno, etc., pueden emitir fluorescencia en diferentes regiones del UV. El incremento progresivo en el número de electrones  $\pi$  es acompañado por un aumento concomitante en las longitudes de onda de absorción y de emisión. Las transiciones más bajas de los hidrocarburos aromáticos son las del tipo  $\pi$ - $\pi^*$ , que se caracterizan por altos coeficientes de absorción molar y vida de fluorescencia relativamente altos.

Los sustituyentes como -OH, -NH<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, etc., alteran el color debido a cambios inducidos en el espectro de absorción. Este efecto se llama efecto auxocrómico, y a los sustituyentes auxocrómos. Cuando un cromóforo es fluorescente, se llama fluoróforo. Tanto la naturaleza como la posición de un sustituyente pueden modificar las características de absorción y fluorescencia.

La presencia de átomos pesados (por ejemplo, Br y I) como sustituyentes en moléculas aromáticas, da como resultado una mitigación en la fluorescencia (efecto de átomo pesado interno) debido a la mayor probabilidad de cruce entre sistemas. Sin embargo, el efecto del átomo pesado puede ser pequeño para algunos hidrocarburos aromáticos si el rendimiento cuántico de fluorescencia es muy bajo de manera que el aumento de la eficiencia del cruce entre sistemas es relativamente pequeño.

En general, la sustitución con grupos donadores de electrones induce un aumento en el coeficiente de absorción molar y un cambio en los espectros de absorción y fluorescencia. Además, estos espectros son amplios y a menudo no estructurados en comparación con los hidrocarburos aromáticos de los que provienen. La presencia de

pares de electrones sin compartir en los átomos de oxígeno y nitrógeno no cambia la naturaleza  $\pi$ - $\pi^*$  de las transiciones de la molécula.

Si por razones estéricas, el grupo  $-\text{NH}_2$  se encuentra fuera del plano del anillo aromático, el grado de conjugación de los orbitales está disminuido, pero las transiciones correspondientes a la promoción de un electrón de un orbital  $\sigma$  a un orbital  $\pi^*$  son todavía diferentes (en particular más intensas) a las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  que implican los pares de electrones sin compartir de un grupo carbonilo o nitro. Las características de absorción y emisión de fenoles y aminas aromáticas dependen del pH.

Las propiedades de fluorescencia de los compuestos aromáticos con grupos carbonilo son complejas. Muchos aldehídos y cetonas aromáticas tienen un estado excitado  $n$ - $\pi^*$  de baja incidencia y, por lo tanto, exhiben bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia.

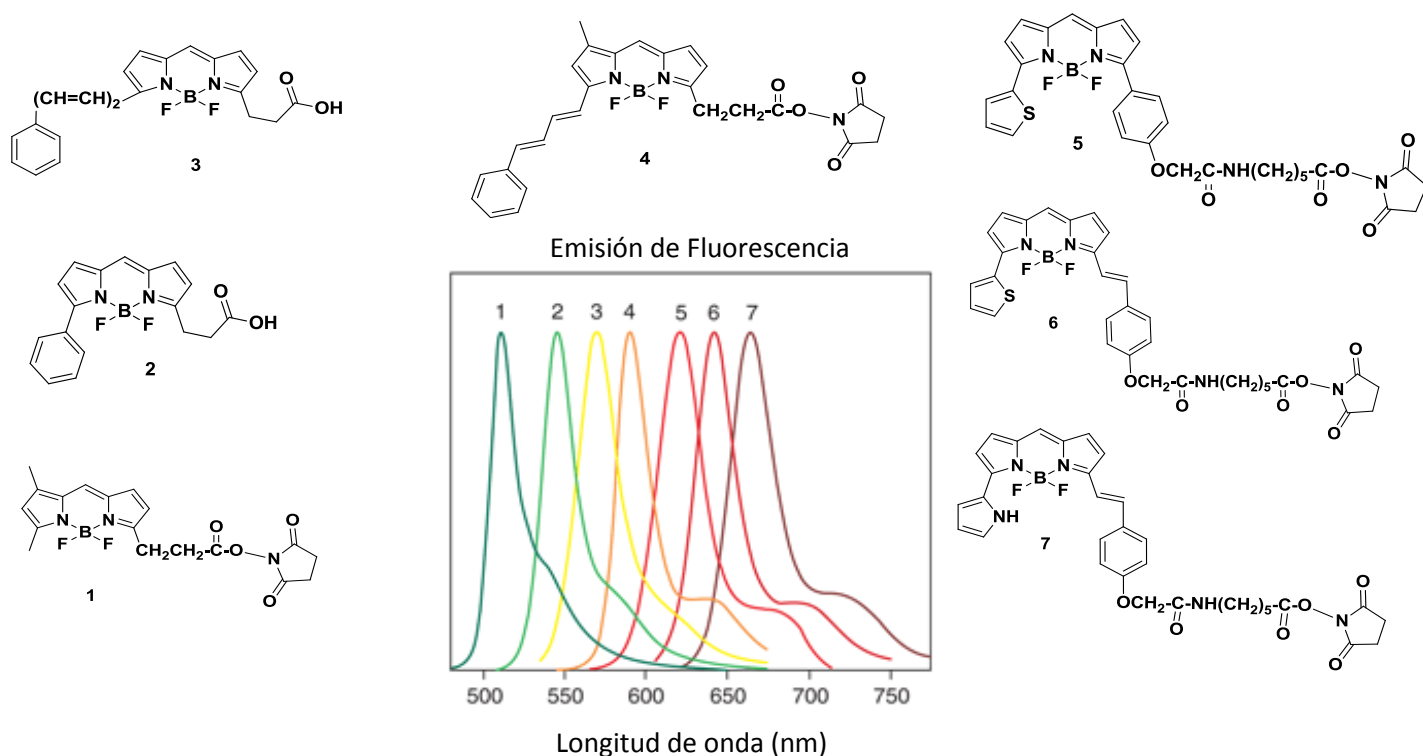
Sin embargo, si un estado  $n$ - $\pi^*$  se encuentra ligeramente más alto en energía, el rendimiento cuántico de fluorescencia depende fuertemente de la polaridad del disolvente. De hecho, en algunos disolventes, la energía del estado  $n$ - $\pi^*$  puede llegar a ser inferior a la del estado  $\pi$ - $\pi^*$ . Cuando aumenta la polaridad y la fuerza de enlace por ejemplo en interacciones tipo puente de hidrógeno del disolvente, el estado  $n$ - $\pi^*$  se desplaza a una energía más alta, mientras que el estado  $n$ - $\pi^*$  cambia a una energía más baja. Por lo tanto, se puede observar fluorescencia intensa en disolventes polares y fluorescencia débil en disolventes no polares (por ejemplo, xantona).

### 1.1 Fluorescencia de cumarinas

Las cumarinas tienen rendimientos cuánticos bajos, pero una sustitución apropiada conduce a compuestos fluorescentes que emiten en la región azul-verde (400-550 nm). Las 7-hidroxycumarinas son muy sensibles al pH, pueden usarse como sensores fluorescentes de pH. Las 7-aminocumarinas son de particular interés porque poseen un grupo donador de electrones (grupo amino) conjugado a un grupo aceptor de electrones (grupo carbonilo). Esto da lugar a una transferencia de carga fotoinducida.

## 1.2 Fluorescencia de BODIPYs

Los compuestos de la serie BODIPY (abreviatura de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) tienen una estructura de tipo indaceno. Puede considerarse como un colorante de monometina cianina rigidizado mediante la introducción de un grupo de unión entre los dos átomos de nitrógeno. La estructura difluoro de dipirrometeno de boro resultante es bastante rígida, lo que conduce a rendimientos cuánticos de fluorescencia elevados. La versatilidad de la familia BODIPY es excepcional. Los derivados sustituidos con alquilo tienen una fluorescencia verde similar a la fluoresceína. La sustitución por unidades conjugadas en uno o ambos grupos pirrol, provoca la extensión de la conjugación de los electrones  $\pi$  a lo largo del esqueleto orgánico. El máximo de emisión se desplaza a longitudes de onda más largas (Figura 3)<sup>23</sup>.



**Figura 3.** Espectros de fluorescencia de 7 fluoróforos derivados de BODIPY en MeOH.

Las emisiones de longitudes de onda máximas superiores a 750 nm son incluso posibles. Los BODIPYs ofrecen muchas ventajas: altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, grandes coeficientes de absorción molar ( $40,000 - 10,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), buena solubilidad y excelente estabilidad térmica, química y fotoquímica. Debido a que no se ven afectados por efectos ambientales (polaridad, pH) son adecuados como



marcadores biológicos. De hecho, se utilizan comúnmente para marcar aminoácidos, nucleótidos y otros ligantes de baja masa molecular.

## 2. Sensores fluorescentes

Parámetros como polaridad, viscosidad, temperatura y presión desempeñan un papel importante en diversos procesos físicos, químicos, bioquímicos y biológicos. En muchos casos, la emisión de fluorescencia se ve afectada por estos parámetros que pueden ser, en principio, estimados gracias a moléculas fluorescentes apropiadamente elegidas que actúan como sensores. Los cambios drásticos en el espectro de fluorescencia pueden de hecho ser inducidos por enlaces de hidrógeno.

Los fluoróforos sometidos a transferencia de carga intramolecular fotoinducida (TCF) son buenos candidatos como sensores de polaridad. Uno de los sensores de polaridad más conocido es ANS (1-anilino-8-naftalenosulfonato). Presenta la interesante característica de ser no fluorescente en disolventes polares y altamente fluorescente en disolventes de baja polaridad. Esta característica permite la visualización selectiva de regiones hidrófobas de sistemas biológicos sin interferencia de moléculas de ANS no fluorescentes que permanecen en el entorno acuoso circundante.

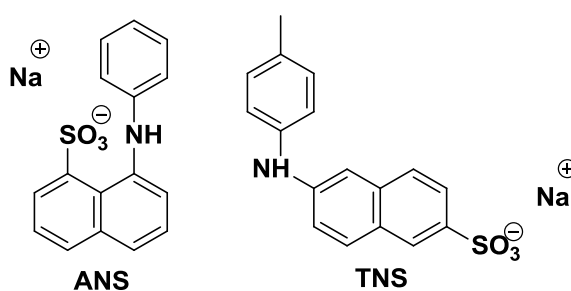
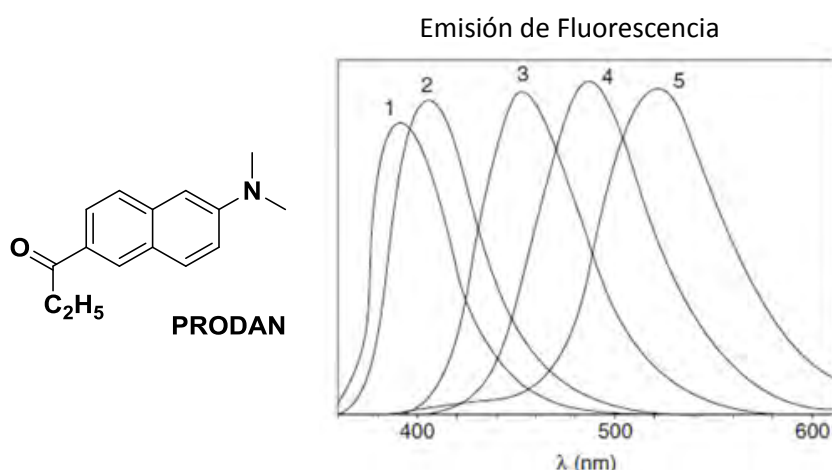


Figura 4. Estructuras del ANS y TNS.

El ANS y su derivado TNS<sup>24</sup> (sulfonato de *p*-toluidinil-6-naftaleno) Figura 4, se han utilizado extensivamente para el sondeo de proteínas, membranas biológicas y sistemas micelares. Las razones por las que estos sensores experimentan grandes variaciones en la fluorescencia con la polaridad del disolvente han sido objeto de numerosas investigaciones centradas en la transferencia de carga intramolecular, interacciones disolvente-soluto específicas, cambio en la conformación molecular, y fotoionización monofotónica. Varios de estos procesos pueden ser competitivos y es

difícil determinar cuál es el predominante. Un sensor de polaridad ideal basado en la transferencia fotoinducida de carga y la relajación del disolvente deberá (i) experimentar un cambio grande en el momento dipolar en la excitación, pero sin cambio de dirección; (ii) no soportar carga permanente para evitar contribuciones de interacciones iónicas; y (iii) ser solubles en disolventes de polaridad diversa, desde los disolventes apolares hasta los más polares. En contraste con el ANS, el PRODAN (6-propionil-2-dimetilaminonaftaleno) no soporta una carga y cumple la mayoría de los requisitos descritos. La Figura 5 muestra los espectros de fluorescencia del PRODAN en diversos disolventes<sup>27</sup>. Una alta sensibilidad a la polaridad explica el éxito del PRODAN en el estudio de la polaridad de diversos sistemas químicos y biológicos (sitios de unión a proteínas, membranas fosfolipídicas, etc.). El origen de esta sensibilidad se asignó inicialmente a un gran aumento en el momento dipolar a la excitación, pero esta explicación se encontró que no era correcta.



**Figura 5.** Espectro de fluorescencia del PRODAN en 1) ciclohexano, 2) clorobenceno, 3) DMF, 4) EtOH, y 5) H<sub>2</sub>O.

Los sensores de transferencia de carga intramolecular torcida (TCIT) pueden usarse como sensores de polaridad<sup>28</sup>. Un compuesto TCIT clásico que exhibe fluorescencia dual, es el DMABN. La banda de longitud de onda larga (correspondiente a la emisión del estado TCIT) se desplaza hacia el rojo cuando aumenta la polaridad del disolvente, con un aumento concomitante en la relación de las dos bandas, lo que ofrece la posibilidad de mediciones ratiométricas. Algunos sistemas bicromofóricos, cuya estructura se basa en el principio donador-puente-aceptor, puede someterse a la transferencia de carga completa, es decir, la transferencia de electrones. El enorme momento dipolar resultante en el estado excitado explica la alta sensibilidad a la polaridad del disolvente de tales moléculas.

En la tabla 2 se muestran los métodos de fluorescencia que permiten evaluar la fluidez de un microambiente por medio de un sensor fluorescente.<sup>29</sup>

**Tabla 2.** Técnicas de fluorescencia.

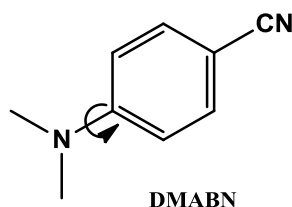
<b>Técnica</b>	<b>Características de fluorescencia</b>	<b>Fenómeno</b>
Rotores moleculares	Rendimiento cuántico de fluorescencia y/o vida útil	Movimiento interno de torsión
Formación de excímeros	Espectro de fluorescencia	-----
1) intermolecular	Relación de bandas de excímero y monómero	Difusión traslacional
2) intramolecular	Relación de bandas de excímero y monómero	Difusión rotacional interna
Enfriamiento por fluorescencia	Rendimiento cuántico de fluorescencia y/o vida útil	Difusión traslacional
Polarización de fluorescencia	Anisotropía de emisión	Difusión de rotación de toda la sonda

La viscosidad es un parámetro macroscópico y los intentos de obtener valores absolutos de la viscosidad de un medio a partir de mediciones usando un sensor fluorescente no son posibles en la mayoría de los casos. El término microviscosidad se utiliza a menudo, pero de nuevo no se pueden dar valores absolutos, y lo mejor que se puede hacer es hablar de una viscosidad equivalente, es decir, la viscosidad de un medio homogéneo en el que la respuesta del sensor es la misma. Sin embargo, se plantea una dificultad en cuanto a la elección del disolvente de referencia porque la velocidad de relajación rotacional de un sensor en diversos disolventes de la misma viscosidad macroscópica depende de la naturaleza del disolvente (estructura química y posible orden interno).

### 3. Rotores moleculares

La excitación de un fluoróforo induce el flujo de los electrones de un orbital a otro. Si los orbitales inicial y final están separados, la transición electrónica se acompaña de un cambio casi instantáneo en el momento dipolar del fluoróforo. Cuando este último posee un grupo donador de electrones (ej., -NH<sub>2</sub>, -N(Me)<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>) conjugado a un grupo aceptor de electrones (ej., -C=O, -CN), el aumento en el momento dipolar puede

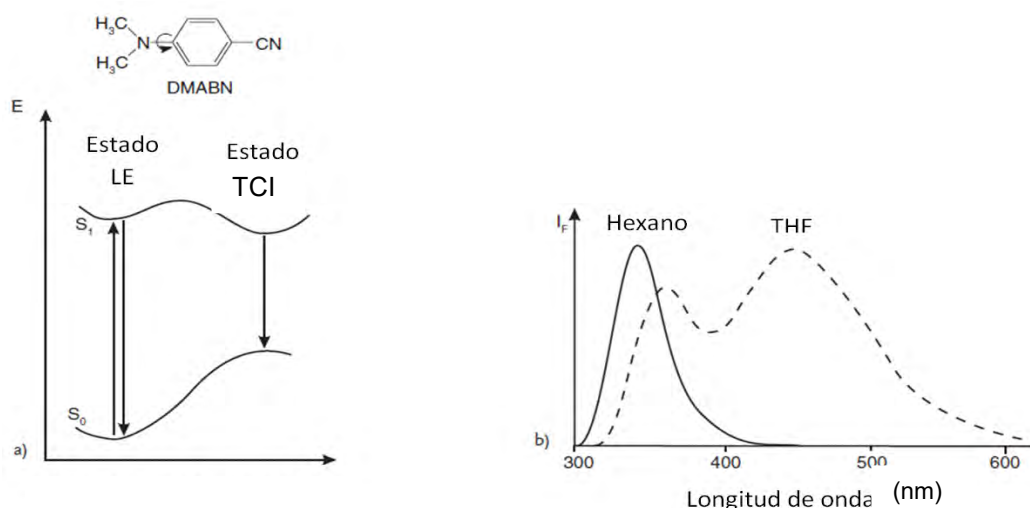
ser bastante grande. En consecuencia, el estado excitado alcanzado no se encuentra en equilibrio con las moléculas del disolvente donde se encuentra, si éstas son polares. En un medio que es suficientemente fluido, las moléculas de disolvente se mueven durante el estado excitado hasta que la esfera de solvatación está en equilibrio termodinámico con el fluoróforo. Un estado de TCI relajado se alcanza entonces. Tal relajación del disolvente, explica el aumento del desplazamiento al rojo del espectro de fluorescencia a medida que aumenta la polaridad del disolvente. Además, cuando un receptor catiónico está unido a un fluoróforo de transferencia de carga intramolecular de manera que el catión enlazado puede interactuar con el grupo donador o con el grupo aceptor, el TCI es perturbado; La relajación hacia un estado de TCI puede ir acompañada de una rotación interna dentro del fluoróforo. El principal ejemplo de gran interés es el 4-*N,N*-dimetilaminobenzonitrilo (DMABN), Figura 6.



**Figura 6.** Estructura del 4-*N,N*-dimetilaminobenzonitrilo (DMABN).<sup>24</sup>

Esta molécula ha sido objeto de muchos estudios porque, a pesar de su simplicidad, exhibe fluorescencia dual en disolventes polares. En el estado fundamental, la molécula es casi plana, lo que corresponde a la conjugación máxima entre el grupo dimetilamino y el anillo de fenilo. Según el principio de Franck-Condon, el estado localmente excitado (LE) es todavía plano, pero la relajación del disolvente tiene lugar con una rotación concomitante del grupo dimetilamino hasta que se gira en ángulos rectos y se pierde la conjugación. El estado de transferencia de carga intramolecular torcida resultante, es estabilizado por las moléculas del disolvente polar y existe una separación de carga total entre el grupo dimetilamino y el resto cianofenilo.

Además de la banda de fluorescencia debido a la emisión del estado LE (banda "normal"), se observa una banda de emisión correspondiente a la emisión del estado TCIT a longitudes de onda más altas (banda "anómala") Figura 7.<sup>24</sup> Por lo que DMABN muestra fluorescencia LE y TCIT.



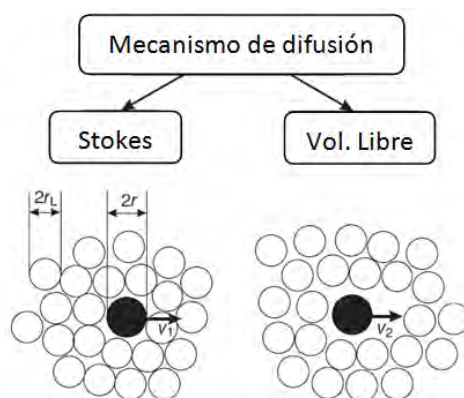
**Figura 7.** Diagrama de energía potencial de DMABN; (a) Contiene tanto la relajación del disolvente como la rotación del grupo dimetilamino. (b) Espectro de fluorescencia a temperatura ambiente en hexano y tetrahidrofurano.

La rotación interna que acompaña a la relajación del disolvente o no, puede ocurrir en muchos fluoróforos, pero la doble fluorescencia y la torsión en ángulo recto (necesaria para la separación completa de la carga) son excepcionales. Cuando hay posibilidad de rotación interna en una molécula excitada, la interpretación de las propiedades fotofísicas se hace difícil.

La transferencia de carga intramolecular y la rotación interna también pueden ocurrir en moléculas no polares y altamente simétricas. El rendimiento cuántico de fluorescencia depende, por tanto, de la viscosidad del disolvente. Hay compuestos que son débilmente fluorescentes en disolventes fluidos, pero altamente fluorescentes en medios viscosos o rígidos.

### 3.1 Viscosidad

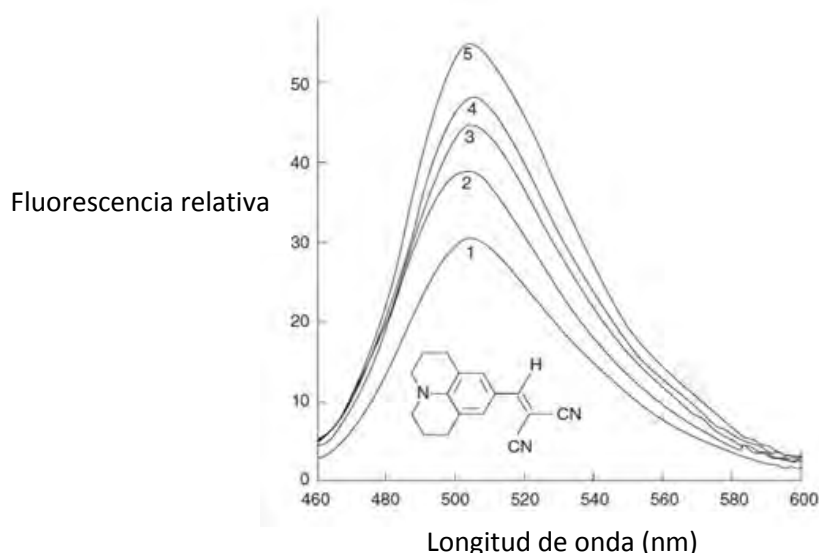
La viscosidad del disolvente tiene un efecto sobre las características de fluorescencia de las moléculas que experimentan rotación interna (rotadores moleculares). Una aproximación microscópica al problema de la viscosidad, tiene en cuenta el espesor finito de las capas de disolvente y la existencia de orificios en el disolvente (volumen libre). Entonces, una molécula de soluto se mueve de acuerdo con dos procesos de difusión: un proceso viscoso con desplazamiento de moléculas de disolvente (difusión de Stokes) y un proceso asociado con la migración en los orificios del disolvente (difusión de volumen libre), como se ilustra en la Figura 8.<sup>25</sup>



**Figura 8.** Stokes y el proceso de difusión traslacional del volumen libre. Círculos negros: moléculas de soluto. Círculos blancos: moléculas de disolvente.

### 3.2 Efecto de la viscosidad sobre la fluorescencia de moléculas sometidas a rotaciones internas

En la mayoría de los estudios en disolventes de media o alta viscosidad, se observó que los rendimientos cuánticos de fluorescencia aumentan en función de la viscosidad del disolvente. Un ejemplo se muestra en la Figura 9, el caso del *p*-*N,N*-dimetilaminobencilidenmalononitrilo.<sup>26</sup>



**Figura 9.** Espectro de fluorescencia del *p*-*N,N*-dimetilaminobencilidenmalononitrilo en etilenglicol/glicerol a 25 °C variando la viscosidad. 1) 7:3 (49 cP), 2) 5:5 (115 cP), 3) 4:6 (163 cP), 4) 3:7 (245 cP), 5) 2:8 (391 cP).

En disolventes de muy baja viscosidad, el rendimiento cuántico de fluorescencia alcanza un valor mínimo que no depende del disolvente. En medios de viscosidad

extremadamente alta, la velocidad de desexcitación no radiativa debida a la rotación interna se hace insignificante y el rendimiento cuántico de fluorescencia tiene el valor más alto posible. En el caso de viscosidades intermedias, se pueden usar rotores moleculares para estimar la fluidez del medio. Los experimentos de fluorescencia basados en rotores moleculares revelan que la fluorescencia decae no únicamente por las interacciones del disolvente incluyendo los dos procesos de la difusión (Stokes y volumen libre), sino también por interacciones dieléctricas y posiblemente interacciones específicas.

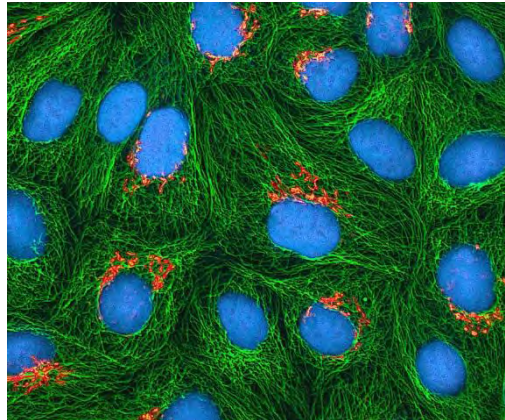
### 3.3 Aplicaciones de los rotores moleculares

Desde el punto de vista práctico, los rotores moleculares son muy convenientes para monitorear los cambios relativos en la fluidez de un medio a través de medidas de intensidad de fluorescencia en un estado estacionario. Cuando se mide la intensidad de fluorescencia concomitante con un cambio en la fluidez, se debe prestar atención a otras causas de cambios en la intensidad de fluorescencia tales como cambios en la concentración de la sonda o propiedades del fluido. A este respecto, los rotores moleculares como DMABN que presentan doble fluorescencia ofrecen la ventaja de una calibración interna, gracias a una medición ratiométrica de las intensidades de fluorescencia al máximo de las dos bandas. Se puede obtener información sobre la fluidez de la membrana celular, el citoplasma y el citoesqueleto. Curiosamente, los cambios en la viscosidad de la membrana celular están a menudo relacionados con procesos fisiológicos que están relacionados con enfermedades (diabetes<sup>36</sup>, enfermedad de Alzheimer<sup>37</sup>, trastornos hepáticos) o envejecimiento.

Por lo que el éxito de la fluorescencia como herramienta de investigación en el estudio de la estructura y dinámica de la materia o sistemas vivos se debe a la alta sensibilidad de las técnicas fluorométricas, a la especificidad de las características de fluorescencia debidas al microambiente de la molécula emisora y a la capacidad de estas últimas para proporcionar información espacial y temporal.

El término sensor fluorescente se usa comúnmente, pero en el caso particular de un parámetro químico como el pH o la concentración de una especie, se puede preferir el término: indicador fluorescente (ej., indicador fluorescente de pH). Por otra parte, cuando se usa una molécula fluorescente para visualizar o localizar una especie, por

ejemplo, usando microscopía, a menudo se emplean los términos marcadores fluorescentes o etiquetas.



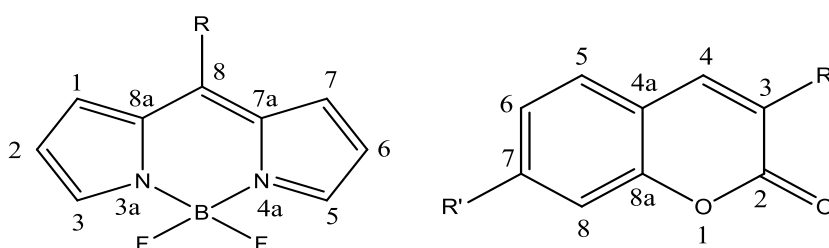
**Figura 10.** Células HeLa con tinción fluorescente<sup>30</sup>.

Esto implica que una molécula fluorescente está unida covalentemente a las especies de interés: tensoactivos, cadenas poliméricas, fosfolípidos, proteínas, oligonucleótidos, etc. El marcado de proteínas puede conseguirse fácilmente por medio de reactivos de marcaje que tienen grupos funcionales adecuados, por ejemplo, es posible la unión covalente en grupos amino. El carácter hidrófilo, hidrófobo o anfifílico de un fluoróforo es esencial. En microscopía, la interacción selectiva del fluoróforo con partes específicas del sistema en estudio (células, tejidos, etc., Figura 10), que permite su visualización, se denomina a menudo tinción, término tradicionalmente utilizado para colorantes. Los fluoróforos intrínsecos son ideales como sensores y trazadores, pero sólo hay algunos ejemplos encontrados en biología (por ejemplo, triptófano, NADH, flavinas). Debido a la dificultad de síntesis de moléculas o macromoléculas con fluoróforos unidos covalentemente, muchas investigaciones se llevan a cabo con fluoróforos no asociados covalentemente. La capacidad de la fluorescencia para proporcionar información temporal es de gran importancia.



#### 4. Sensores fluorescentes derivados de sistemas BODIPY-Cumarina

Los BODIPYs son colorantes con propiedades fotofísicas y fotoquímicas excelentes junto con su alta fluorescencia de rendimientos cuánticos y buena fotoestabilidad. Además, las propiedades ópticas de los BODIPYs se pueden modular a través de modificaciones químicas en el núcleo (Figura 11). Estas características favorables hacen que los BODIPYs sean ampliamente utilizados como fluoróforos para la construcción de marcadores fluorescentes, sensores, sistemas de recolección de luz y agentes de terapia fotodinámica.<sup>31</sup>



**Figura 11.** a) Núcleo de BODIPY. b) Núcleo de la cumarina, donde el sustituyente R' pertenece al grupo donador de electrones y el sustituyente R al grupo aceptor.

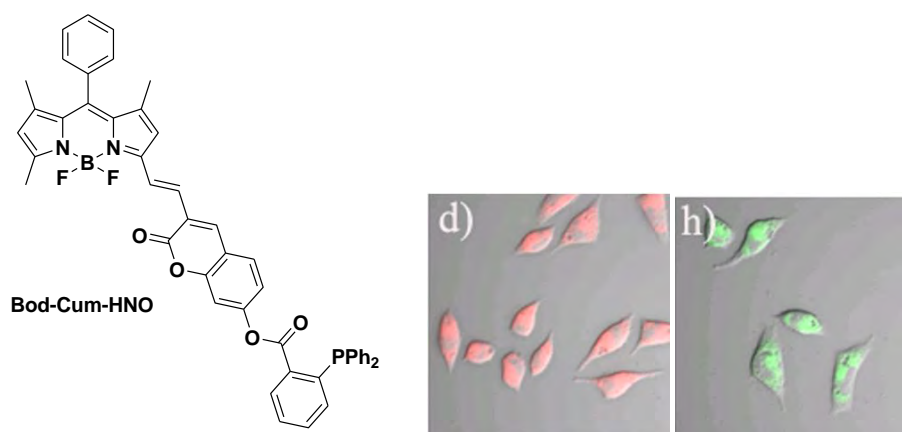
Las cumarinas pueden ser usadas como un sistema *push-pull* en el cual el proceso de la transferencia de carga intramolecular (TCI) desde el grupo donador de densidad electrónica hacia el aceptor procede a la excitación. Típicamente para el TCI eficiente, el grupo donador y el aceptor se encuentran situados en las posiciones 7 (R') y 3 (R) respectivamente<sup>32</sup>, Figura 11.

Por otra parte, se sabe que los colorantes BODIPY experimentan un proceso de TCI con un grupo funcional en la posición 3. En el diseño de los sensores fluorescentes ratiométricos, la TCI es un mecanismo de señalización.<sup>33</sup> Los sensores ratiométricos fluorescentes para aniones fluoruro, podrían ser construidos mediante la explotación de las propiedades de TCI tanto de la cumarina y del BODIPY.

##### 4.1 Fluorescencia dentro de células.

Se ha demostrado que los compuestos derivados de BODIPY-cumarina son adecuados para tener una imagen de fluorescencia en células vivas, la investigación en funciones biológicas sobre biosíntesis se encuentra en progreso. En años recientes la

sensibilidad fluorescente es más atractiva, debido a su alta selectividad, sensibilidad y fácil uso. Además, la sensibilidad a la fluorescencia es potencialmente aplicable por ejemplo a biosistemas vivos con una resolución espacial y temporal. De igual manera, la medición de la intensidad basada en fluorescencia se encuentra influenciada por un microambiente, concentración sensorial e intensidad en la excitación. Un desarrollo exitoso empleando como base un compuesto derivado de BODIPY-cumarina exhibe una amplia emisión y gran fluorescencia, siendo los aniones de fluoruros los responsables de esta característica, una vez que el derivado de BODIPY-cumarina-HNO<sup>34</sup> (Figura 12) se introduce dentro de la célula, se muestra que posee una baja citotoxicidad, mostrando un notable cambio en las emisiones y una buena permeación membranal.



**Figura 12.** Imagen de fluorescencia donde el derivado BODIPY-Cumarina-HNO se introduce dentro de las células y son excitadas a d) 460 nm durante 20 min h) 590 nm durante 45 min.

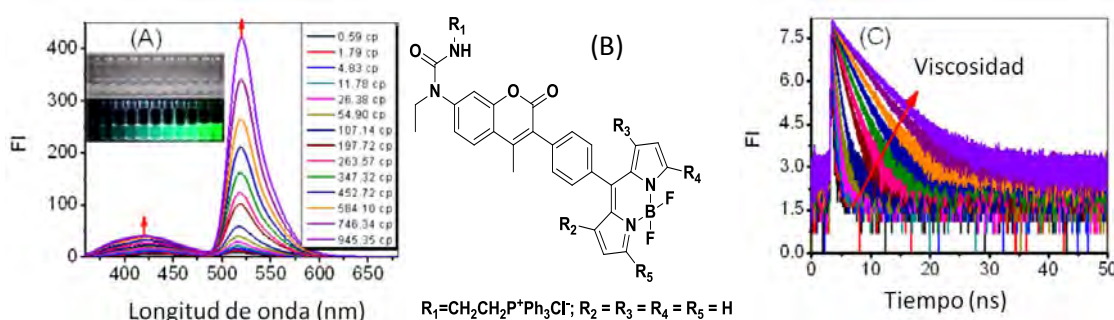
#### 4.2 Sensores de viscosidad mitocondrial.

Actualmente, los compuestos derivados de BODIPY-cumarina poseen amplias aplicaciones biológicas, una de ellas como sensores de viscosidad para mitocondrias celulares. Este tipo de sensores muestra una relación directa entre la intensidad de fluorescencia del BODIPY-cumarina con la viscosidad del medio, lo que permite determinar la viscosidad mitocondrial promedio de células HeLa vivas (62 cP).

La viscosidad intracelular es un factor crítico que controla el transporte de la masa y las señales, así como las interacciones entre las biomacromoléculas. De hecho, se ha demostrado que es un indicador vital para la detección de aterosclerosis<sup>35</sup>, diabetes<sup>36</sup>, la enfermedad de Alzheimer<sup>37</sup>, e incluso células malignas<sup>38</sup>, ya que afecta las

interacciones proteína-proteína en las membranas celulares. Además, la viscosidad de la matriz mitocondrial está estrechamente relacionada con el estado respiratorio de las mitocondrias a través de las conformaciones moleculares de los cambios inducidos mecánica u osmóticamente en la organización de la red mitocondrial, lo que sugiere que los cambios en la viscosidad de la matriz mitocondrial pueden modular la difusión de metabolitos y el metabolismo mitocondrial. Para la medición de la viscosidad intracelular, se han introducido sensores con fragmentos fluorescentes dobles, compuestos por un conector flexible, un donador de energía y un aceptor de energía. Este sistema ofrece la ventaja de que la intensidad de fluorescencia del fluoróforo es dependiente de la viscosidad. En la Figura 13 (B),<sup>39</sup> se observa la estructura del compuesto empleado. Para investigar la relación entre el cambio en la viscosidad y el de la intensidad de fluorescencia, se recurre a la espectroscopia de fluorescencia, midiendo el tiempo de vida de fluorescencia de los compuestos sintetizados. Como se muestra en la Figura 13 (A),<sup>39</sup> muestra dos picos de emisión a 427 y 516 nm, donde se halló que ambas intensidades de emisión eran mejoradas por la viscosidad del disolvente Figura 13 (C).<sup>39</sup> En particular, se observó una relación lineal entre la duración de la fluorescencia ( $\tau_f$ ) y la viscosidad del disolvente ( $\eta$ ).

Estos resultados obtenidos, son atribuibles a la rotación dependiente de la viscosidad del enlace C-C entre el BODIPY y la unidad de fenilo, donde el enlace C-C entre el espaciador de fenilo y BODIPY puede girar libremente para producir una menor cantidad de fluorescencia en un entorno de baja viscosidad. La rotación a través del enlace C-C está restringida en presencia de un disolvente altamente viscoso.



**Figura 13.** (A) Cambios en el espectro de fluorescencia, (B) Estructura del compuesto empleado en el sensor, (C) Incremento de la fluorescencia con aumento de la viscosidad.

Recientemente se han desarrollado rotores moleculares fluorescentes (RMF) para determinar la viscosidad en soluciones o fluidos biológicos.<sup>40</sup>

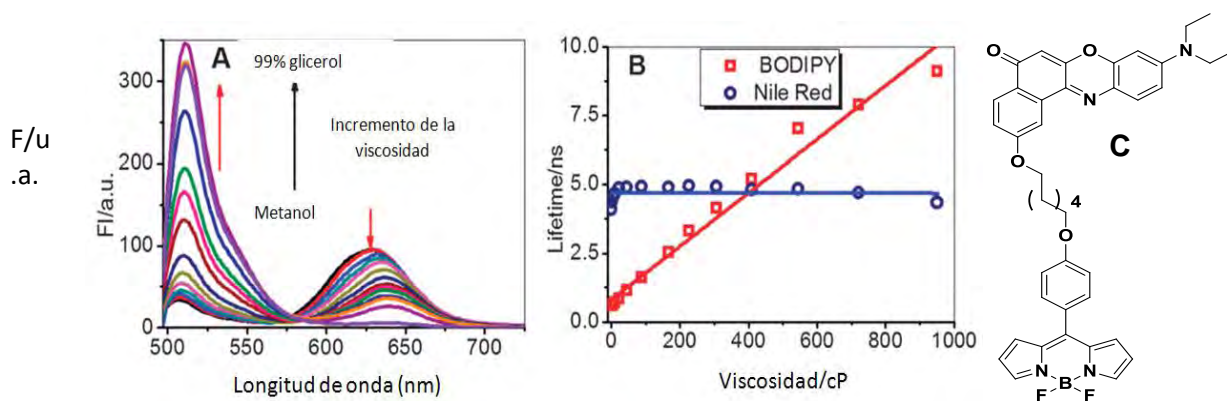
### 4.3 Sensores de viscosidad y polaridad en respuesta al estrés del retículo endoplásmico

La viscosidad y la polaridad son dos factores ambientales significativos que influyen de manera pronunciada en el comportamiento de diversos procesos químicos y biológicos, incluyendo difusiones intracelulares (de nutrientes, metabolitos, proteínas de señalización, etc.) y cambios en la configuración de proteínas y membranas celulares.<sup>41,42</sup> El retículo endoplásmico (RE) es un organelo celular implicado en la síntesis de proteínas (secretoras y de membrana) y su modificación postraduccional, incluida la glicosilación. La acumulación de grandes cantidades de proteínas desplegadas o mal plegadas en el RE, activa la respuesta al estrés del RE, que ha estado implicado en diversas enfermedades humanas (diabetes y la enfermedad de Alzheimer).<sup>43</sup> La acumulación de proteínas parcialmente desplegadas o glicosiladas en el RE altera la viscosidad y la polaridad. Por lo tanto, es razonable prever la alteración de la viscosidad y la polaridad durante el estrés del RE, y es de interés para controlar los cambios correspondientes. Con la aparición de la tecnología "*biosensing*", se han introducido varios quimiosensores fluorescentes para medir la viscosidad y la polaridad biológica.<sup>44</sup> Para las mediciones de la viscosidad, se han desarrollado "rotores moleculares" para su uso con técnicas de imagen ratiométrica<sup>45</sup> o de fluorescencia.<sup>46</sup>

Un ejemplo de esto, es un rotor molecular basado en la transferencia de energía a través del enlace que contiene un núcleo de cumarina y un núcleo de BODIPY, para medir la viscosidad mitocondrial en células vivas Figura 14 (C).<sup>47</sup> Por otra parte, para mediciones de polaridad en sistemas biológicos, se han adoptado ampliamente fluoróforos con una transferencia de carga intramolecular (TCI).<sup>48</sup> Sin embargo, para comprender los eventos biológicos basados en células, tales como el estrés del RE, sería deseable tener un sensor fluorescente bimodal que pueda usarse para medir la viscosidad y la polaridad simultáneamente y que también se pueda localizar en la célula.

La molécula del BODIPY, ha sido diseñada como un rotor molecular fluorescente, puede usarse para cuantificar la viscosidad celular por microscopía de imágenes de tiempo de vida de fluorescente (FLIM), y Nile Red<sup>49</sup> es un fluoróforo sensible a la polaridad. El sensor se localiza en el RE y puede usarse para cuantificar diferentes cambios, tanto en la viscosidad local como en la polaridad local de las células HeLa

estresadas por el RE. Para probar que el sensor puede usarse para determinar la viscosidad local y la polaridad de ciertos medios, se investigó la respuesta de fluorescencia del sensor hacia cambios arbitrarios de viscosidad o polaridad. Los espectros de fluorescencia y el tiempo de vida de fluorescencia del sensor, se midieron en disolventes de diferentes viscosidades, mostrando una longitud de máxima absorción en 525 y 635 nm donde la intensidad de la fluorescencia disminuye con el aumento de la polaridad del disolvente. Por lo que, los resultados muestran que la fluorescencia disminuye con el aumento de la polaridad del disolvente, debido al proceso de TC que permite que el compuesto fluorescente tenga una respuesta a la polaridad ambiental Figura 14 (A) y (B).<sup>47</sup> Estos marcadores poseen aplicaciones para organelos intracelulares tales como en mitocondrias, RE y lisosomas.



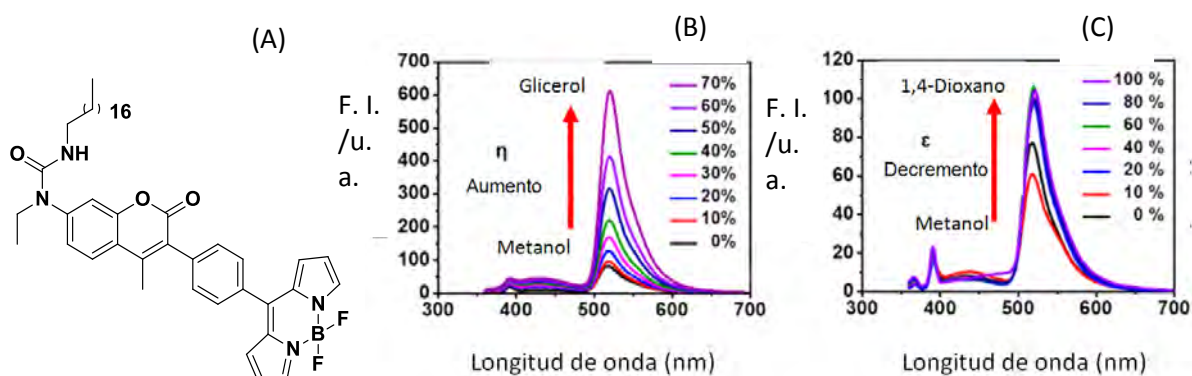
**Figura 14.** A) espectro de fluorescencia y vida de la fluorescencia, al aumentar la viscosidad del medio. B) intensidad fluorescente determinada en disolventes de diferente polaridad. C) molécula prototipo empleada en el experimento.

#### 4.4 Sensores de polaridad sensibles a la viscosidad, selectivos a membrana

Por otra parte, la fluidez de la membrana es un factor importante en muchas vías metabólicas, por ejemplo, las reacciones en cadena de transferencia de electrones en las membranas mitocondriales,<sup>50,51</sup> el transporte de proteínas del retículo endoplásmico (RE),<sup>52</sup> la señalización celular a través de la membrana plasmática<sup>53</sup> y la administración de fármacos.<sup>54</sup> Su modulación está controlada en gran medida por la composición lipídica en el sistema de membrana. En particular, el grado de saturación de los ácidos grasos es un factor de riesgo en el síndrome metabólico, donde los ácidos grasos saturados causan estrés en el RE que implica la respuesta de la proteína desplegada,

generando un aumento en la expresión de la proteína homóloga proapoptótica C/EBP<sup>55</sup> y provocando una alteración de la homeostasis del RE e incluso muerte celular.<sup>56</sup>

Para investigar la fluidez de la biomembrana, se emplean preferentemente sensores de polaridad que sean sensibles a la viscosidad. El “nile-red” es un sensor de polaridad de membrana que se ha utilizado para investigar el contenido de colesterol de las membranas,<sup>57</sup> así como permitir la discriminación de los tipos de lípidos, por ejemplo, ácido oleico o colesterol.<sup>58</sup> Recientemente, se han introducido nuevos rotores moleculares fluorescentes bimodales compuestos de dos fluoróforos diferentes para medir los cambios de viscosidad en mitocondrias dañadas<sup>39</sup> y la reducción de la viscosidad en el RE, posiblemente de la membrana del RE, después del tratamiento con tunicamicina.<sup>47</sup> Con respecto a los sensores basados en un fluoróforo, los sensores bimodales tienen una clara ventaja debido a que la relación de las emisiones de dos fluoróforos depende únicamente del entorno en el que se sitúa el sensor, independientemente de su concentración.<sup>59</sup> Sin embargo, no está claro si los sensores están situados en los lúmenes o en las membranas de los organelos; Por lo tanto, las posiciones correspondientes a los cambios de viscosidad observados son hasta ahora inciertas. En este contexto, se introduce un biosensor de viscosidad selectiva de membrana Figura 15 (A),<sup>60</sup> que se encuentra formado por un derivado BODIPY-cumarina con una cadena alquílica larga, para mostrar la relación entre la viscosidad y la emisión fluorescente.



**Figura 15.** Los espectros de fluorescencia dependen de la viscosidad y la polaridad. (A) Estructura del biosensor de viscosidad. Los cambios en los espectros fluorescentes (B) se obtuvieron variando la viscosidad de la disolución utilizando diferentes concentraciones; (C) Se midieron espectros de fluorescencia a través de diversas polaridades de solución. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 350 nm para los espectros.

Se muestra en la Figura 15 (B) la respuesta de emisión del derivado BODIPY-cumarina a cambios en la viscosidad local y la polaridad, los espectros fluorescentes se registraron en disolventes mixtos usando sistemas metanol-glicerol y metanol-1,4-dioxano, respectivamente. Y en la Figura 15 (C), con el aumento gradual de la concentración de glicerol de 0% a 70%, las emisiones a 439 y 518 nm aumentaron 5 y 7 veces, respectivamente. Por lo que existe una relación de intensidad de fluorescencia frente a la viscosidad de la disolución que revela una correlación positiva. Por lo tanto, el compuesto (A) muestra sensibilidad a la viscosidad de su ambiente, y el efecto de la polaridad sobre la relación es relativamente pequeño. La emisión de este compuesto BODIPY-Cumarina depende de la viscosidad del disolvente con una interferencia menor de la polaridad.

## 5. SÍNTESIS Y REACCIONES DE BODIPYs Y CUMARINAS

### 5.1 BODIPYs

#### 5.1.1 Propiedades fundamentales

Los BODIPYs (“dipirrometenos de boro”) son compuestos generalmente apolares con estructura formal de zwitterión, solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, que están basados en el núcleo de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno, tienden a absorber fuertemente la luz UV y emiten luz con bandas de fluorescencia relativamente agudas con altos rendimientos cuánticos.<sup>61</sup> Son poco afectados por la polaridad y el pH del medio, si se modifica su estructura ligeramente, se puede observar su característica típica de fluorescencia. Poseen diferentes aplicaciones como agentes reveladores, marcadores fluorescentes, quimiosensores y colorantes láser.

La numeración de la IUPAC para los sistemas BODIPY es diferente en cuanto a los dipirrometenos.<sup>62</sup> De cualquier forma, los términos de posición  $\alpha$ -,  $\beta$  - y *meso*- son usados de la misma manera en ambos sistemas.

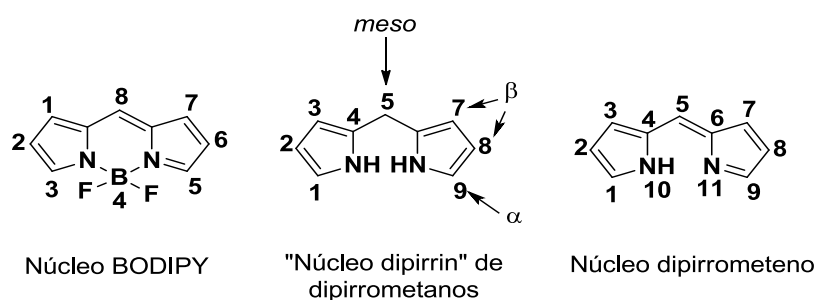
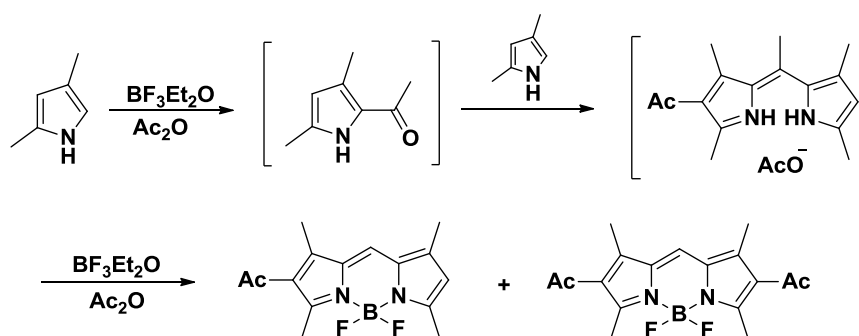


Figura 16. Numeración del núcleo de los dipirrometanos y BODIPYs.<sup>61</sup>

Los BODIPYs fueron descubiertos por primera vez en 1968 por Treibs y Kreuzer<sup>63</sup> como resultado inesperado de la reacción entre el 2,4-dimetilpirrol y el eterato de trifluoruro de boro en presencia de anhídrido acético, en un intento de  $\alpha$ -acetilar el anillo pirrólico como se muestra en el siguiente esquema.



Esquema 1. Ruta de síntesis de los primeros BODIPYs descritos por Treibs y Kreuzer.<sup>64</sup>

La síntesis de BODIPYs con metilos simétricamente sustituidos en sus posiciones (3,5), (1,7) y (2,6) y en posiciones asimétricas (7,5) y (7, 6, 5), no representan mayores diferencias en la absorción máxima de UV, emisión máxima de fluorescencia y rendimientos cuánticos de los compuestos.<sup>65</sup>

La longitud de absorción y emisión máxima en los sistemas simétricos incrementa conforme aumenta el número de grupos alquilo (Figura 17).

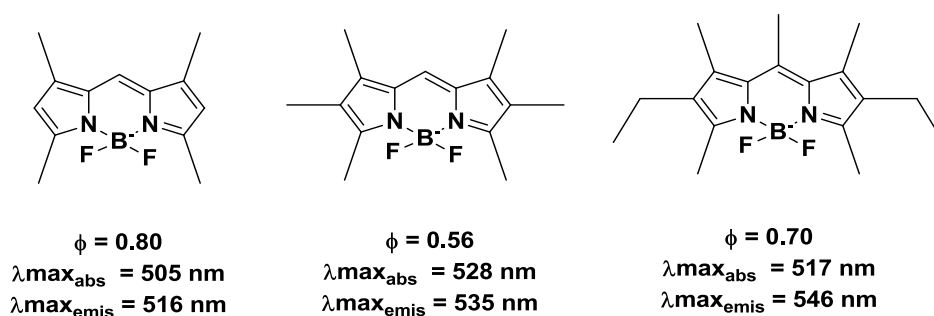
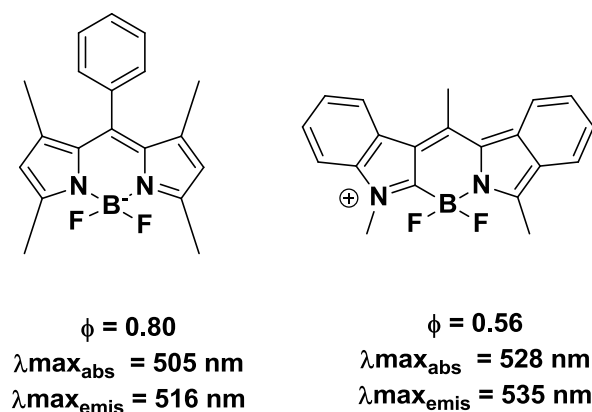


Figura 17. Sistemas simétricos, tetra-, hexa- y hepta- alquilados.<sup>61</sup>



La alquilación o acilación en la posición *meso* no tiene un efecto especial sobre la longitud de absorción y emisión. Al adicionar en la posición *meso* un anillo aromático en un sistema sustituido en posiciones (1,3), (7,5) (Figura 18) impide la rotación libre del grupo fenilo, reduciendo la pérdida de energía en su estado excitado por la vía molecular no radiativa, pero la introducción de sustituyentes aromáticos en posición *orto* aumenta los rendimientos cuánticos.



**Figura 18.** Comparación de longitudes de máxima absorción y emisión en BODIPYs sustituidos en posición *meso*, (1,3) y (7,5).

Derivados de BODIPY con anillos alifáticos que se han fusionado a los anillos de pirrol, son tal vez más limitados en cuanto a su longitud de absorción y emisión, por los que generalmente se emplean sustituyentes alifáticos acíclicos.<sup>61,71</sup>

## 5.2 Síntesis de BODIPYs

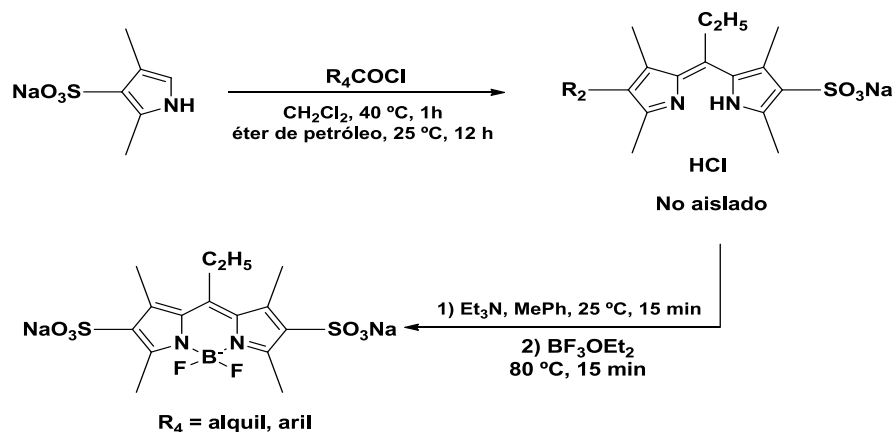
La complejación de dipirrometenos con sales de trifluoruro de boro conduce a la formación del núcleo de BODIPY, este núcleo es rígido y generalmente presenta altos rendimientos cuánticos fluorescentes.

Este tipo de estructura es comúnmente descrita por su analogía, con el anillo tricíclico de carbonos del indaceno, la posición 8 se llama comúnmente posición *meso*, las propiedades espectroscópicas de absorción y fluorescencia de miembros de la familia BODIPY están altamente influenciados por el grado de deslocalización electrónica en torno a su estructura central y de manera modesta a los sustituyentes donadores o aceptores unidos al núcleo del pirrol. Las rutas de síntesis para la obtención de BODIPYs simétricos son: la condensación de  $\alpha$ -pirroles con cloruros de ácido,

aldehídos o anhídridos; mientras que la síntesis de compuestos asimétricos se lleva a cabo por condensación entre  $\alpha$ -pirroles y  $\alpha$ -acilpirroles en presencia de ácidos o bien por modificaciones selectivas.

## 5.2.1 Síntesis de BODIPYs simétricos

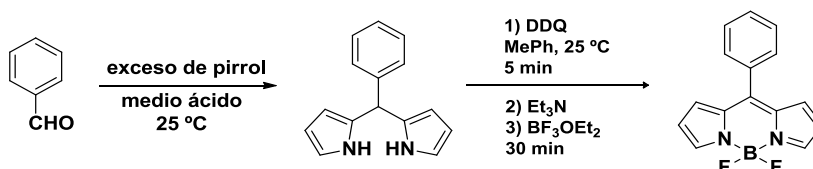
### 5.2.1.1 Síntesis a partir de pirrol y cloruro de ácido o anhídrido



**Esquema 2.** Síntesis de BODIPYs con sustituyentes en posición *meso*.<sup>66,67</sup>

Los BODIPYs que poseen sustituyentes en la posición *meso*, son relativamente sencillos de preparar a través de la condensación de cloruros de acilo o anhídridos con pirroles, este tipo de reacción implica la formación de una sal hidrociorada de dipirrometano que es un intermediario inestable. Los intermediarios de hidrocioruros de dipirrometano son más sencillos de manejar y purificar a medida que aumenta el grado de sustitución, estos generalmente no se aíslan en la síntesis de BODIPYs.

### 5.2.1.2 Síntesis a partir de pirrol y aldehído



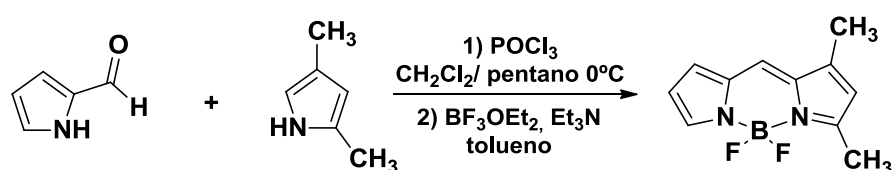
**Esquema 3.** Síntesis de BODIPYs a partir de un aldehído.<sup>68</sup>

Se emplean aldehídos aromáticos disueltos en exceso de pirrol, donde se requiere un paso de oxidación<sup>56</sup>, utilizando DDQ y una posterior complejación con el  $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ , se pueden emplear benzaldehídos halogenados que incrementan el rendimiento de la reacción. Al incorporar sustituyentes en la posición *orto* se restringe la rotación del

anillo aromático en la posición *meso* incrementado los rendimientos cuánticos. Se han empleado diferentes derivados de benzaldehídos para sintetizar BODIPYs *meso*-sustituídos. No es habitual el uso de aldehídos alifáticos para obtener derivados de BODIPY.

## 5.2.2 Síntesis de BODIPYs asimétricos

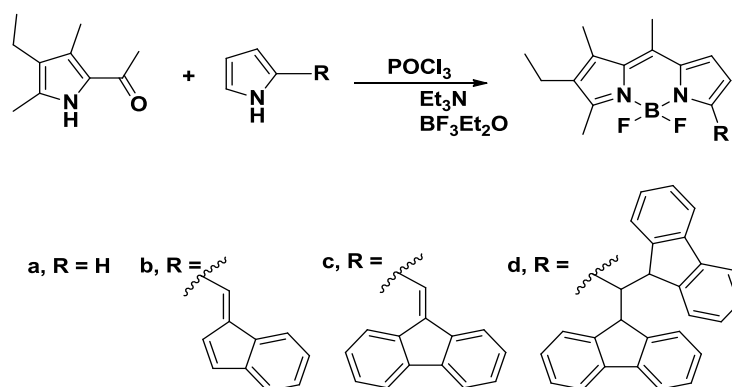
### 5.2.2.1 Síntesis a partir de pirrol, aldopirrol y cetopirrol



**Esquema 4.** Síntesis de un BODIPY asimétrico.

Las condensaciones de pirroles con cloruros de ácido o con derivados de benzaldehído son métodos directos y convenientes para la síntesis de BODIPYs simétricos, la formación de BODIPYs asimétricos se consigue a través de la preparación de intermediarios de cetopirrol, seguido de una condensación con un pirrol sustituido mediada por un ácido de Lewis y con otro pirrol (Esquema 4).<sup>61</sup>

Otro ejemplo de la síntesis de estos derivados, se lleva a cabo mediante la condensación entre el 2-acetil-4-etil-3,5-dimetilpirrol y los  $\alpha$ -pirroles funcionalizados en la posición como se muestra en el Esquema 5.<sup>64</sup>



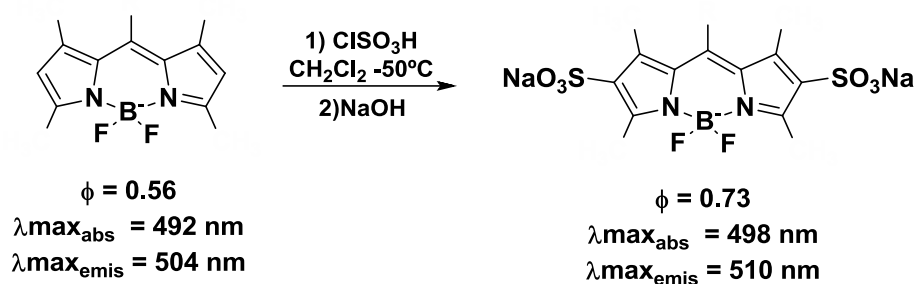
**Esquema 5.** Síntesis de BODIPYS asimétricos.

## 5.3 Reacciones de BODIPYs

### 5.3.1 Reacciones de sustitución electrofílica aromática (S<sub>E</sub>Ar)

Las posiciones 2 y 6 del núcleo del BODIPY son las más susceptibles para llevar a cabo reacciones de sustitución electrofílica aromática.

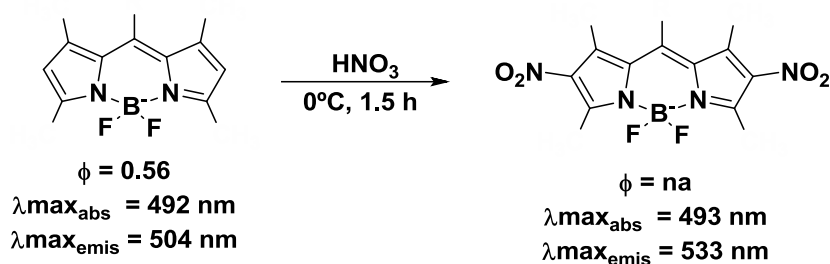
#### 5.3.1.1 Sulfonación



**Esquema 6.** Sulfonación sobre el núcleo del BODIPY sin cambio significativo en la longitud de máxima absorción y emisión.<sup>61</sup>

Los BODIPYs tetra y pentasustituidos sufren reacciones de sulfonación, mediante el tratamiento con ácido clorosulfónico y una posterior neutralización con hidróxido de sodio. La introducción de grupos sulfonatos no cambia la longitud de máxima absorción y emisión fluorescente con respecto a los BODIPYs no sulfonados.

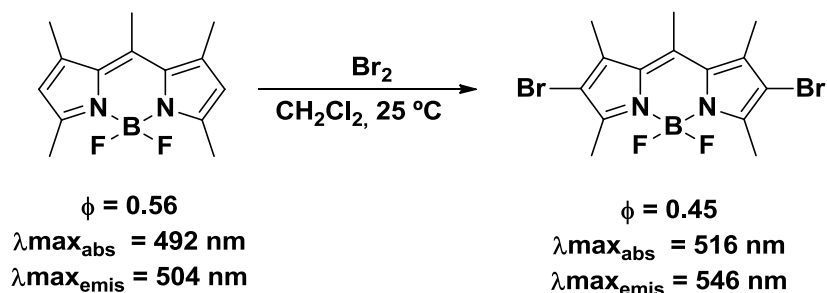
#### 5.3.1.2 Nitración



**Esquema 7.** Nitración en el núcleo del BODIPY.<sup>61</sup>

Se puede nitrar un BODIPY pentametilado mediante el tratamiento con ácido nítrico a 0 °C, la introducción de los grupos nitro reduce la fluorescencia y el rendimiento cuántico.<sup>66, 69</sup>

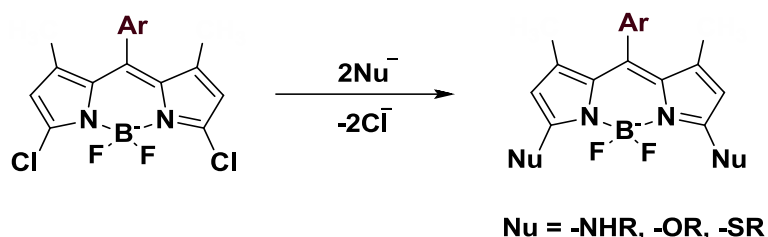
### 5.3.1.3 Halogenación



**Esquema 8.** Bromación en el núcleo del BODIPY.<sup>61</sup>

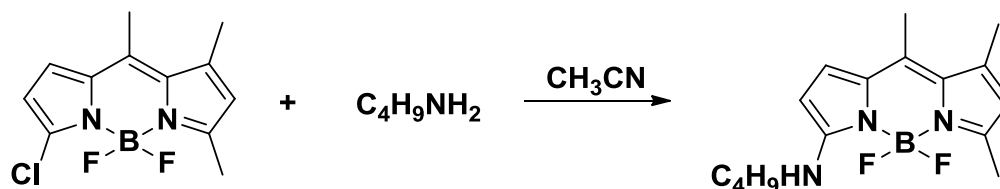
Los precursores del BODIPY (pirroles) son altamente reactivos a la halogenación, La introducción del sustituyente bromo en el núcleo de BODIPY causa un desplazamiento batocrómico en las bandas de absorción y emisión máxima, además el rendimiento cuántico de fluorescencia se apaga a través del efecto del átomo pesado.<sup>69</sup>

### 5.3.2 Reacciones de sustitución nucleofílica aromática ( $S_NAr$ )



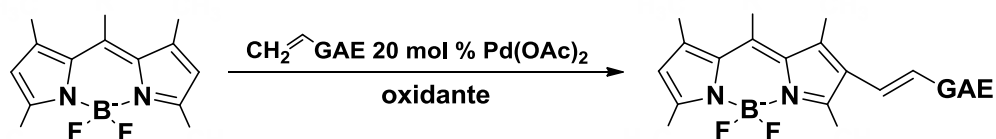
**Esquema 9.** Sustitución nucleofílica aromática en el núcleo del BODIPY.<sup>72</sup>

La presencia de buenos grupos salientes como los átomos de cloro en las posiciones 3 y 5 del núcleo del BODIPY, permiten la introducción de grupos amino o alcoxi en estas posiciones a través de reacciones de  $S_NAr$ .



**Esquema 10.** Sustitución nucleofílica aromática en el núcleo del BODIPY.

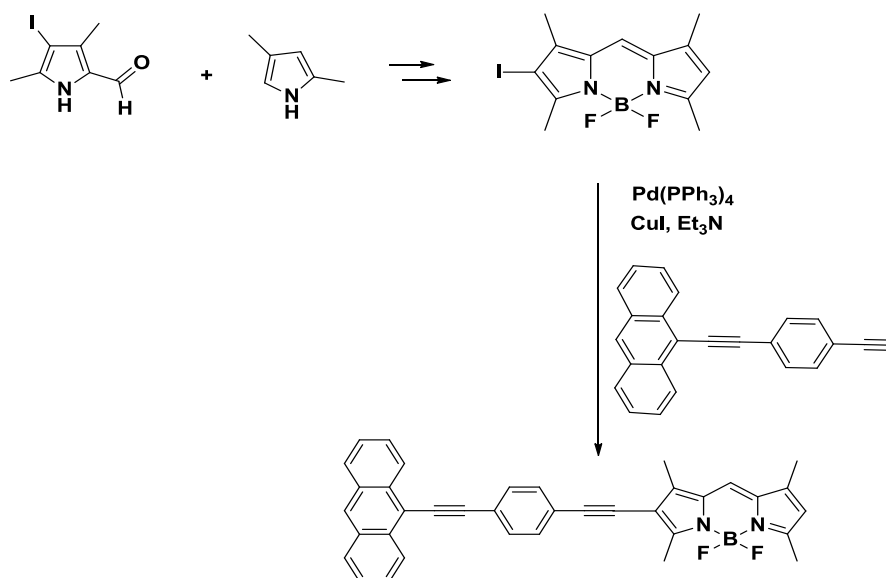
### 5.3.3 Reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio



**Esquema 11.** Reacción de acoplamiento catalizada por paladio.<sup>61</sup>

Los BODIPYs se pueden funcionalizar mediante reacciones de acoplamiento catalizadas por paladio<sup>70</sup>, esta ruta proporciona una forma directa de extender la conjugación del núcleo de BODIPY.

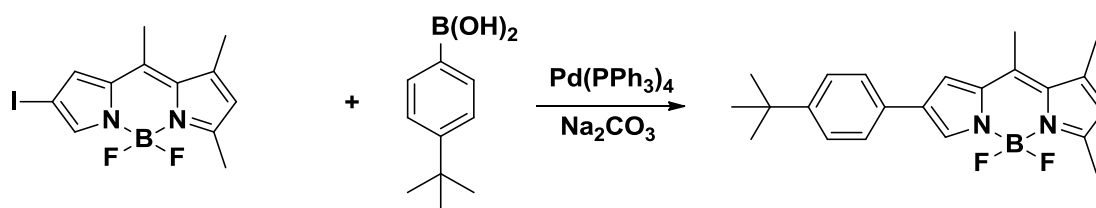
#### 5.3.3.1 Acoplamiento de Sonogashira



**Esquema 12.** Formación del BODIPY con posterior acoplamiento de Sonogashira.<sup>71</sup>

La reacción de condensación entre el 4-iodo-3,5-dimetil-2-pirrolcarboxaldehído y el 2,4-dimetilpirrol genera un derivado de BODIPY monoyodado que puede sufrir una reacción de acoplamiento de Sonogashira al hacerlo reaccionar con el 9-((4-etinilfenil)-etinil)antraceno.

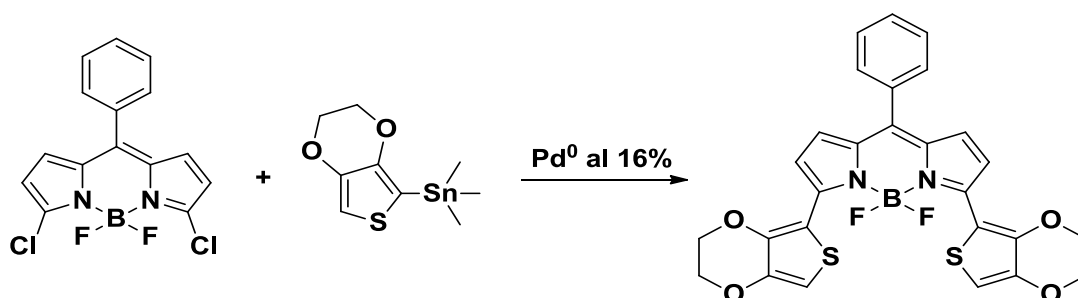
### 5.3.3.2 Acoplamiento de Suzuki



Esquema 13. Acoplamiento de Suzuki.<sup>71</sup>

La reactividad y selectividad de los BODIPYs monohalogenados en reacciones catalizadas con paladio proporciona una ventaja para la formación de nuevos sistemas. El acoplamiento de Suzuki entre un derivado de ácido borónico y un BODIPY halogenado genera productos con altos rendimientos. En esta reacción se utilizan bases como carbonato o bicarbonato de sodio o de potasio.

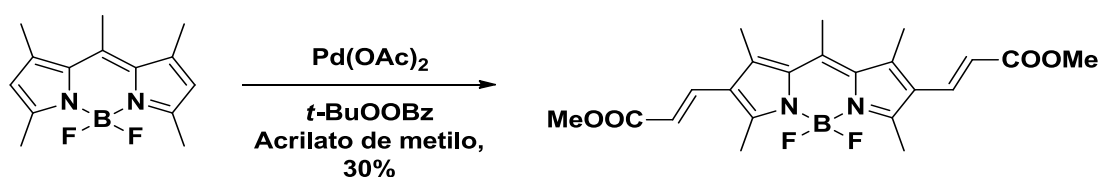
### 5.3.3.3 Acoplamiento de Stille



Esquema 14. Acoplamiento de Stille.<sup>71</sup>

La reacción de acoplamiento de Stille entre un derivado estánnico y un BODIPY halogenado, da como resultado un derivado de BODIPY que, en el caso del ejemplo de arriba, el BODIPY que se obtiene se puede polimerizar para obtener polímeros fluorescentes.

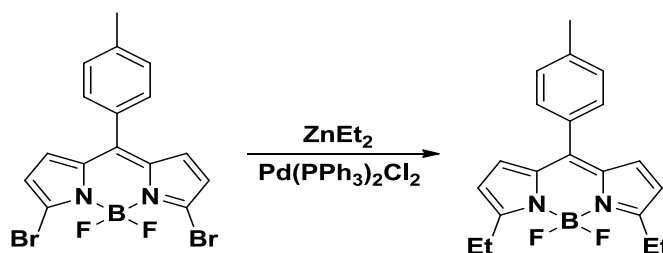
### 5.3.3.4 Acoplamiento de Heck



Esquema 15. Acoplamiento de Heck.<sup>71</sup>

La adición catalizada por paladio entre los carbonos de las posiciones 2 y 6 del BODIPY y compuestos halogenados derivados de vinilo o fenilo ilustra la reacción de acoplamiento de Heck conduciendo a productos con rendimientos moderados.

### 5.3.3.5 Acoplamiento de Negishi



Esquema 16. Reacción de Negishi.<sup>73</sup>

Por otra parte, la reacción de acoplamiento de Negishi en BODIPYs permite la preparación de derivados de alquilo, como el de Suzuki, pero con la valiosa ventaja de tener una alta compatibilidad de grupos funcionales (incluyendo el núcleo de BODIPY) debido a la naturaleza de los reactivos de organozinc, destacando la obtención de productos con altos rendimientos

## 5.4 Cumarinas

### 5.4.1 Propiedades fundamentales

La 2H-cromen-2-ona posee un nombre trivial conocido como cumarina. Las cumarinas derivan de la flavona y son derivados importantes del 2H-cromeno.<sup>74</sup> El análisis de rayos-X, la muestran como una estructura casi plana. La cumarina presenta un punto de fusión de 68 °C, son compuestos cristalinos coloridos, la cumarina es un compuesto



aromático presente en aspéculas y también en otras plantas como la lavanda y el meliloto.

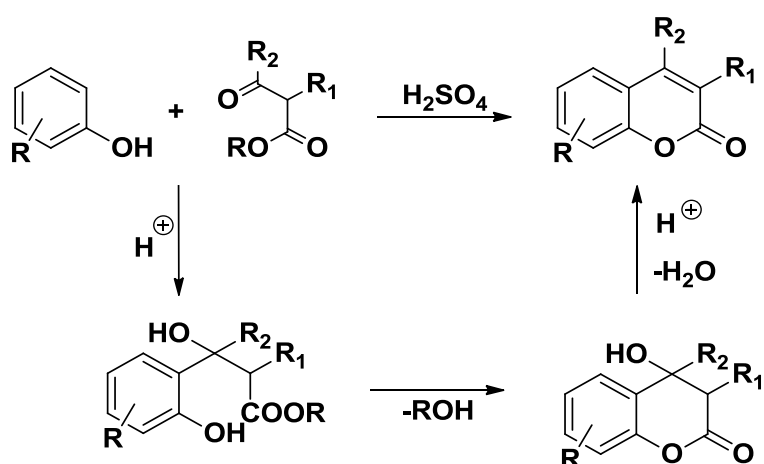


**Figura 19.** Núcleos de 2H-Cromeno y 2H-Cromen-2-ona.

Existen muchos productos naturales que contienen en su estructura el núcleo de cumarina.<sup>75</sup> Como la esculatina que proviene de un extracto de caballo y el psoraleno proveniente de una planta de la India (*Psoralea corylifolia*). Las cumarinas que derivan de esta planta, son conocidas como furocumarinas, es decir, que son fotoquímicamente activas. Bajo la irradiación de luz UV, induce el proceso en la célula para un incremento en la pigmentación de la piel y una inhibición en la división celular, esto es debido a la formación de ciclobutano con base de pirimidina y ácidos nucleicos. El psoraleno es usado en el tratamiento de la psoriasis. Mientras que el dicumarol y la warfarina son empleados como anticoagulantes usados en el tratamiento de la trombosis.

## 5.5 Síntesis de cumarinas

### 5.5.1 Síntesis de Pechmann<sup>76</sup>

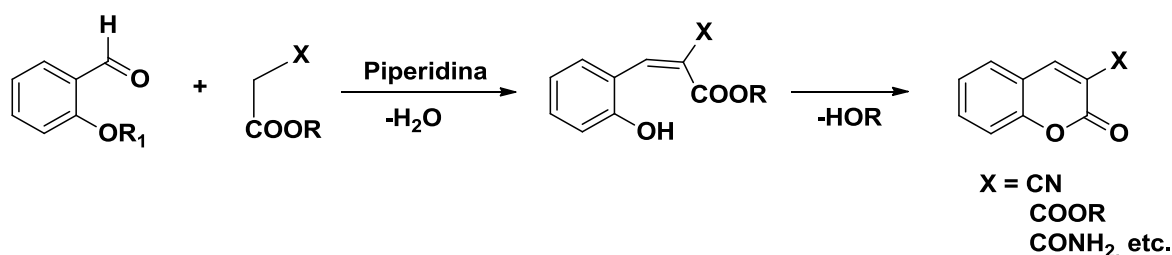


**Esquema 17.** Síntesis de Pechmann.

La reacción procede vía una reacción de  $S_EAr$  entre el fenol y el grupo carbonilo previamente protonado del  $\beta$ -cetoéster. La condensación se lleva a cabo bajo

condiciones ácidas, seguido de la lactonización y tras la eliminación del agua se forma la cumarina.

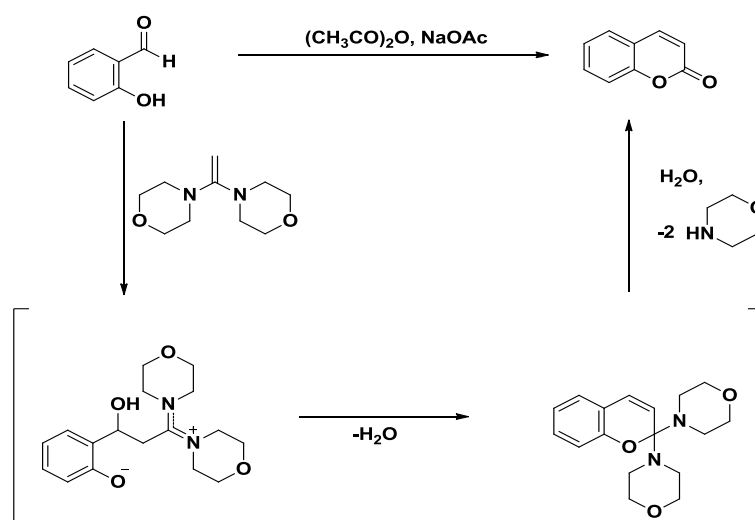
### 5.5.2 Síntesis de Knoevenagel



**Esquema 18.** Síntesis de Knoevenagel.

Es una reacción en la que se produce la adición nucleofílica sobre el grupo carbonilo de un aldehído o cetona de un carbono activado (con hidrógenos ácidos) situado entre dos grupos electroattractores (ej. un compuesto  $\beta$ -dicarbonílico), seguida de una reacción de deshidratación, la reacción global corresponde a una tipo condensación aldólica, obteniéndose un producto  $\alpha,\beta$ -insaturado. En el curso de esta reacción, se producen derivados del ácido 3-cumarínico. Esta reacción requiere de condiciones más suaves con respecto a la condensación de Perkin que involucra la condensación entre salicilaldehídos y anhídrido acético.<sup>77</sup>

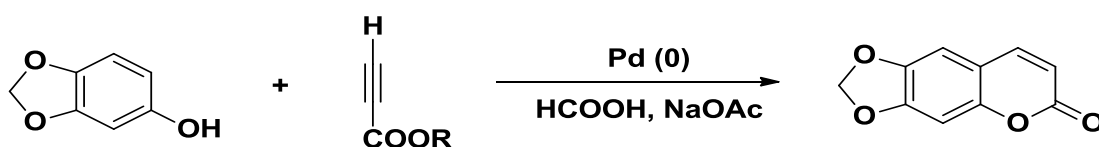
### 5.5.3 Reacción de Perkin



**Esquema 19.** Reacción de Perkin

Las cumarinas son preparadas a partir de salicilaldehído por medio de la reacción de Perkin con anhídrido acético o por medio de una ciclocondensación con 1,1-dimorfolinoeteno. Es un tipo de condensación aldólica, donde se da el ataque de un carbanión sobre un grupo carbonílico, empleando una base como catalizador (sal alcalina de ácido).

#### 5.5.4 Ciclocondensación catalizada por Pd<sup>0</sup>



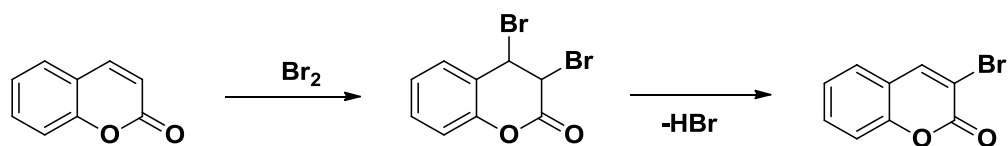
**Esquema 20.** Ciclocondensación catalizada por Pd<sup>0</sup>.

Los rendimientos son buenos y es una reacción alterna a la síntesis de Pechmann cuando ésta da bajos rendimientos.<sup>78</sup>

#### 5.6 Reacciones de cumarinas

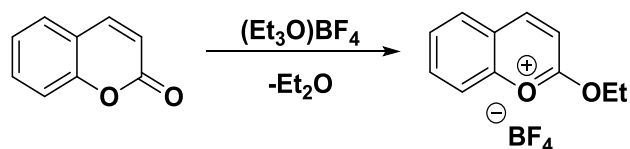
Las cumarinas experimentan reacciones de adición electrofílica al enlace doble (C-3/C-4) y de apertura nucleofílica de la lactona.<sup>79</sup>

Los reactivos de bromo originan un intermediario dibromado que elimina HBr por medio de una reacción de deshidrobromación con base generando la 3-bromocumarina:



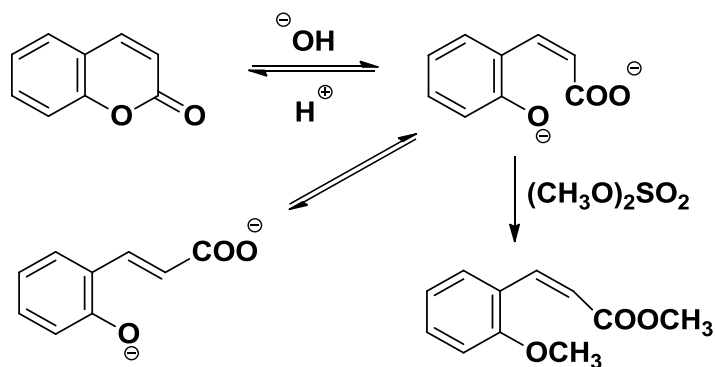
**Esquema 21.** Bromación de la cumarina.

En otro tipo de reacciones, electrófilos muy reactivos pueden ser atacados por el oxígeno del carbonilo de la cumarina. Por ejemplo, la sal de Meerwein Et<sub>3</sub>OBF<sub>4</sub> lleva a cabo una reacción de O-alkilación para dar el ion benzopirilio:



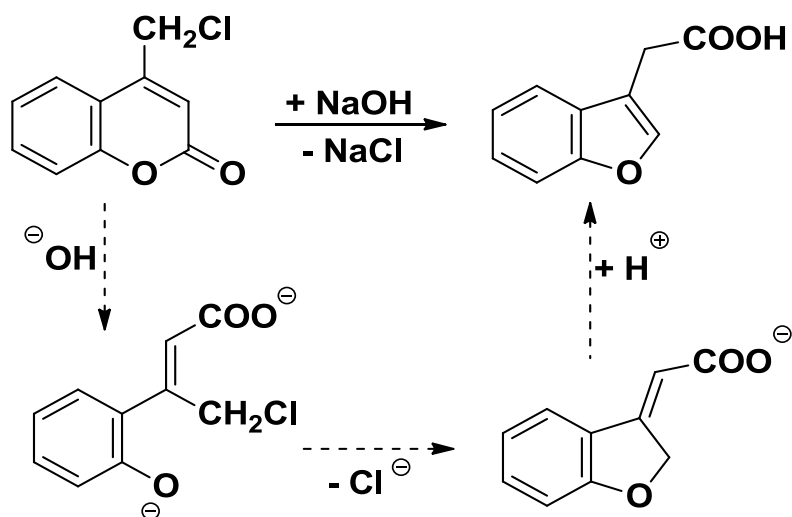
**Esquema 22.** Reacción de O-alkilación.

La cumarina en presencia de iones hidróxido abre el anillo de la lactona para formar un dianión del ácido (*Z*)-*o*-hidroxicinámico (ácido cumarínico) que se puede volver a ciclar cuando se añade ácido. El dianión del ácido cumarínico puede ser estabilizado formando el (*Z*)-metoxi éster por medio de una reacción de metilación con sulfato de dimetilo. Sin embargo, en una reacción prolongada el dianión del ácido (*Z*)-*o*-hidroxicinámico se isomeriza al dianión del ácido (*E*)-*o*-hidroxicinámico:



**Esquema 23.** Apertura del anillo en presencia de base.

Por otra parte, se han observado reordenamientos en las cumarinas, por ejemplo, la contracción de anillo de la 3,4-dibromo-3,4-dihidrocumarina en presencia de hidróxido genera la cumarona. El reordenamiento de la 4-clorometilcumarina genera el ácido acético de la 3-cumarona, esto ocurre a través de una ciclización vía una reacción de  $\text{S}_{\text{N}}1$  del derivado de fenolato para generar el derivado de carboxilato que se isomeriza al ácido acético de la 3-cumarona:



**Esquema 24.** Contracción del anillo de la cumarina.

### III. OBJETIVOS

Sintetizar y caracterizar mediante técnicas espectrométricas un compuesto *push-pull* derivado de BODIPY-Cumarina **7**, así como los intermediarios **1-6**.

Estudiar las propiedades fluorescentes del derivado de BODIPY-Cumarina para establecer la dependencia de la emisión fluorescente hacia la polaridad y el pH del medio y de esta manera evaluar si el compuesto se podría aplicar como sensor fluorescente.

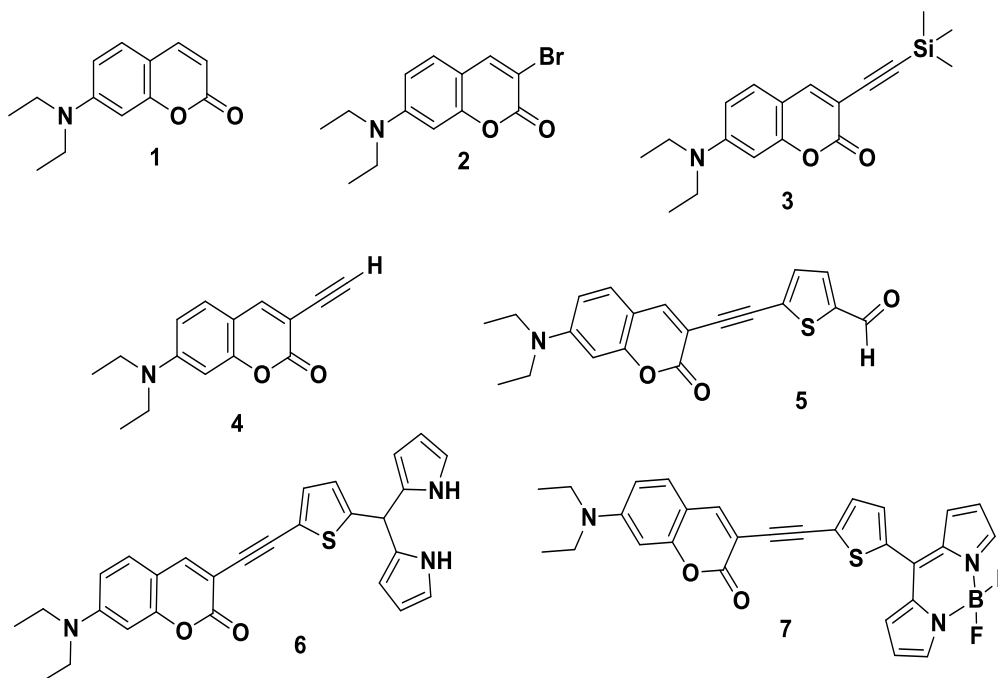


Figura 20. Intermediarios 1-6 y derivado BODIPY-Cumarina 7.

## IV. PARTE EXPERIMENTAL

### Instrumentación y Reactivos

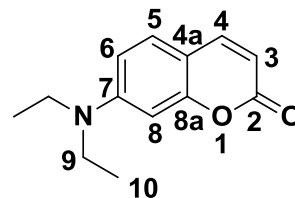
Todas las materias primas fueron obtenidas de la casa Aldrich y usadas sin una previa purificación. Los disolventes fueron secados mediante métodos estandarizados o destilados dependiendo de la prioridad del uso. Las reacciones fueron monitoreadas por CCF en placas de gel de sílice (ALUGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>) y reveladas bajo la exposición de una lámpara de luz UV<sub>254</sub>. Los puntos de fusión fueron determinados usando el aparato Electrothermal Mel-Temp® y no se corrigieron. Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos usando el Espectro Perkin-Elmer 400 FT-IR/FT-FIR, el número de onda del espectrofotómetro está reportado en cm<sup>-1</sup>. Los espectros de absorción y de fluorescencia UV-Vis fueron obtenidos usando un espectrofotómetro UV-Vis de diodos el Thermo Scientific Evolution y el espectrofluorómetro de HORIBA Scientific respectivamente. Los espectros de UV-Vis y fluorescencia fueron realizados a 25°C en una celda de cuarzo colocada en un soporte a 25 ±1°C con un baño de recirculación. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>11</sup>B y <sup>19</sup>F fueron obtenidos empleando los espectrofotómetros Varian Unity Inova 300 MHz y JEOL ECA 400 MHz, se muestran los desplazamientos químicos relativos (δ/ppm) de Si(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, CDCl<sub>3</sub>, BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>, CFCI<sub>3</sub>. Los espectros de masas de alta resolución fueron adquiridos con el espectrómetro Agilent Technologies ESI TOF.

## Síntesis

### Síntesis de la 7-(dietilamino)-2H-cromen-2-ona (1)

El compuesto **1** se sintetizó a partir de 10.0 g de 4-dietilaminosalicilaldehído (51.7 mmol) y 16.58 g (103.4 mmol) de malonato de dietilo utilizando 100 mL de ácido acético glacial y 100 mL de ácido clorhídrico concentrado a reflujo durante 96 h.

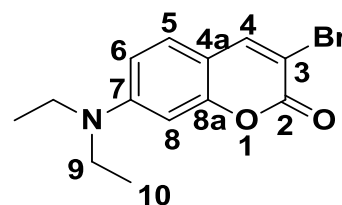
La mezcla de reacción se llevó a un pH alrededor de 5, con la finalidad de precipitar el producto, se realizó una filtración al vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna con un sistema de elución 8:2 diclorometano-metanol. Se obtuvo un sólido amarillo (9.177 g) con un rendimiento del 82%. Punto de fusión: 86-88 °C. **IR** (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3112 (C=H), 2970 y 2927 (C=C Aromático), 1713 (C=O), 1582 (C-N), 1203 (C-O-C). **RMN** <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.53 (1H, d,  $J$ = 9.1 Hz, H-4), 7.24 (1H, d,  $J$ = 8.8 Hz, H-5), 6.56 (1H, dd,  $J$ = 8.8, 2.4 Hz, H-6), 6.49 (1H, d,  $J$ = 2.4 Hz, H-8), 6.03 (1H, d,  $J$ = 9.3 Hz, H-3), 3.42 (4H, q,  $J$ = 7.0 Hz, H-9), 1.22 (6H, t,  $J$ = 7.0 Hz, H-10). **RMN** <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 162.2 (C-2), 156.7 (C-8a), 150.7 (C-7), 143.7 (C-4), 128.8 (C-5), 109.1 (C-6), 108.7 (C-3), 108.2 (C-4a), 97.5 (C-8), 44.8 (C-9), 12.4 (C-10).



### Síntesis de la 3-bromo-7-(dietilamino)-2H-cromen-2-ona (2)

El compuesto **2** se sintetizó a partir de 2.7572 g (12.7 mmol) del compuesto **1** y 0.78 mL (15.24 mmol) de bromo molecular, utilizando como disolvente 30 mL de ácido acético glacial, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Se obtuvo un precipitado naranja que

se aisló por medio de una filtración rápida, se realizaron lavados con agua fría. El producto se purificó por cromatografía en columna con un sistema de elución 9:1 diclorometano-metanol. Se obtuvo un sólido amarillo (2.6079 g) con un rendimiento del 95%. Punto de fusión: 130-132 °C. **IR** (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3057 (C=H), 2979 (C=C Aromático), 1719 (C=O), 1581 (C-N), 1203 (C-O-C), 685 (C-Br). **RMN** <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.88 (1H, s, H-4), 7.21 (1H, d,  $J$ = 8.9 Hz, H-5), 6.58 (1H, dd,  $J$ = 8.9, 2.4

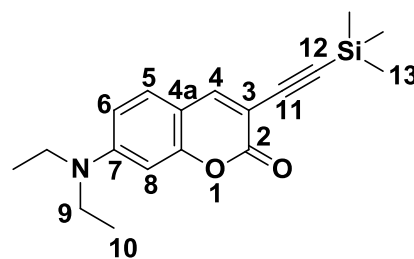




Hz, H-6), 6.48 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-8), 3.41 (4H, q,  $J = 7.1$  Hz, H-9), 1.21 (6H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-10). **RMN**  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm): 158.3 (C-2), 156.0 (C-8a), 150.8 (C-7), 144.8 (C-4), 128.2 (C-5), 109.3 (C-6), 108.9 (C-4a), 102.9 (C-3), 97.3 (C-8), 44.9 (C-9), 12.4 (C-10).

#### Síntesis de la 7-(dietilamino)-3-((trimetilsilil)etnil)-2*H*-cromen-2-ona (3)

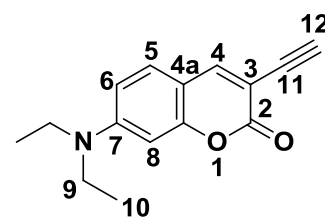
El compuesto **3** se sintetizó por medio una reacción de acoplamiento de Sonogashira al hacer reaccionar 0.25 g (1.15 mmol) del compuesto **2** con 0.49 mL (3.45 mmol) de etniltrimetilsilano, utilizando 30 mL de diisopropilamina (DIPA), 0.03287 g (0.1725 mmol) de



CuI y 0.066 g (57.5 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ). La reacción se llevó a cabo bajo atmósfera de nitrógeno calentando a  $50^\circ\text{C}$  durante 20 h. Se monitoreo la reacción por cromatografía en capa fina. La mezcla de reacción se extrajo con una disolución saturada de cloruro de amonio y diclorometano. Se evaporó la fase orgánica y se purificó el producto por medio de cromatografía en columna con un sistema de elución hexano/acetato de etilo 9:1. Se obtuvo un sólido amarillo (0.2002 g) con un rendimiento del 70%. Punto de fusión:  $148\text{-}150^\circ\text{C}$ . **IR** (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3039 (C=H), 3064 y 2908 (C=C Aromático), 2149 (C $\equiv$ C), 1708(C=O), 838 (Si-CH $_3$ ), 637 (C-Si). **RMN**  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.27 (H, s, H-4), 7.21 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-5), 6.58 (1H, dd,  $J = 8.8, 2.2$  Hz, H-6), 6.47 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-8), 3.42 (4H, q,  $J = 7.1$  Hz, H-9), 1.21 (6H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-10), 0.25 (9H, s, H-13). **RMN**  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 161.1 (C-2), 156.6 (C-8a), 151.4 (C-7), 146.9 (C-4), 129.2 (C-5), 109.6 (C-6), 108.6 (C-4a), 104.9 (C-3), 99.9 (C-8), 99.0 (C-11), 97.7 (C-12), 45.3 (C-9), 12.7 (C-10), 0.3 (C-13).

#### Síntesis de la 7-(dietilamino)-3-etnil-2*H*-cromen-2-ona (4)

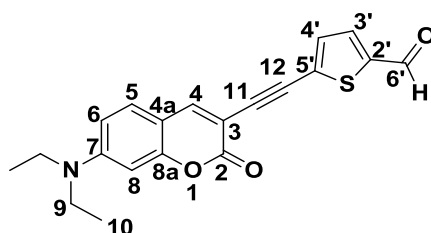
El compuesto **4** se obtuvo a partir de 1.3 g (4.4 mmol) del compuesto **3** que se disolvió en 150 mL de metanol y se adicionaron 13.3 mL (4.6 mmol) de TBAF (fluoruro de tetrabutilamonio) 1 M en THF (tetrahidrofurano), se dejó la mezcla de reacción en agitación durante 15 h a temperatura



ambiente. El compuesto obtenido se purificó por cromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil un sistema de elución hexano/acetato de etilo 9:1. Se obtuvo un sólido color amarillo (1.105 g) con un rendimiento del 85%. Punto de fusión 136-138 °C. **IR** (ATR)  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3406, 3238 ( $\text{C}\equiv\text{H}$ ), 3023 ( $\text{C}=\text{H}$ ), 2974 ( $\text{C}=\text{C}$  Aromático), 1705 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 1590 ( $\text{C}-\text{N}$ ), 1204 ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ). **RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.77 (1H, s, H-4), 7.23 (1H, d,  $J = 8.9$  Hz, H-5), 6.58 (1H, dd,  $J = 8.9, 2.5$  Hz, H-6), 6.45 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz, H-8), 3.42 (4H, q,  $J = 7.1$  Hz, H-9), 3.25 (1H, s, H-12), 1.21 (6H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-10). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 161.1 (C-2), 156.4 (C-8a), 151.4 (C-7), 147.0 (C-4), 129.1 (C-5), 109.3 (C-6), 108.0 (C-4a), 103.3 (C-3), 97.2 (C-8), 81.1 (C-11), 78.6 (C-12), 44.9 (C-9), 12.4 (C-10).

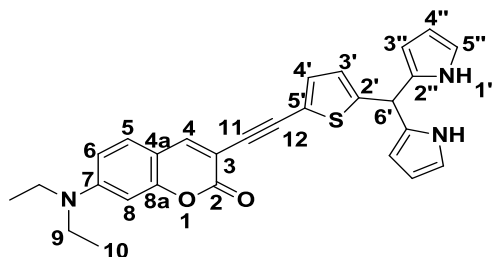
#### Síntesis del 5-((7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)etinin)tiofeno-2-carbaldehído (**5**)

El compuesto **5** se sintetizó a partir de 0.75 g (3.1 mmol) del compuesto **4** y 0.5938 g (3.1 mmol) de 5-bromotiofeno-2-carbaldehído. En un matraz bola se disolvió el 5-bromotiofeno-2-carbaldehído en 25 mL de DIPA (diisopropilamina), se adicionaron 0.03 g (0.15 mmol) de CuI y 0.179 g (0.15 mmol) de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  bajo atmósfera inerte. En otro matraz bola se disolvió el compuesto **4** en 25 mL de diclorometano. Al matraz que contiene 5-bromotiofeno-2-carbaldehído se le adicionó la disolución del compuesto **4**. La reacción se llevó a cabo en atmósfera inerte durante 1 hora y media a 60 °C y se monitoreó por cromatografía en capa fina. Se observó un precipitado rojo ladrillo que se filtró al vacío y se obtuvieron 0.117 g correspondiente a un rendimiento del 80%. Punto de fusión: 160-162 °C. **IR** (ATR)  $\nu_{\max}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3196 ( $\text{C}\equiv\text{H}$ ), 3068 ( $\text{C}=\text{H}$ ), 3044 ( $\text{C}=\text{C}$  Aromático), 2185 ( $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 1718 ( $\text{O}=\text{C}-\text{H}$ ), 1589 ( $\text{C}-\text{N}$ ), 1524 ( $\text{C}-\text{S}$  Tiofeno). **RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 9.79 (1H, s, H-6'), 7.59 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-4'), 7.27 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz H-3'), 7.20 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-5), 6.54 (1H, dd,  $J = 8.6, 2.0$  Hz, H-6), 6.42 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8), 3.39(4H, q,  $J = 7.0$  Hz, H-9), 1.14(6H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-10). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 182.4 (C-6'), 160.4 (C-2), 156.7 (C-8a), 151.7 (C-7), 146.7 (C-2'), 136.2 (C-3'), 132.8 (C-4'), 129.5 (C-5), 109.6 (C-5'), 108.4 (C-6), 103.1 (C-4a), 97.4 (C-3), 93.6 (C-8), 85.8 (C-11), 45.2 (C-12), 29.8 (C-9), 12.5 (C-10). **HRMS (ESI-TOF)**:  $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}$  351.100191, encontrado  $[\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S} + \text{H}]^+$  352.100130.



Síntesis de la 3-((5-(di(1*H*-pirrol-2-il)metil)tiofen-2-il)etininl)-7-(dietilamino)2*H*-cromen-2-ona (**6**)

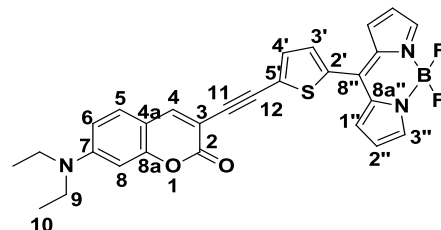
El compuesto **6** se sintetizó a partir de 0.623 g (0.0017 mol) del compuesto **5** al hacerlo reaccionar con 40 equivalentes de pirrol (4.92 mL, 7.09 mmol) y 0.135 mL (0.17 mmol) de ácido trifluoroacético. La reacción se llevó a cabo utilizando 25 mL de diclorometano como disolvente bajo atmósfera de



nitrógeno a temperatura ambiente. La reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina, cada 15 min, la duración de la reacción fue de 45 min. El exceso de pirrol de la mezcla de reacción se eliminó formando un azeótropo con metanol, se evaporó la fase orgánica y se purificó el producto por medio de cromatografía en columna con un sistema de elución hexano/acetato de etilo 9:1. Se obtuvo un sólido café (0.270 g) correspondiente al compuesto **6** con un rendimiento del 33%. Punto de fusión: 152-154 °C. **IR** (ATR)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3351 (N-H Pirrol), 3098 (C=H), 2198 (C≡C), 1708 (C=O), 1614, 1585 (C-N), 1511 (C-S Tiofeno), 718 (C-N Pirrol). **RMN** <sup>1</sup>H ( 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.06 (2H, s, H-5''), 7.72 (1H, s, H-4), 7.26 (1H, d, H-4'), 7.24 (1H, d, *J*=8.9 Hz H-5), 7.13 (1H, d, *J*= 3.7 Hz, H-3), 6.54 (1H, q, *J*= 10 Hz, H-4''), 6.58 (1H, dd, *J*= 8.9, 2.4 Hz, H-6), 6.48 (1H, d, *J*= 2.4 Hz, H-8), 6.17 (1H, q, *J*= 3.1 Hz, H-2''), 6.06 (1H, d, *J*= 1.4 Hz, H-3''), 5.71 (1H, s, H-6'), 3.42 (4H, q, *J*= 7.1 Hz, H-9), 1.22 (6H, t, *J*= 2.6 Hz, H-10). **HRMS (ESI-TOF):** C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S 467.174025, encontrado [C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S+ H]<sup>+</sup> 468.174281.

Síntesis del 5-(((7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)etnil)tiofen-2-il)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (**7**)

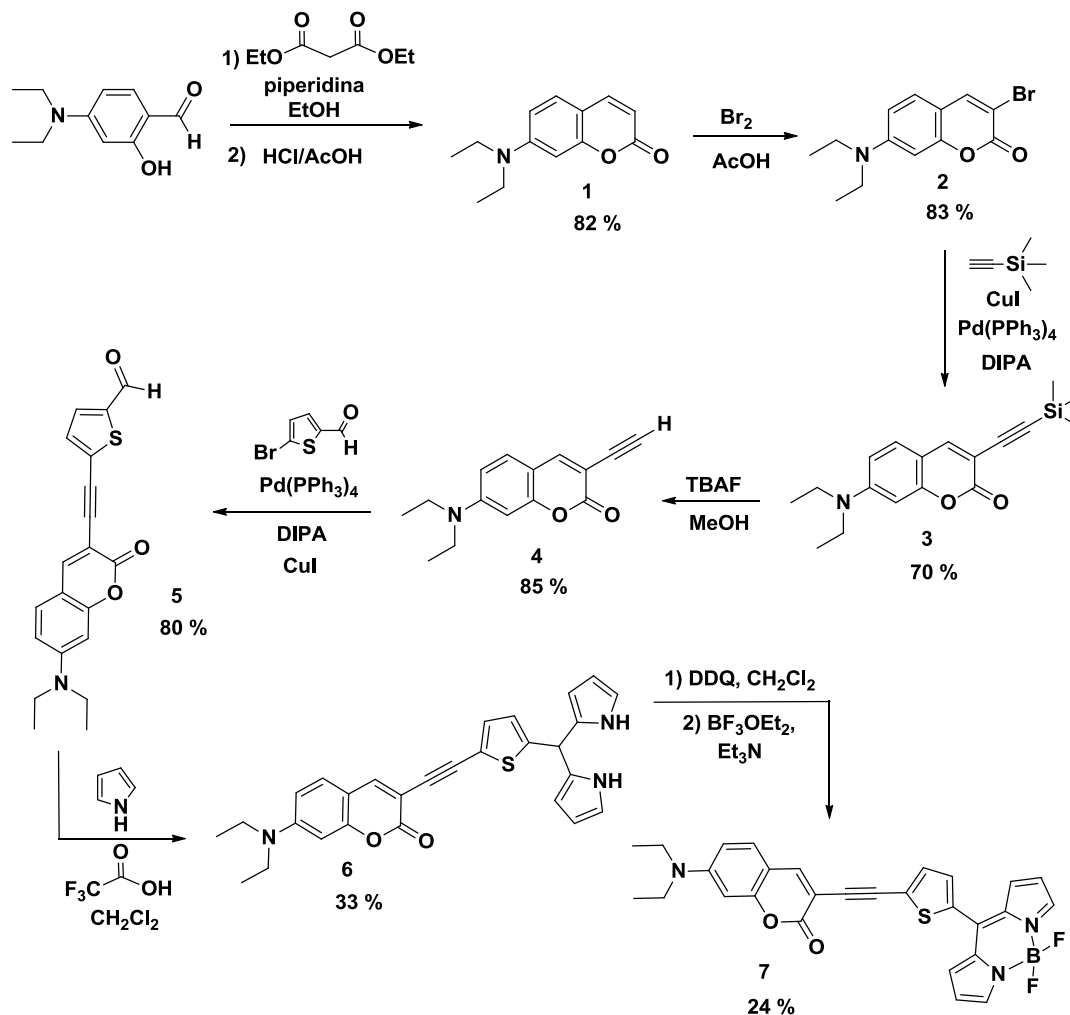
El compuesto **7** se sintetizó a partir de 0.1720 g (0.4 mmol) del compuesto **6**, se llevó a cabo una reacción de oxidación del compuesto **6** con 0.1085g (0.05 mmol) de DDQ (2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona) empleando 30 mL de



diclorometano, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 h. Después se colocó el sistema en hielo y se adicionaron 0.92 mL (7.3 mmol) de  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ , posteriormente se adicionaron 0.76 mL (0.6 mmol) de trietilamina, la reacción se dejó en agitación durante 4 h más. La reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina, se realizó una extracción con agua y diclorometano, se evaporó la fase orgánica y se purificó el crudo por cromatografía en columna con un sistema de elución 85:15 hexano:acetato de etilo. Se obtuvieron 0.052 g de un sólido color negro-morado con un rendimiento del 28%. Punto de fusión: 114-118 °C. IR (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3106 (C=H), 2178 (C $\equiv$ C), 1709 (C-O-C), 1585 (B-N), 1505 (B-F), 1353 (B-N), 812 (B-F). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.86 (1H, s, H-3''), 7.76 (1H, s, H-4), 7.41 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz H-3'), 7.35 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz H-4'), 7.22 (1H, s, H-1''), 7.19 (1H, s, H-5), 6.55 (1H, s, H-6), 6.53 (1H, s, H-2''), 6.43 (1H, s, H-8) 3.38 (4H, q,  $J = 6.9$  Hz, H-9), 1.66 (6H, t,  $J = 6.9$  Hz, H-10). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 160.5 (C-2), 156.6 (C-8a), 151.6 (C-7), 146.2 (C-3''), 143.9 (C-4), 138.4 (C-2'), 135.5 (C-5'), 134.2 (C-8''), 133.0 (C-4'), 132.8 (C-3'), 131.3 (C-1''), 129.7 (C-8a''), 129.3 (C-5), 118.7 (C-2''), 109.5 (C-6), 108.4 (C-4a), 103.3 (C-3), 97.3 (C-8), 93.0 (C-11), 85.3 (C-12), 45.0 (C-9), 12.5 (C-10). RMN  $^{11}\text{B}$  [128 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  (ppm): 0.20 (t,  $J_{\text{B-F}} = 28.4$  Hz). RMN  $^{19}\text{F}$  [376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  (ppm): -145.15 (q,  $J_{\text{B-F}} = 28.4$  Hz). HRMS (ESI-TOF):  $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$  513.156662, encontrado  $[\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S} + \text{H}]^+$  514.156842.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Esquema general de síntesis



**Esquema 25.** Ruta sintética para obtener los intermediarios 1-6 y la molécula objetivo 7.

La molécula objetivo **7** se sintetizó tal y como se muestra en el Esquema 25. Primero se llevó a cabo una reacción de condensación de Knoevenagel entre el malonato de dietilo y el 4-dietilaminosalicilaldehído, empleando piperidina como base, el éster de la cumarina que se formó, se hidrolizó y se descarboxiló bajo condiciones ácidas, empleando una mezcla de HCl/AcOH a reflujo obteniéndose el compuesto **1**, el cual se bromó en la posición tres, empleando Br<sub>2</sub> en ácido acético para formar el compuesto **2**, dicho compuesto se sometió a una reacción de acoplamiento de Sonogashira empleando etiniltrimetilsilano, la desprotección del alquino en el compuesto **3** con TBAF condujo al

compuesto **4**, que se acopló al 5-bromotiofeno-2-carboxaldehído mediante una reacción de acoplamiento de Sonogashira obteniéndose el aldehído **5**, la reacción de condensación entre el compuesto **5** y exceso de pirrol conduce a la formación del derivado de dipirrometano **6** que tras una reacción de oxidación con DDQ y una reacción de quelación con  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  empleando como base trietilamina conduce a la formación de la molécula objetivo **7**.

En el Esquema 25, se muestran los rendimientos obtenidos para cada uno de los compuestos, así como su punto de fusión. Los rendimientos para los compuestos **1-5**, van de regulares a buenos. En el caso del derivado de dipirrometano **6**, su rendimiento se ve disminuido, debido a que la reacción que conduce a su formación también genera productos de polimerización. En el caso del compuesto **7**, el rendimiento de igual manera es bajo y su rendimiento es parecido al descrito en la literatura para compuestos análogos. Con respecto a los valores de punto de fusión podemos concluir que los productos son termoestables, ya que tienen puntos de fusión mayores a 100 °C, exceptuando al compuesto **1**.

## Espectroscopia de RMN para los compuestos 1-6

### Espectroscopia de RMN $^1\text{H}$ y RMN $^{13}\text{C}$

A continuación, se analizarán los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para explicar los desplazamientos químicos comunes a los compuestos **1-6**, y los desplazamientos químicos particulares de cada compuesto dependiendo del sustituyente de la posición 3 del núcleo de la cumarina.

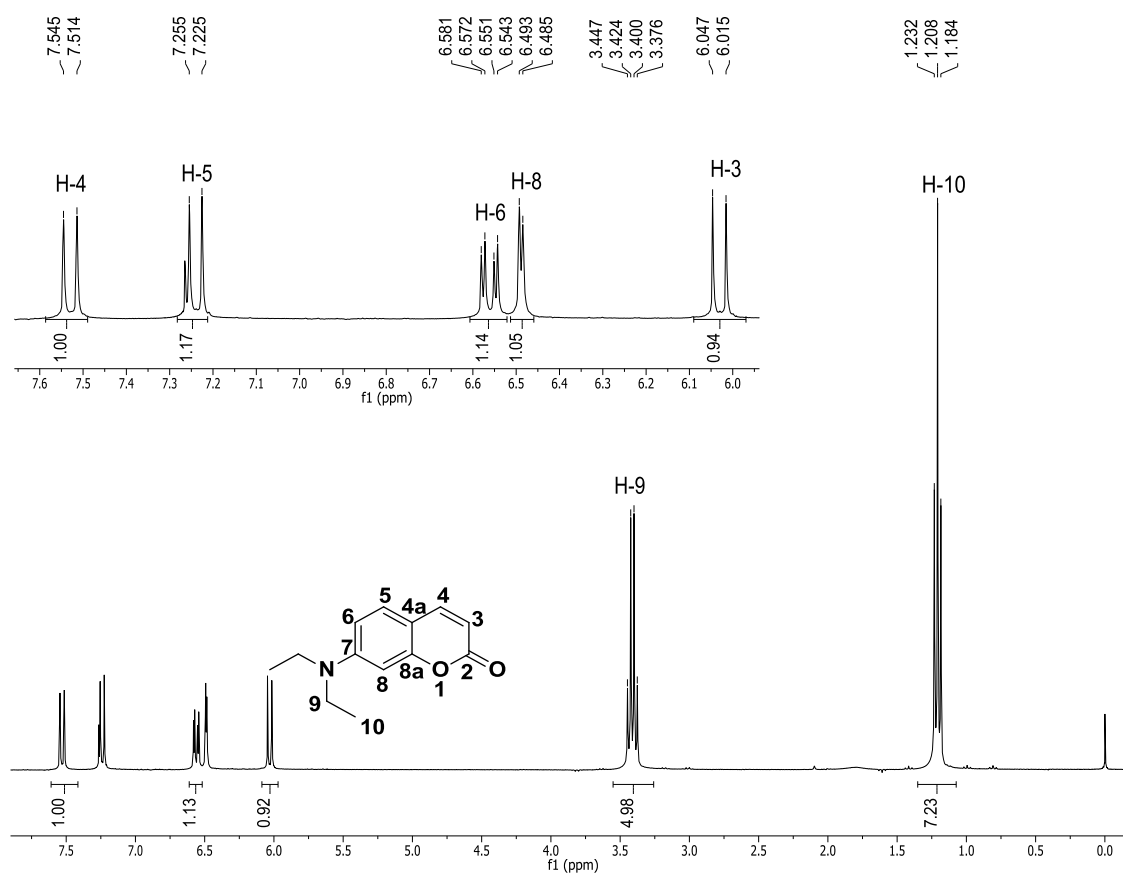
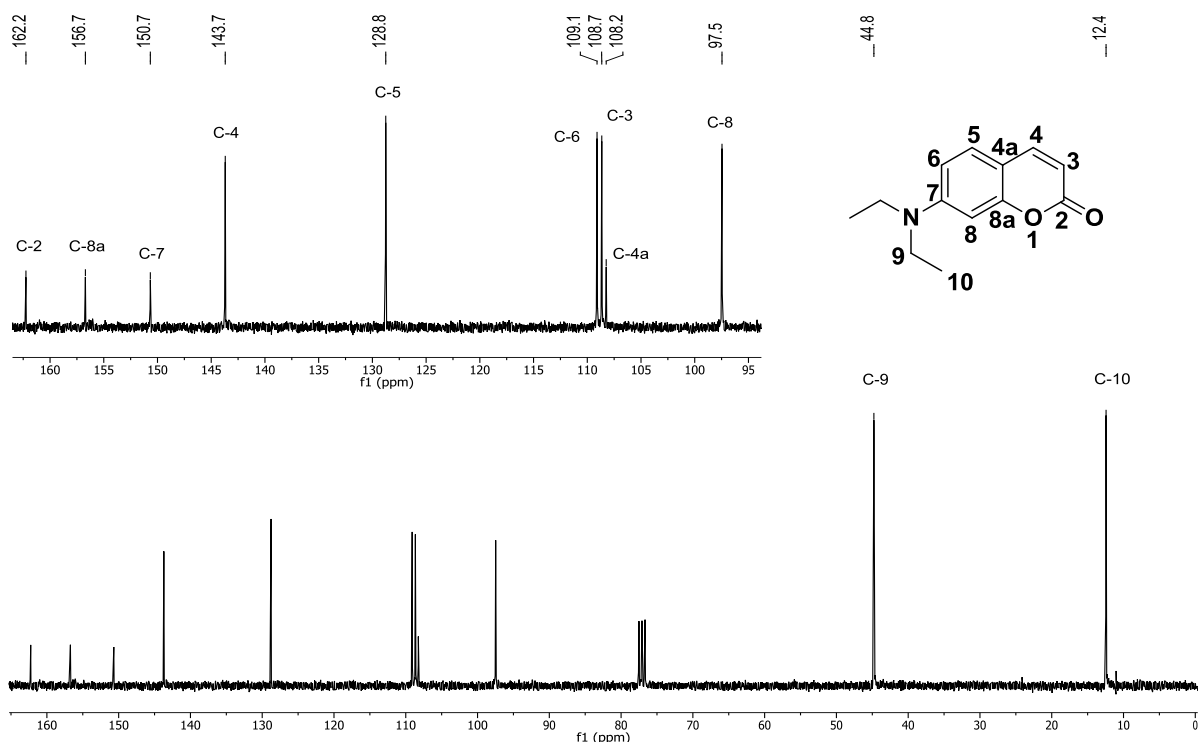


Figura 21. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto **1**.



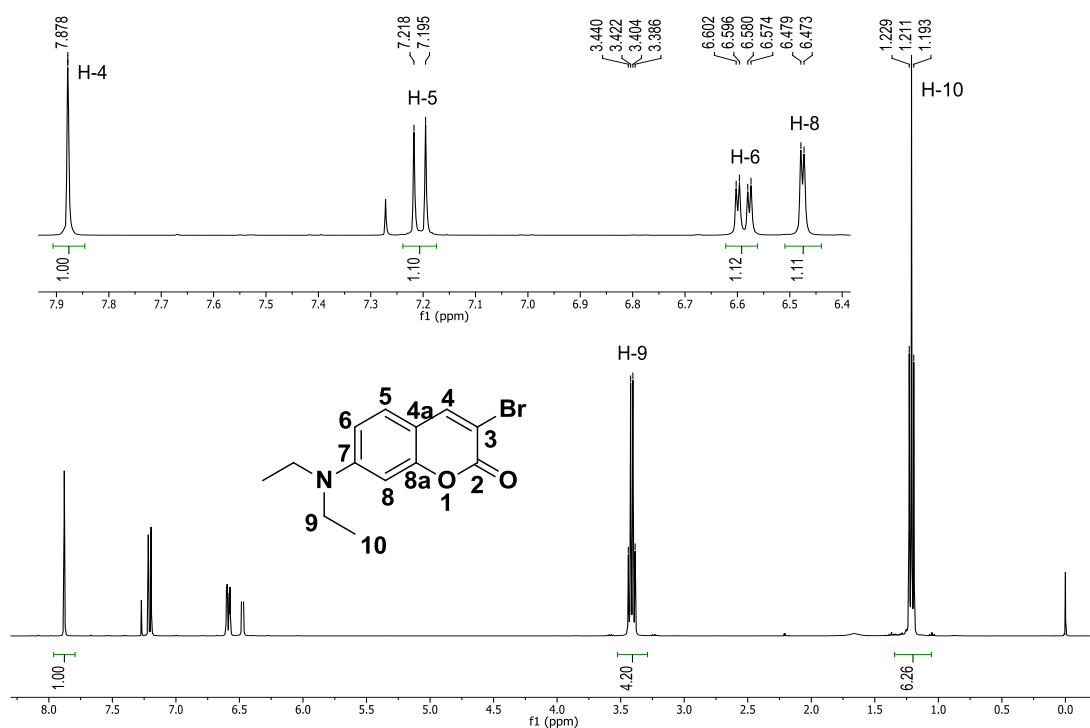
**Figura 22.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C a 75 MHz en CDCl<sub>3</sub> para el compuesto 1.

En la Figura 21 se muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H para el compuesto 1, se puede observar una señal doble que aparece en 7.53 ppm correspondiente al hidrógeno H-4, este hidrógeno se encuentra acoplado con el hidrógeno H-3 que aparece como una señal doble en 6.03 ppm, la constante de acoplamiento tiene un valor aproximado de  $J_{H4-H3} = 9.1$  Hz. En 7.24 ppm aparece una señal doble correspondiente al hidrógeno H-5 que se encuentra acoplado con H-6 con una constante de acoplamiento  $J_{H6-H5} = 8.8$  Hz. La señal doble de dobles correspondiente al hidrógeno H-6 aparece en 6.56 ppm, esta multiplicidad se debe al acoplamiento de H-6 con H-5 y H-8, las constantes de acoplamiento son  $J_{H6-H5} = 8.8$  Hz y  $J_{H6-H8} = 2.5$  Hz. La señal correspondiente al hidrógeno H-8 aparece como una señal doble en 6.49 ppm. La señal cuádruple que aparece en 3.42 ppm corresponde a los hidrógenos H-9 que se encuentran acoplados con los hidrógenos H-10 cuya señal triple aparece a 1.22 ppm, la constante de acoplamiento entre los hidrógenos H-9 y H-10 es  $J_{H10-H9} = 7.0$  Hz

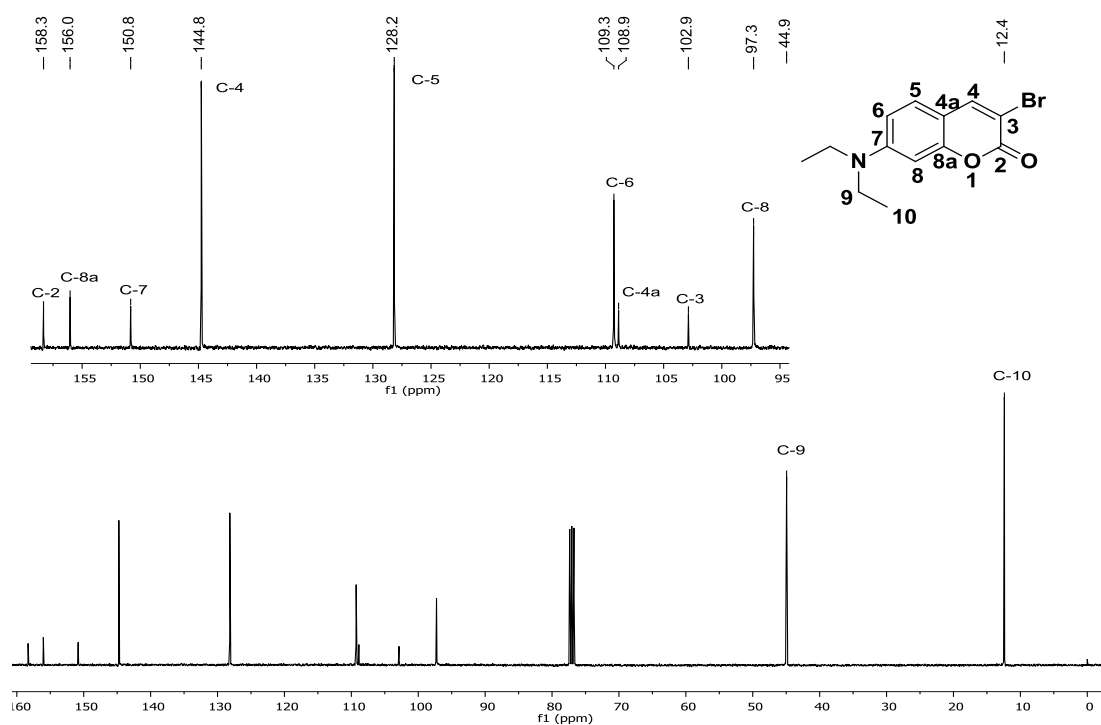
Misma descripción se puede apreciar ahora en la Figura 22 donde se muestra el espectro de RMN de <sup>13</sup>C para el compuesto 1. En 162.2 ppm, aparece la señal del grupo carbonilo C-2, a continuación, se encuentran las señales de los carbonos aromáticos cuaternarios C-8a (156.7 ppm), C-7 (150.7 ppm) y el carbono vinílico C-4



(143.7 ppm) estos cuatro átomos de carbono se encuentran cercanos a grupos atradores de densidad electrónica, lo cual genera que estos átomos se encuentren más desprotegidos y generen una señal a campo más bajo. En 128.8 ppm aparece la señal del carbono C-5, seguida de las señales correspondientes a los carbonos C-6 (109.1 ppm), C-4a (108.2 ppm), C-3 (108.3 ppm) y C-8 (97.5 ppm). Los carbonos alifáticos aparecen a campo más alto, el carbono C-9 aparece en 44.8 ppm, y el carbono C-10 se encuentra en 12.4 ppm.



**Figura 23.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto 2.



**Figura 24.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto **2**.

En la Figura 23 se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para el compuesto **2**, se puede observar una señal simple que aparece en 7.88 ppm que corresponde al hidrógeno H-4 y desaparece la señal doble del hidrógeno H-3 con respecto al espectro del compuesto **1**.

En la Figura 24 se observa el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **2**; la señal del carbono C-3 (102.9 ppm) se desplaza a campo alto, por la presencia del grupo bromo en esa posición, actuando como un grupo donador por efecto de resonancia, con respecto al carbono C-3 del compuesto **1**.

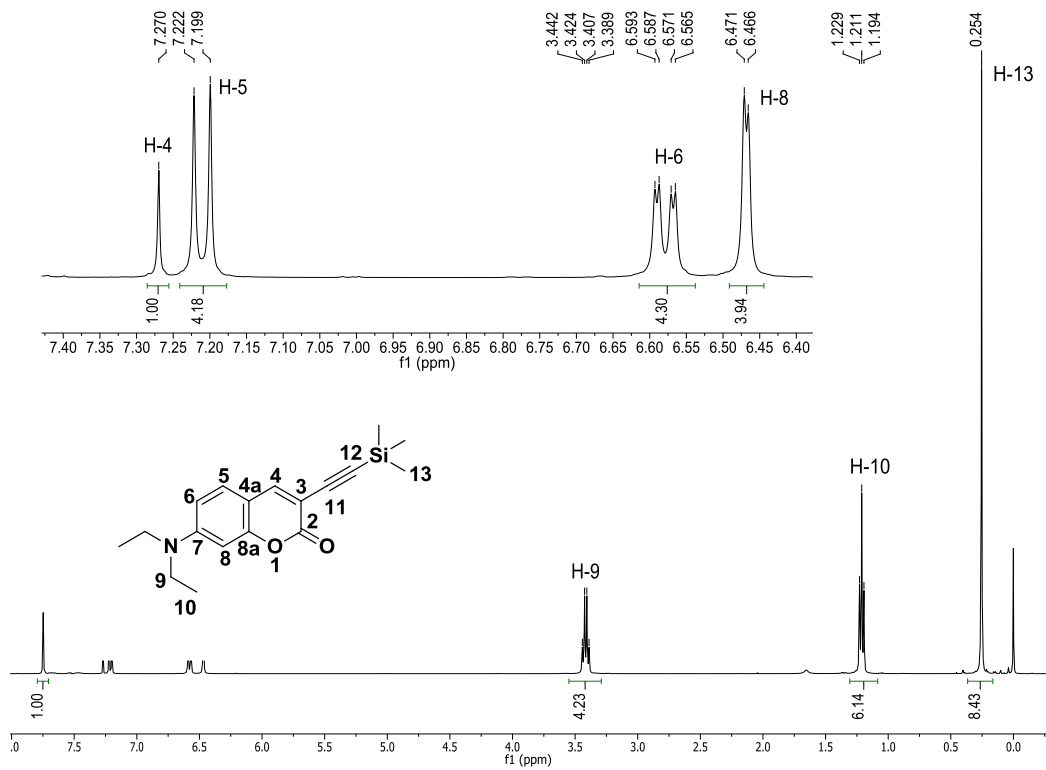


Figura 25. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto 3.

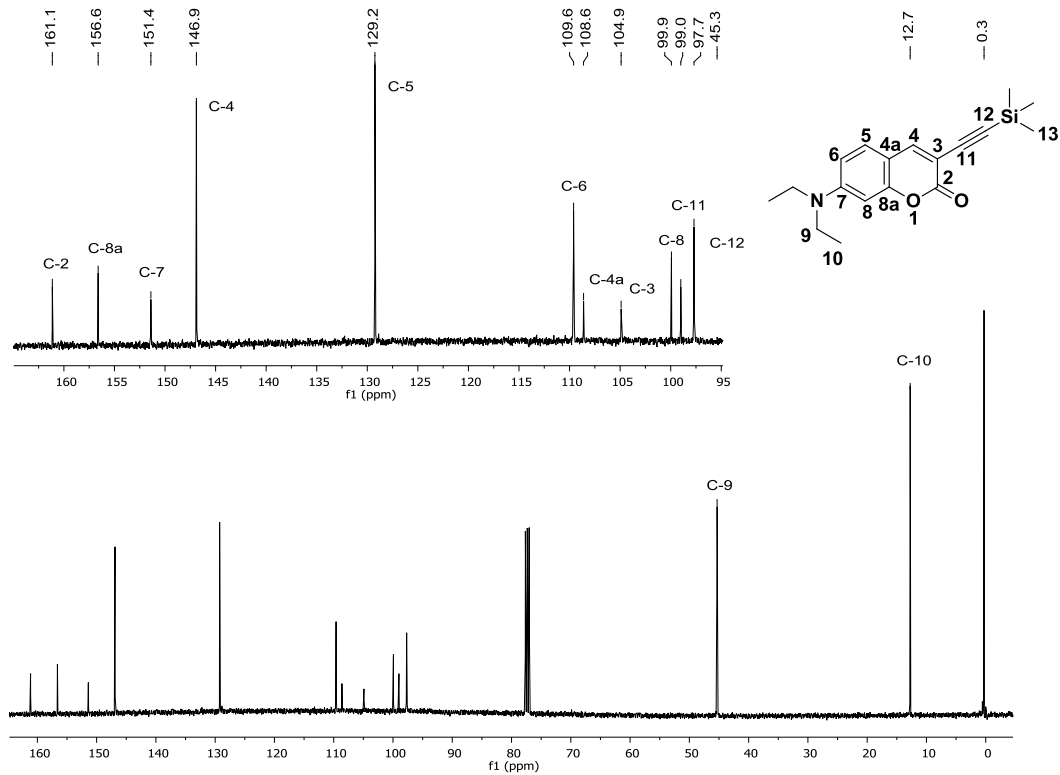


Figura 26. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto 3.

En la Figura 25 se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para el compuesto **3**, se puede observar una nueva señal simple que aparece en 0.25 ppm que corresponde a los hidrógenos H-13. En RMN de  $^1\text{H}$  la abundancia del hidrógeno es del 100%, de carbono  $^{13}\text{C}$  del 1.1%, mientras que el  $^{29}\text{Si}$  posee una abundancia aproximada del 5%. Cabe destacar la presencia de señales satélites de Si-H y C-H en la señal del hidrógeno H-13. Se encuentra reportado en la literatura que el TMS muestra constantes de acoplamiento  $J_{\text{Si-H}} = 7.0 \text{ Hz}$  y  $J_{\text{C-H}} = 118 \text{ Hz}$ , con respecto a las satélites para los hidrógenos H-13 mostrando constantes de acoplamiento parecidas,  $J_{\text{H-Si}} = 7.1 \text{ Hz}$  y  $J_{\text{C-H}} = 120 \text{ Hz}$ , esto permite de manera más amplia justificar la presencia del silicio en el compuesto **3**.

En la Figura 26 se muestra el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **3**, se puede observar la aparición de tres nuevas señales con respecto al compuesto **2**. En 99 ppm y 97.7 ppm correspondientes a los carbonos C-11 y C-12 del alquino y una señal muy cercana a cero del C-13 (0.3 ppm) debido a la presencia de los grupos metilos unidos al silicio que al ser menos electronegativo que el carbono, hace que C-13 aparezca a campo más alto, cercano al TMS.

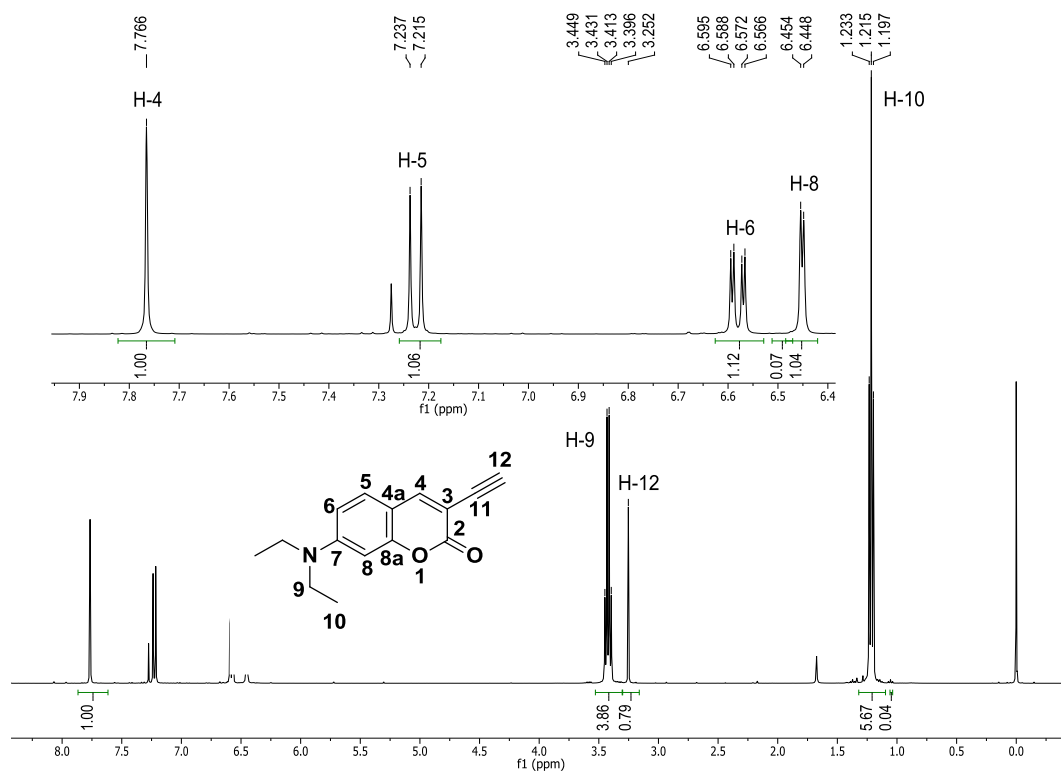
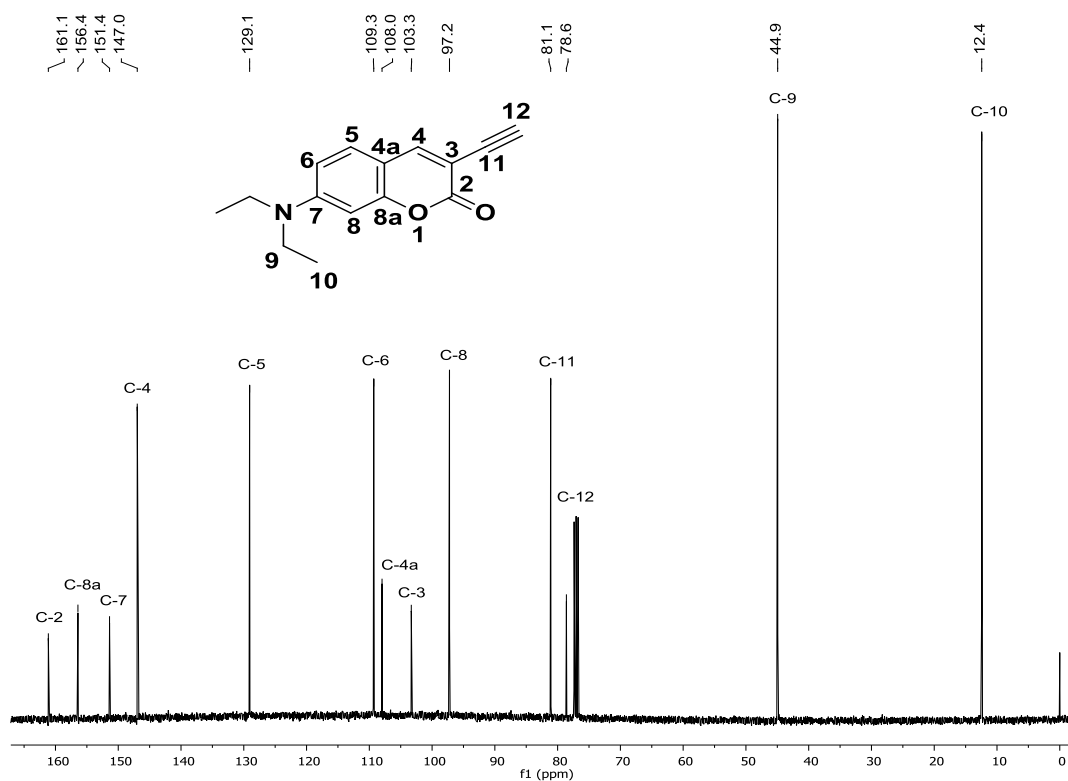


Figura 27. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto **4**.



**Figura 28.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C a 100 MHz en CDCl<sub>3</sub> para el compuesto **4**.

En la Figura 27 se muestra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H para el compuesto **4**, se puede observar una nueva señal simple que aparece en 3.25 ppm que corresponde al hidrógeno H-12 y la desaparición de la señal simple del H-13 con respecto al compuesto **3**.

En la Figura 28 se muestra el espectro de RMN de <sup>13</sup>C para el compuesto **4**, se puede observar la desaparición del C-13 del compuesto **3** y se mantienen las señales del alquino del C-11 y C-12 ligeramente más desplazadas a campo alto (81.1 y 78.6 ppm respectivamente).

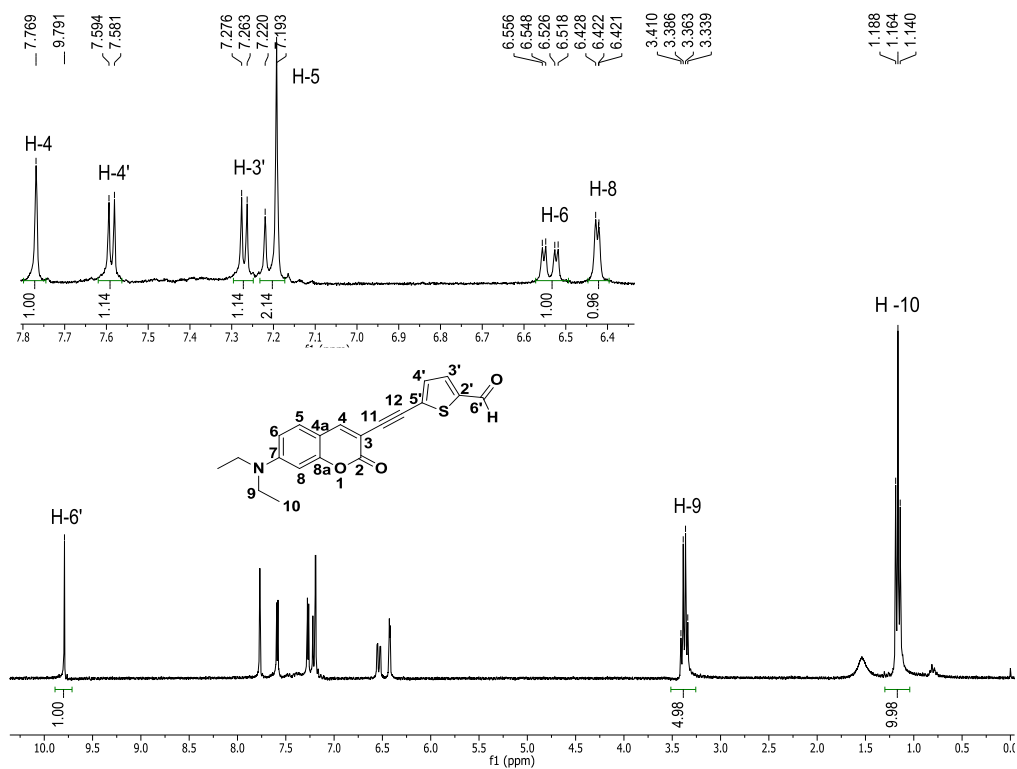


Figura 29. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto 5.

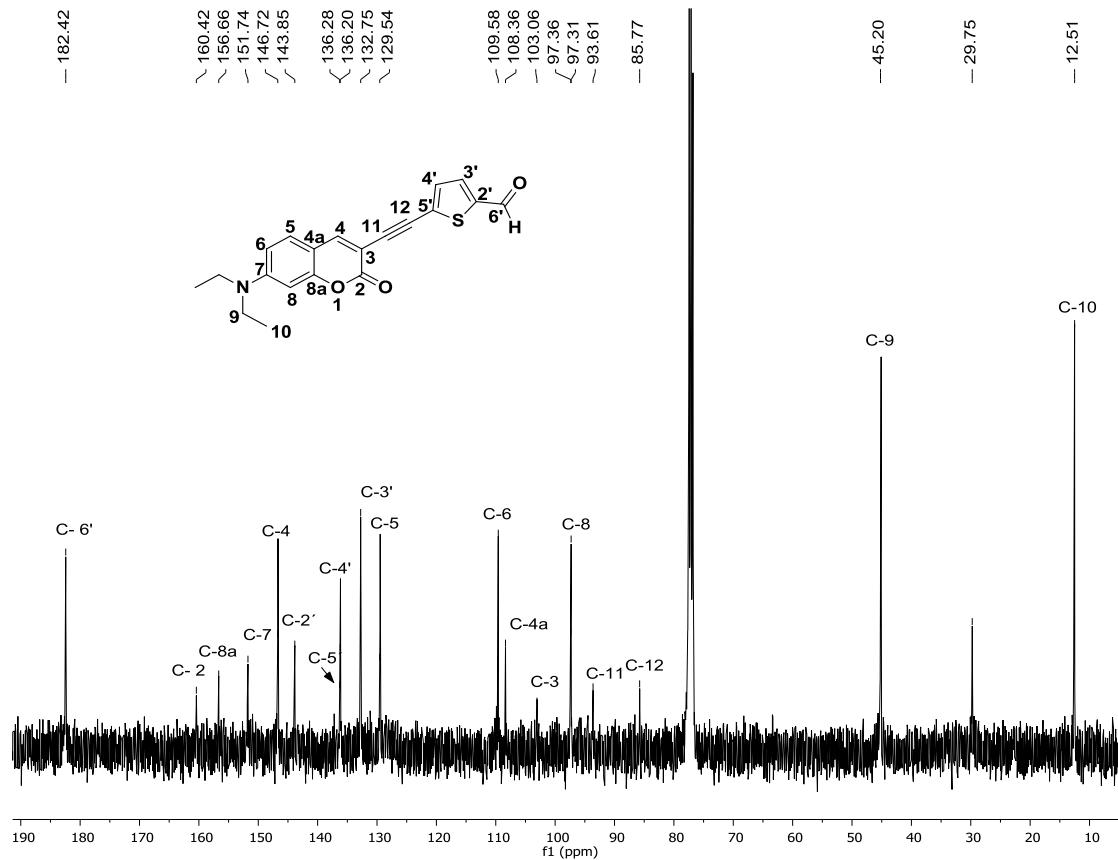
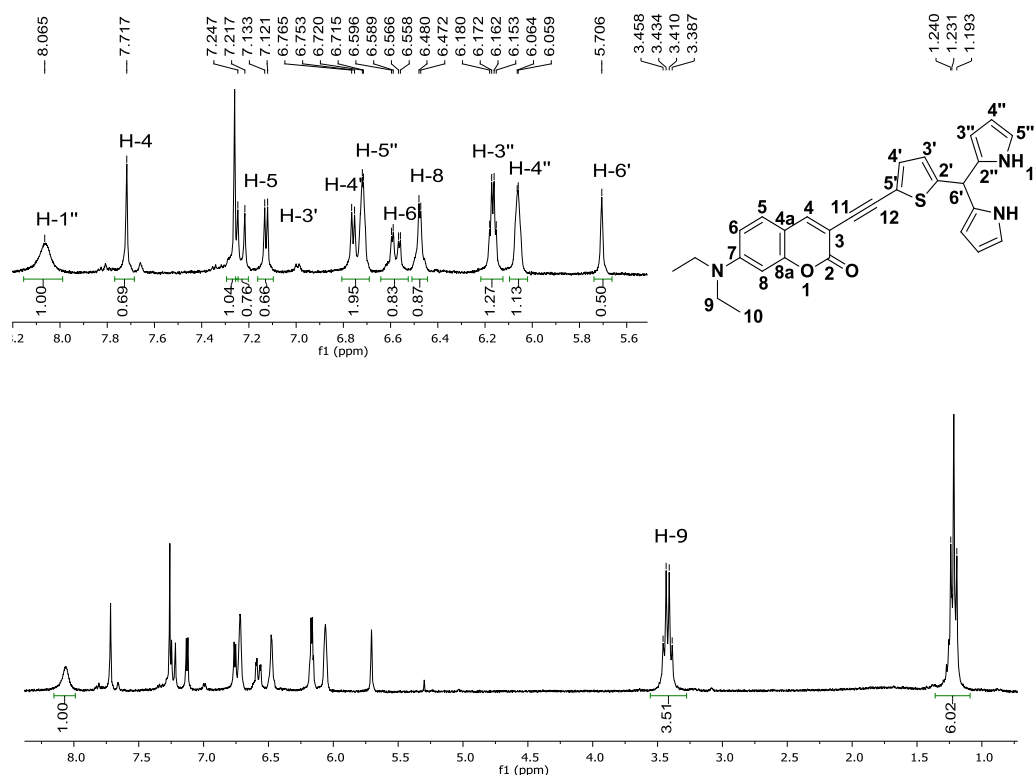


Figura 30. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto 5.

En la Figura 29 se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para el compuesto **5**, se puede observar la presencia de 3 nuevas señales con respecto al compuesto **4**, una de ellas es la señal simple que aparece en 9.79 ppm correspondiente al hidrógeno H-6' del aldehído, junto con las señales dobles de los hidrógenos H-4' y H-3' (7.59 ppm y 7.27 ppm respectivamente) que se encuentran acoplados entre sí, formando un sistema AB y que muestran una constante de acoplamiento de  $J = 4.0$  Hz.

En la Figura 30 se muestra el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **5**, que con respecto a la Figura 26, se pueden observar nuevas señales, en 182.4 ppm se encuentra el carbono C-6' correspondiente al carbono del aldehído, mientras que en 143.9, 136.3, 136.2 y 132.8 ppm aparecen las señales pertenecientes a los carbonos C-2', C-5', C-4' y C-3' respectivamente que corresponden a los carbonos del núcleo de tiofeno.



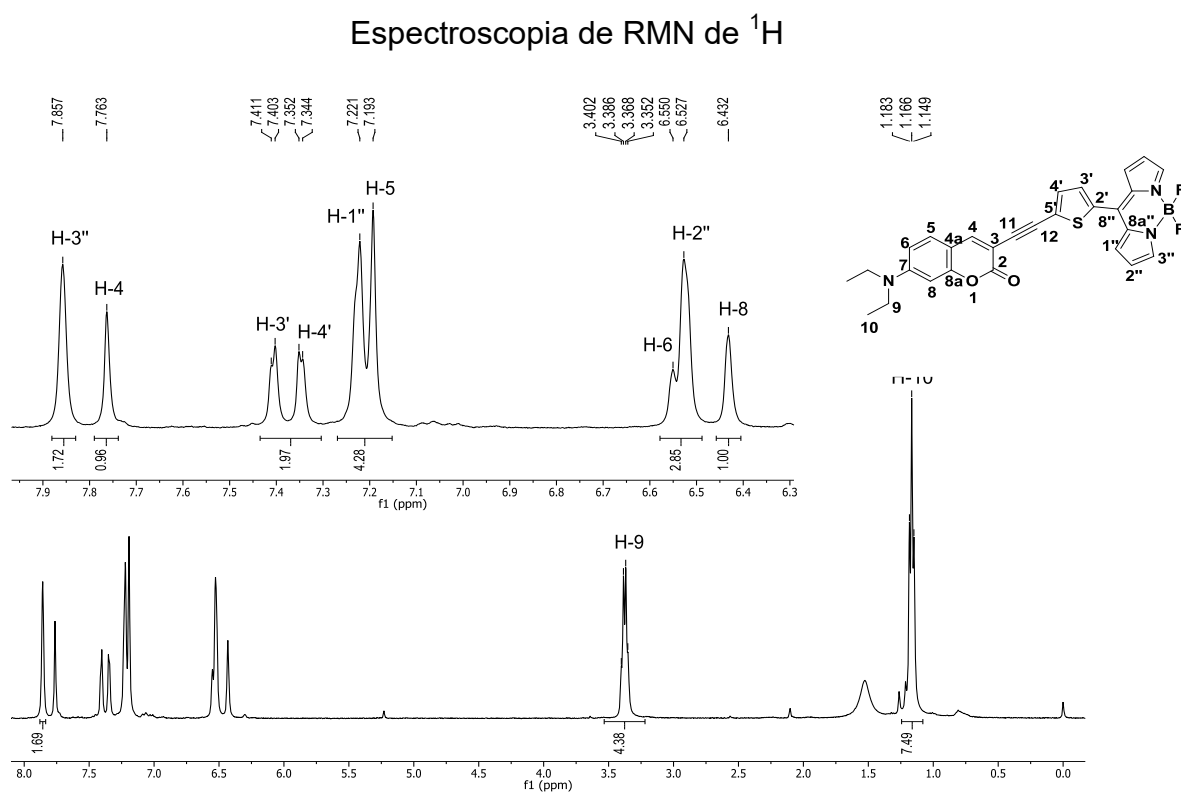
**Figura 31.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto **6**.

En la Figura 31 se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para el compuesto **6**, con respecto al compuesto **5** se observa la desaparición de la señal del hidrógeno H-6' en 9.79 ppm y ahora aparece a campo más alto en 5.70 ppm como una señal simple, esto

debido a la presencia de las dos unidades de pirrol, donde el hidrógeno unido al nitrógeno del grupo pirrol se localiza en 8.06 ppm como una señal simple y ancha, en 6.72 ppm aparece la señal correspondiente al hidrógeno H-4'', seguida de la señal del hidrógeno H-2'' en 6.17 ppm y a continuación en 6.06 ppm el H-3''.

### Espectroscopia de RMN para el compuesto 7

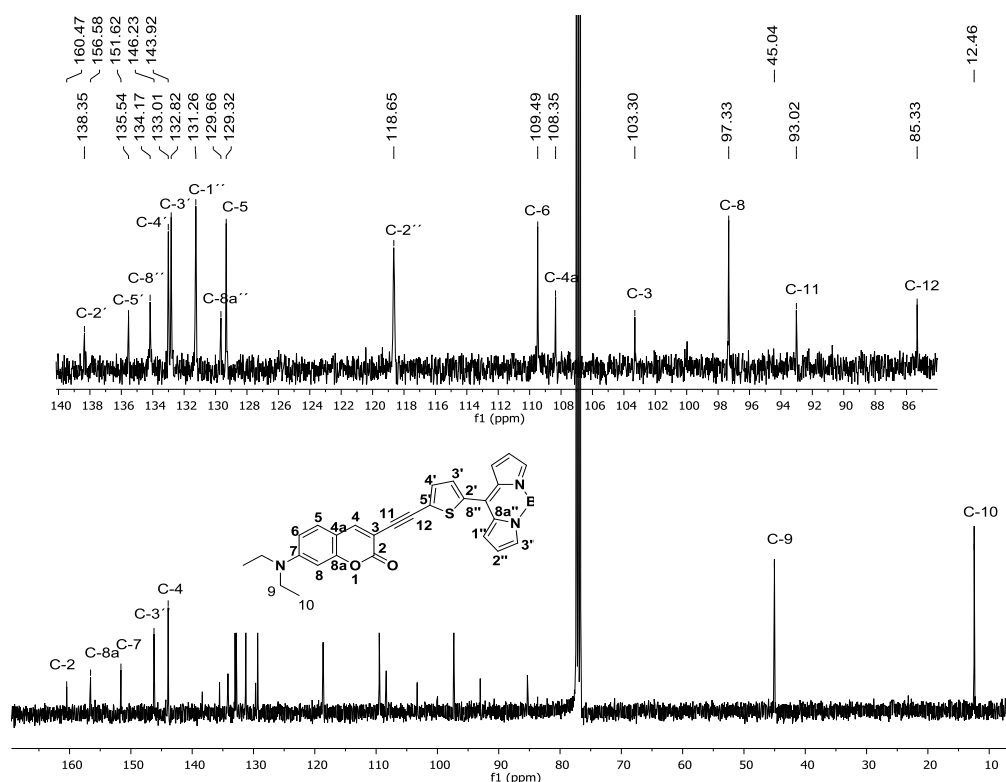
A continuación, se muestran los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el compuesto 7, así como los espectros bidimensionales COSY y HMBC, los espectros de  $^{11}\text{B}$  y  $^{19}\text{F}$ , y el espectro de infrarrojo.



**Figura 32.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto 7.



## Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$



**Figura 33.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto **7**.

En la Figura 32 se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para el compuesto **7**, se puede observar una señal simple que aparece en 7.86 ppm que corresponde al hidrógeno H-3'', perteneciente al hidrógeno vecino del nitrógeno que se encuentra unido al núcleo del BODIPY, por tener un espín diferente a  $\frac{1}{2}$ , la señal tiene un ensanchamiento; en seguida aparece el H-4 como una señal simple en 7.76 ppm, que corresponde al núcleo de la cumarina. En 7.41 y 7.35 ppm se encuentran los hidrógenos H-3' y H-4' respectivamente, como señales dobles, que se encuentran acopladas entre ellas y que muestran una constante de acoplamiento de  $J = 3.3$  Hz correspondiente al tiofeno. Cercana a estas señales se encuentra el H-1'' en 7.22 ppm, que pertenece al núcleo del BODIPY e inmediatamente cerca en 7.19 ppm el H-5 que corresponde el núcleo de la cumarina. En 6.55 ppm está el H-6 perteneciente al núcleo de la cumarina, debería de mostrarse como una señal doble de dobles pero hay un ensanchamiento de la señal por lo que se muestra como si fuera una señal simple, pero se encuentra a su vez sobre puesta la señal con H-2'' en 6.52 ppm que aparece como una señal simple. En 6.43 ppm aparece el H-8 que pertenece al núcleo de la cumarina, en campo alto

aparecen las señales alifáticas del H-9 en 3.37 ppm, como una señal cuádruple con una constante de acoplamiento de  $J= 6.9$  Hz y el H-10 en 1.16 ppm, como una señal triple, con una constante de acoplamiento de  $J= 6.9$  Hz.

En la Figura 33 se muestra el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **7**; en 160.5 ppm, aparece la señal del carbono del carbono C-2, seguido por el carbono cuaternario C-8a en 156.6 ppm, en 151.6 ppm aparece el C-7 perteneciente al núcleo de la cumarina, en 146.2 ppm la aparición de la señal del carbono C-3'' que corresponde a la estructura del BODIPY, seguida de la señal está el C-4 en 143.9 ppm del núcleo de la cumarina. En 138.4 ppm se encuentra el C-2' perteneciente al tiofeno junto con el C-5' en 135.5 ppm, después se encuentra en 134.2 ppm el C-8'' perteneciente al núcleo del BODIPY y a continuación las dos señales restantes del núcleo del tiofeno del C-4' y C-3' en 133.0 ppm y 132.8 ppm respectivamente, en 131.3 ppm esta la señal del C-1'' y en 129.7 ppm C-8a'' que corresponden al núcleo del BODIPY, en 129.3 ppm se encuentra el C-5, el C-2'' aparece en 118.7 ppm, aparecen las cuatro señales restantes del núcleo de la cumarina en 109.5 ppm, 108.4 ppm, 103.3 ppm y 97.3 ppm que corresponden a los C-6, C-4a, C-3 y C-8 respectivamente, en 93.0 ppm aparece el C-11 seguido del C-12 en 85.3 ppm que corresponden al enlace triple C-C, por último los carbonos alifáticos aparecen a campo alto, el carbono C-9 aparece en 45.0 ppm, y el carbono C-10 aparece en 12.5 ppm.

#### Espectroscopia de RMN de $^1\text{H}$ bidimensional HSQC

Con el objetivo de asignar correctamente los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **7** se utilizó la correlación heteronuclear HSQC (heteronuclear multiple-quantum correlation) que permite observar los acoplamientos C-H a un enlace. En la Figura 34 se puede observar el espectro bidimensional HSQC, en él se aprecia que el hidrógeno H-3'' (7.86 ppm) se encuentra acoplado con el carbono C-3'' (151.6 ppm), el hidrógeno H-1'' (7.22 ppm) se encuentra acoplado con el carbono C-1'' (131.3 ppm), el hidrógeno H-2'' (6.53 ppm) se encuentra acoplado con el carbono C-2'' (118.7 ppm), etc.

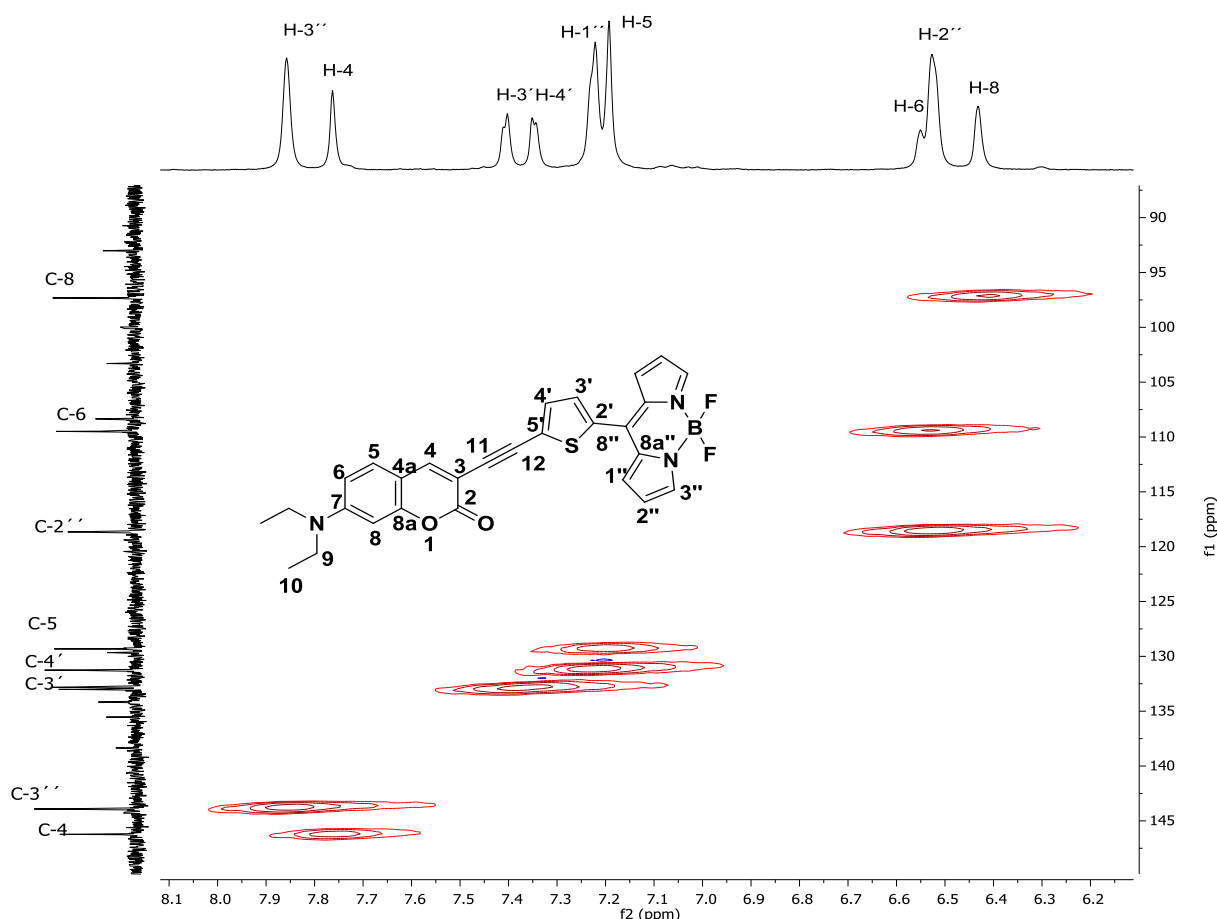
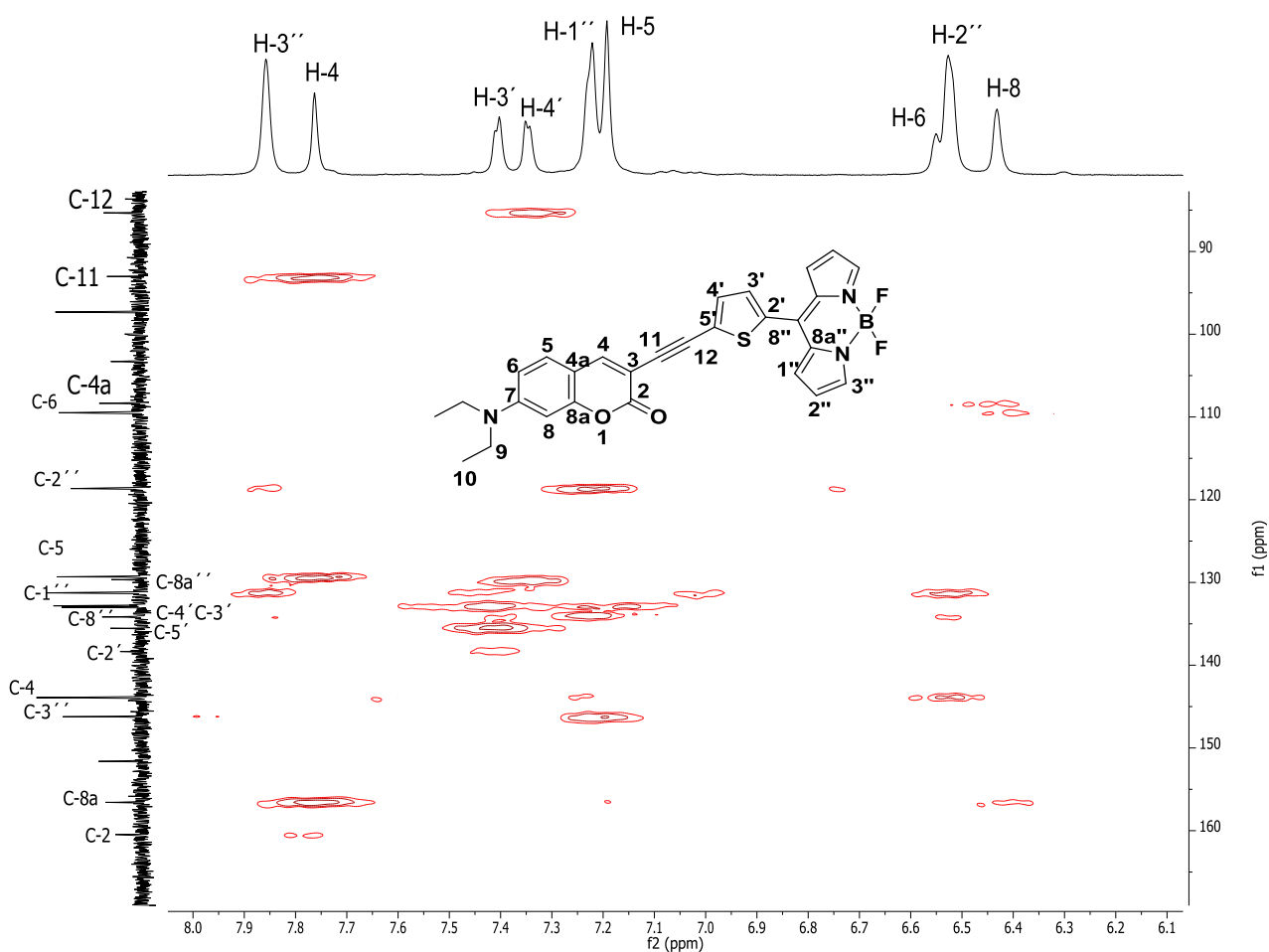


Figura 34. Espectro HSQC que muestra la región aromática del compuesto 7.

### Espectroscopia de RMN de $^1\text{H}$ bidimensional HMBC

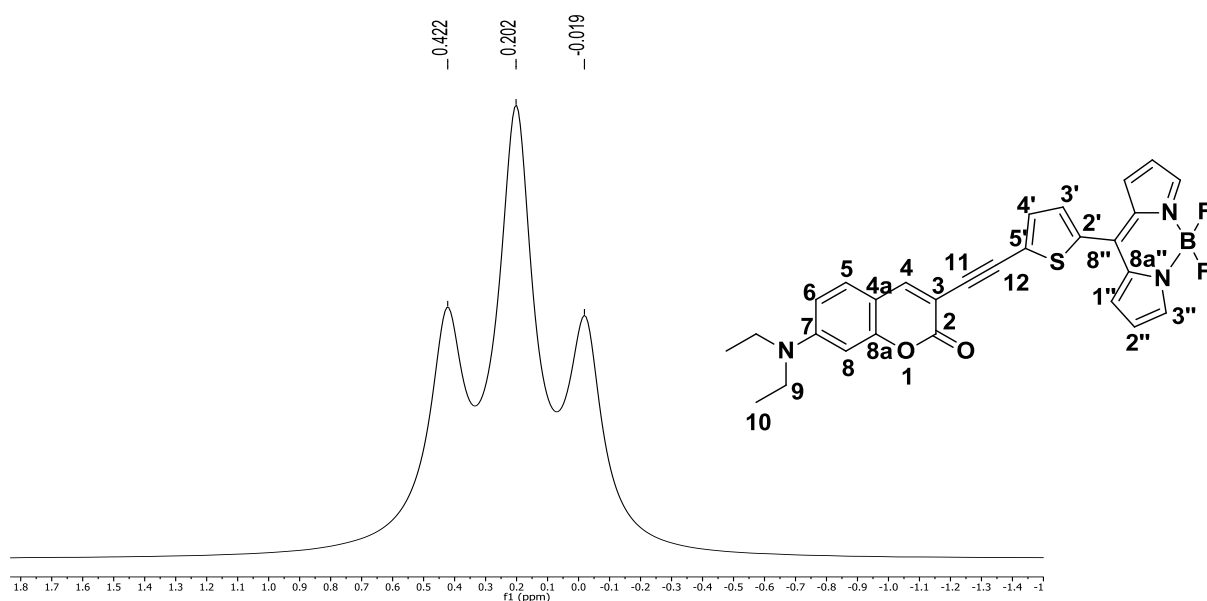
Se utilizó la espectroscopia heteronuclear de dos dimensiones HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) con la finalidad de poder determinar la identidad de los hidrógenos y carbonos 3' y 4' así como de 11 y 12, ya que estos átomos presentan desplazamientos muy parecidos. La correlación HMBC permite observar acoplamientos carbono e hidrógeno de 2 a 4 enlaces. En la Figura 35 podemos observar que el hidrógeno H-4 (7.76 ppm) se encuentra acoplado a tres enlaces con los carbonos C-11 (93.0 ppm), C-5 (129.3 ppm), C-8a (156.6 ppm) y C-2 (160.5 ppm) y con el carbono C-3 (156.6 ppm) a dos enlaces. El H-3' (7.41 ppm) se encuentra acoplado a tres y cuatro enlaces con los carbonos C-5' (129.3 ppm), C-8'' (134.2 ppm), y con el carbono C-8a'' (129.7 ppm). El H-4' (7.35 ppm) se encuentra acoplado con el C-12 (85.3 ppm), C-8''

(134.2 ppm) y el C-5' (135.5 ppm). El hidrógeno H-1'' (7.22 ppm) se encuentra acoplado a dos y tres enlaces con los carbonos C-8a'' (129.7 ppm), C-2 (160.5 ppm) y con los carbonos C-8'' (134.2 ppm) y C-3'' (146.2 ppm). El hidrógeno H-6 (6.55 ppm) se encuentra acoplado a dos y cuatro enlaces con los carbonos C-2 (160.5 ppm) y el carbono C-4 (143.9 ppm). El H-2'' (6.52 ppm) se encuentra acoplado a dos y cuatro enlaces con los carbonos C-1'' (131.3 ppm), y los carbonos C-8'' (132.2 ppm) y C-3'' (146.2 ppm). El H-8 (6.43 ppm) se encuentra acoplado a dos y tres enlaces con los carbonos C-8a (156.6 ppm), y los carbonos C-6 (109.5 ppm).



**Figura 35.** Espectro HMBC que muestra la región aromática del compuesto 7.

## Espectroscopia de RMN $^{11}\text{B}$



**Figura 36.** Espectro de RMN de  $^{11}\text{B}$  a 128 MHz en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto **7**.

En la Figura 36 se muestra el espectro de RMN de  $^{11}\text{B}$  para el compuesto **7**, se puede observar una multiplicidad triple, debido al acoplamiento flúor-boro ( $J_{\text{B-F}}=28.4$  Hz), para comprobar que efectivamente este espectro corresponde a estos acoplamientos, se empleó la fórmula de predicción de patrones de acoplamiento espín-espín  $m_B = 2nI + 1$ , el número de espín ( $I$ ) del  $^{19}\text{F}$  es de  $1/2$  y el número de átomos de flúor a los que se encuentra acoplado el boro ( $n$ ) es 2, por lo que la multiplicidad del boro es:

$$m_B = 2nI + 1$$

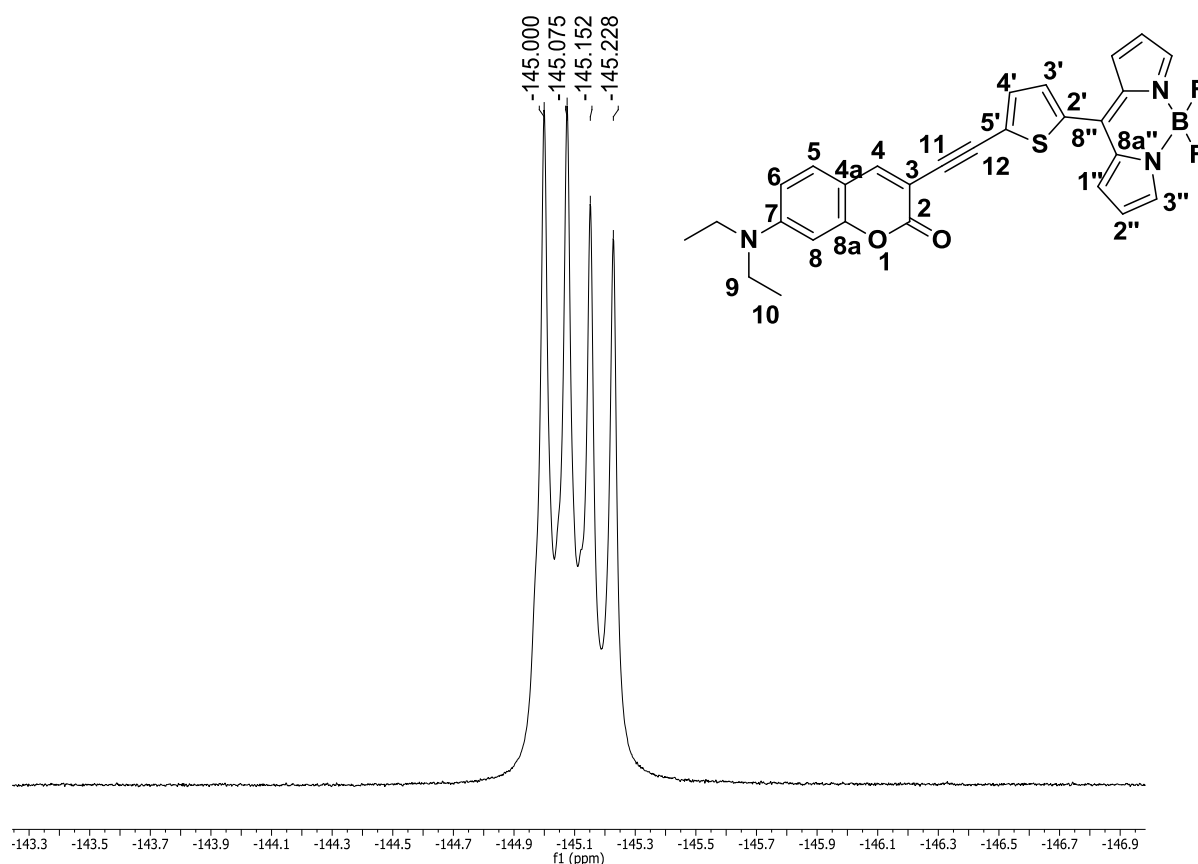
$$m_B = 2(2)\left(\frac{1}{2}\right) + 1$$

$$m_B = 2 + 1$$

$$m_B = 3$$

Por lo tanto, se espera una señal triple, misma que puede confirmarse en la Figura 36, además, el desplazamiento para esta señal triple corresponde a la reportada en la literatura.<sup>80</sup>

## Espectroscopia de RMN $^{19}\text{F}$



**Figura 37.** Espectro de RMN de  $^{19}\text{F}$  a 376 MHz en  $\text{CDCl}_3$  para el compuesto **7**.

En la Figura 37 donde se muestra el espectro de RMN de  $^{19}\text{F}$  para el compuesto **7**, se puede observar una multiplicidad cuádruple, debido al acoplamiento flúor-boro ( $J_{\text{B-F}} = 28.4$  Hz), para comprobar que efectivamente este espectro corresponde a este acoplamiento, se empleó la fórmula de predicción de patrones de acoplamiento espín-espín, al igual que se realizó con el de  $^{11}\text{B}$   $m_F = 2nI + 1$ , el número de espín ( $I$ ) del  $^{11}\text{B}$  es de  $3/2$  y el número átomos de flúor ( $n$ ) es de 2, por lo que:

$$m_F = 2nI + 1$$

$$m_F = 2(1) \left( \frac{3}{2} \right) + 1$$

$$m_F = 3 + 1$$

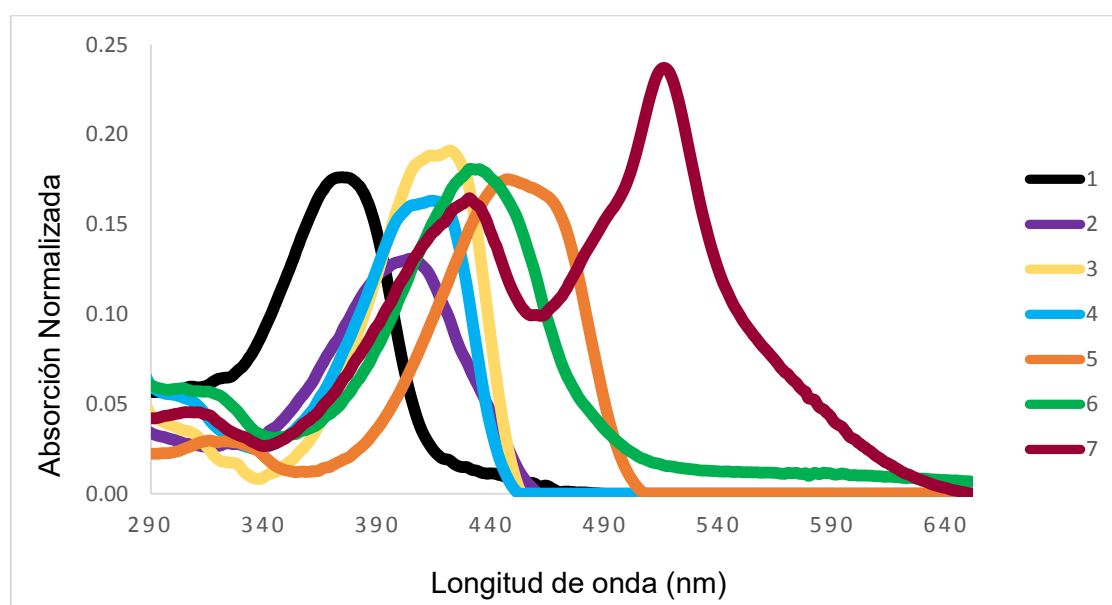
$$m_F = 4$$

Por lo tanto, se espera una señal cuádruple, misma que puede confirmarse en la Figura 37, con un desplazamiento que corresponde a lo descrito en la literatura para estos compuestos.<sup>80</sup>

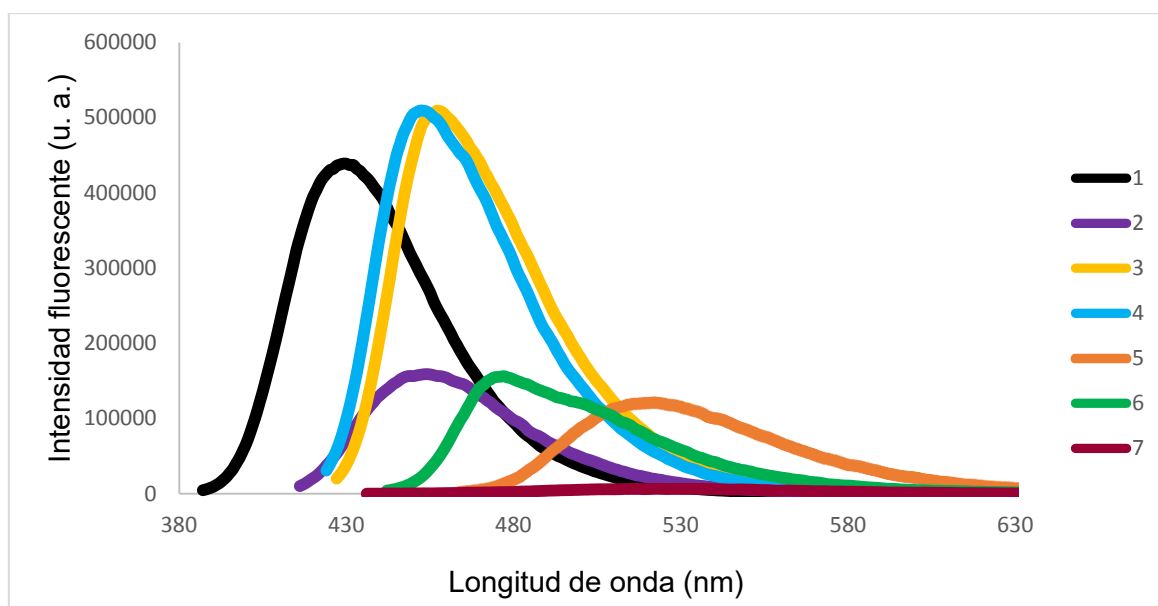
Una de las razones principales en obtener estos espectros de RMN de  $^{19}\text{F}$  y  $^{11}\text{B}$  es la confirmación del BODIPY en la estructura, del boro unido a dos átomos de flúor y que los átomos de flúor se encuentran unidos al boro.

### Espectroscopia de absorción de UV/Vis y de emisión fluorescente

Con la finalidad de estudiar las propiedades fotofísicas de los compuestos **1-7**, se obtuvieron los espectros de absorción UV/Vis y de emisión fluorescente en diclorometano a una concentración  $4 \times 10^{-6}$  M. En la Figura 38 se puede observar los espectros de absorción UV/Vis para cada uno de los compuestos y en la tabla 4 se presentan los valores de longitudes de máxima absorción debido a las transiciones electrónicas  $\pi-\pi^*$ , en el caso de la molécula **7**, se aprecia una banda de absorción máxima relativa a 433 nm correspondiente a las transiciones electrónicas  $\pi-\pi^*$  del núcleo de la cumarina y una banda de absorción máxima a 526 nm correspondiente a las transiciones electrónicas  $\pi-\pi^*$  del núcleo del BODIPY. En general se puede apreciar que existe un desplazamiento batocrómico en las longitudes de onda de máxima absorción conforme aumenta el grado de conjugación del sistema electrónico  $\pi$ . Por ejemplo, el compuesto **5** que tiene un enlace triple C-C de más con respecto al compuesto **1**, presenta un desplazamiento batocrómico mayor, es decir de 49 nm más. El compuesto **5** presenta un desplazamiento de 32 nm más con respecto al compuesto **4**, debido a la presencia del núcleo de tiofeno y al aldehído.



**Figura 38.** Espectros de absorción UV/Vis en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de los compuestos **1-7** a una concentración de  $4 \times 10^{-6}$  M.



**Figura 39.** Gráfica de fluorescencia en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de los compuestos 1-7 a una concentración de  $4 \times 10^{-6}$  M.

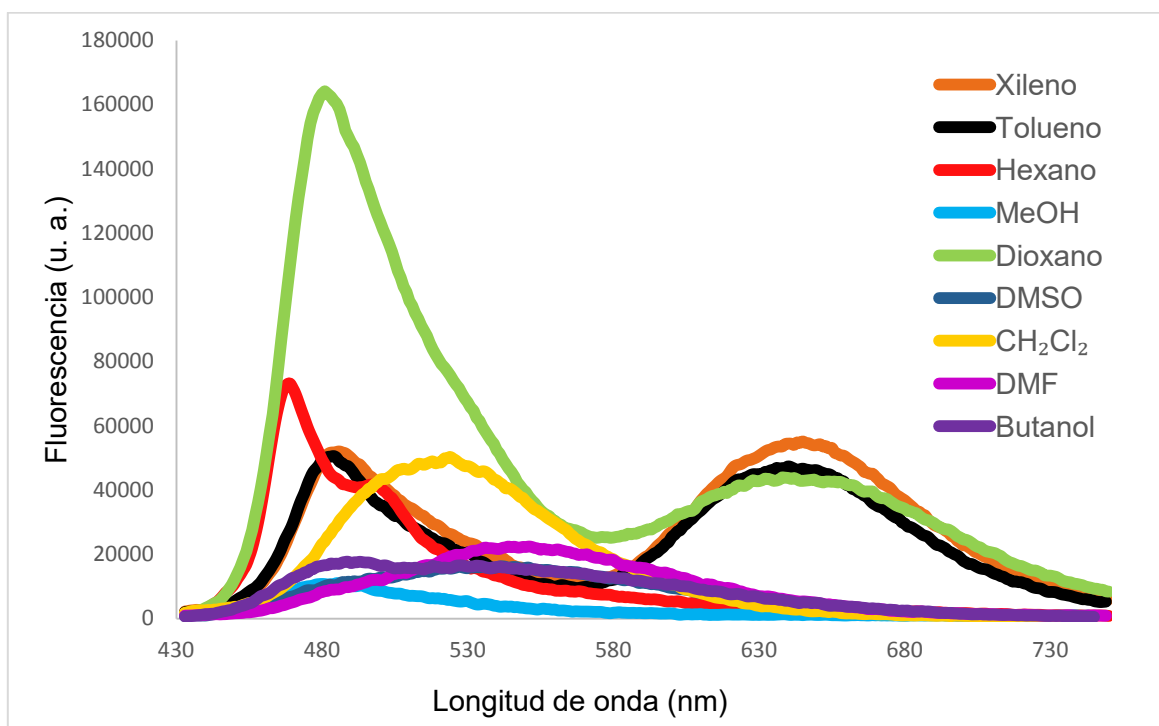
En la Figura 39 se muestran los espectros de emisión fluorescente para los compuestos 1-7 en diclorometano. En general, se puede observar que todos los compuestos presentan emisión fluorescente, siendo los compuestos 1, 2 y 4 los que presentan una mayor respuesta fluorescente. La molécula objetivo 7 presenta una baja respuesta fluorescente en diclorometano sin embargo es el que junto al compuesto 5 presentan el mayor desplazamiento batocrómico, esto debido a que en el estado de transición existe una transferencia de carga intramolecular más fuerte. En la tabla 3, se presentan los valores de las longitudes de onda de máxima emisión para cada uno de los compuestos, en general se aprecia un desplazamiento batocrómico del compuesto 1 al 7.

**Tabla 3.** Longitudes de máxima absorción y emisión para los compuestos 1-7.

Compuesto	$\lambda_{\text{máx}}(\text{abs})$ [nm]	$\lambda_{\text{máx}}(\text{emis})$ [nm]
1	373	429
2	405	452
3	422	457
4	416	452
5	448	522
6	432	477
7	516	523



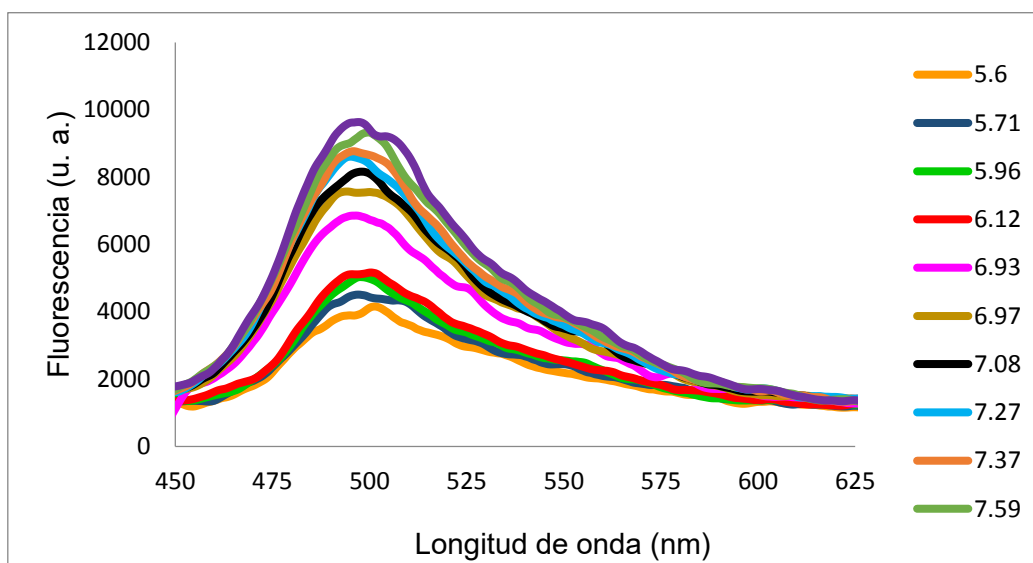
## Análisis solvatocrómico para el compuesto 7



**Figura 40.** Espectros de fluorescencia en diferentes disolventes orgánicos para el compuesto 7 a una concentración de  $4 \times 10^{-6}$  M.

Con la finalidad de estudiar la dependencia de la emisión fluorescente del compuesto 7 con respecto a la polaridad y polarizabilidad del disolvente se llevó a cabo un estudio solvatocrómico en 9 disolventes orgánicos de diferente polaridad, como se puede observar en la Figura 40, el compuesto presenta una mayor intensidad fluorescente en disolventes de mediana y baja polaridad tales como dioxano, xileno y tolueno; en estos disolventes se observan dos bandas de emisión, una banda en 478 nm y la otra en 635 nm, en el caso del dioxano es en donde se puede apreciar una mayor intensidad fluorescente esto tal vez debido a la formación de agregados moleculares.

## Análisis de emisión fluorescente para el compuesto 7 a diferente pH



**Figura 41.** Gráfica de fluorescencia del compuesto 7 a una concentración de  $4 \times 10^{-6}$  M a diferente pH.

En la Figura 41 se muestra la gráfica de emisión fluorescente del compuesto 7 a diferente pH en un intervalo de 5.6-7.79. En la gráfica se observa que conforme aumenta el pH aumenta la intensidad fluorescente, esto se debe a que a mayor pH existe una mayor fracción de moléculas no protonadas por medio del átomo del nitrógeno del dietilamino, lo que implica que en el estado excitado la transferencia de carga intramolecular es más fuerte debido a que existe una deslocalización electrónica en el sistema *push-pull*. El compuesto 7, se podría aplicar como sensor fluorescente dependiente del pH, ya que por más de medio siglo se han realizado investigaciones sobre la acidificación del microambiente en presencia de enfermedades celulares,<sup>81</sup> más específicamente en células cancerosas.<sup>82</sup> La mitocondria tiene un papel crítico en el metabolismo celular, bajo condiciones fisiológicas posee una matriz alcalina (pH ~8),<sup>83</sup> cuando existe una alteración mitocondrial, su pH básico se altera, es decir, se acidifica la mitocondria y conduce a células anormales que generan enfermedades. Actualmente se han empleado una variedad de procesos químicos para el estudio de la mitocondria como iones metálicos, ambiente redox, polaridad, viscosidad, pH y temperatura.<sup>84</sup> Una de las formas de monitorear el pH de las mitocondrias, es a través de la fluorescencia.<sup>83</sup> Dado que la fluorescencia del compuesto 7 es dependiente del pH, una vez internado en la célula podría actuar como un sensor fluorescente y darnos información del estatus de la mitocondria.

## VI. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar la molécula objetivo **7** derivada de BODIPY-Cumarina, junto con sus intermediarios **1-6**, con rendimientos de regulares a buenos.

Se caracterizaron los compuestos **1-7** por medio de técnicas espectrométricas tales como RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , IR, UV-Vis y espectrometría de masas.

El compuesto **7** presenta fluorescencia en diferentes disolventes y muestra una sensibilidad a la polaridad del mismo, donde posee una mayor fluorescencia en disolventes de mediana y baja polaridad. Es de igual manera sensible a la variación del pH (5.60-7.79), donde al incrementar el pH, la fluorescencia del compuesto **7** se ve favorecida, esta propiedad se puede aprovechar para probar dicho compuesto como sensor fluorescente dependiente del pH en células.

## VII. ANEXO

### Espectros de IR para los compuestos 5-7

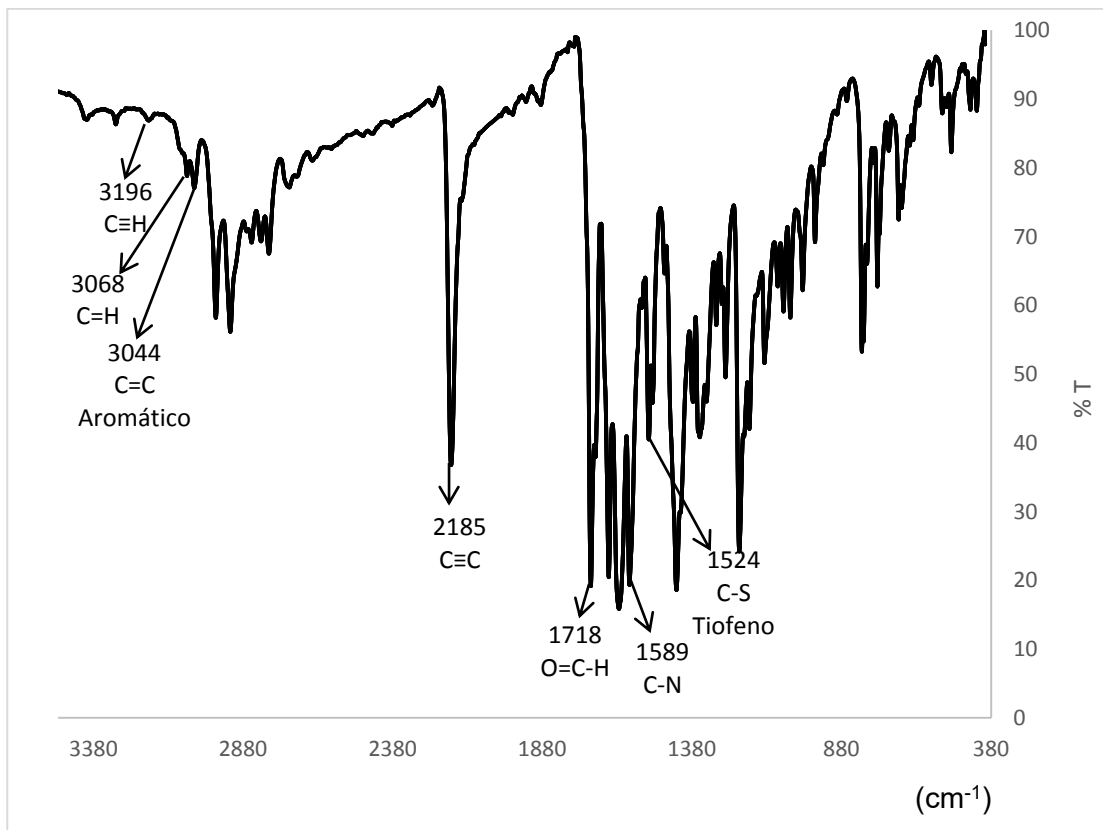


Figura 42. Gráfica de IR para el compuesto 5 en  $\text{CHCl}_3$ .

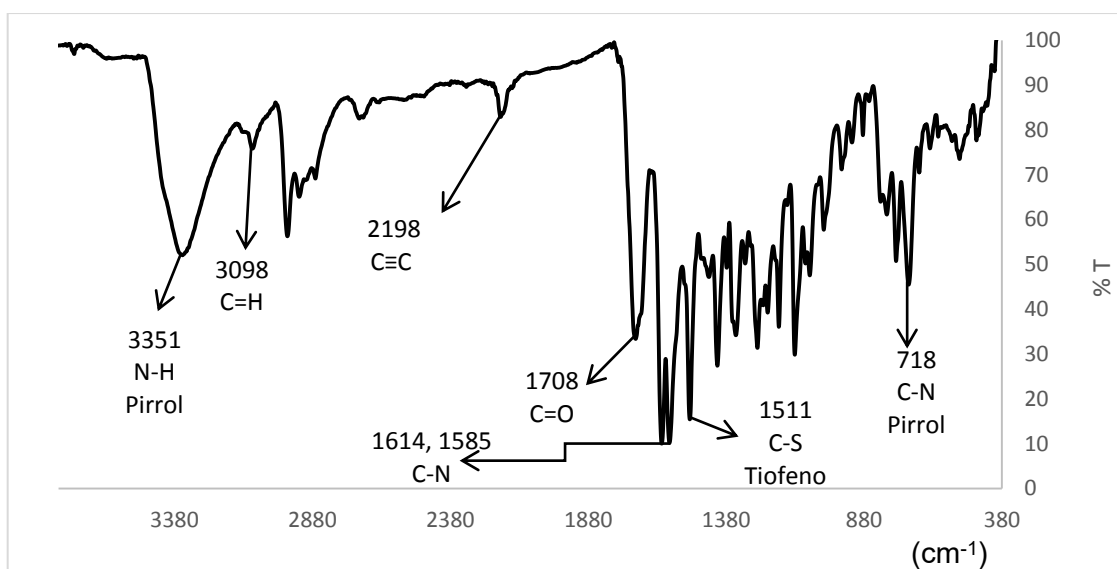


Figura 43. Gráfica de IR para el compuesto 6 en  $\text{CHCl}_3$ .

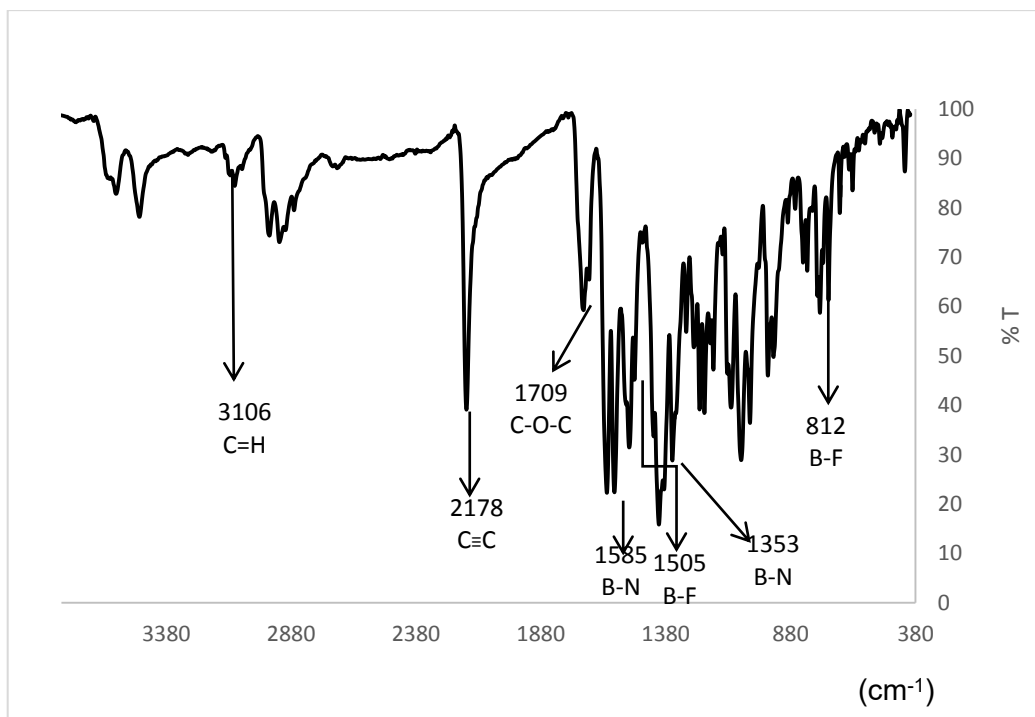


Figura 44. Gráfica de IR para compuesto 7 en  $\text{CHCl}_3$ .

Espectros de masas para los compuestos 5-7

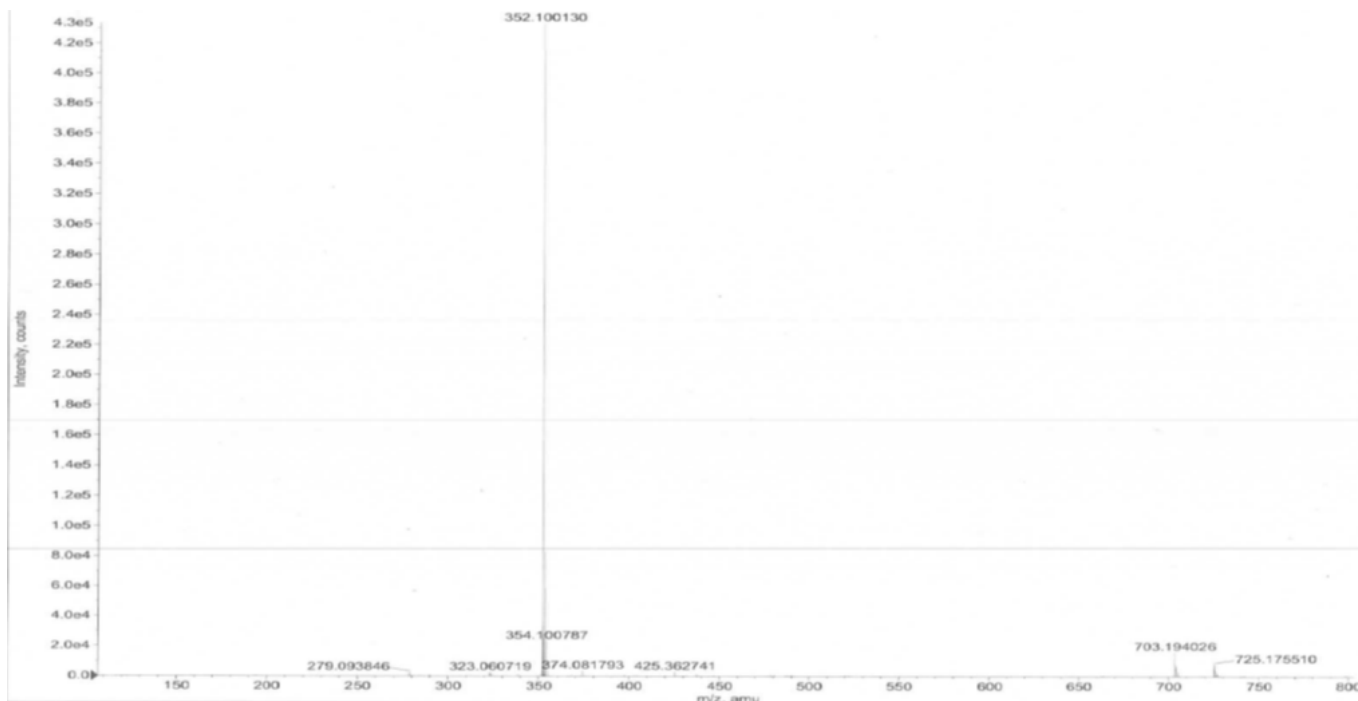


Figura 45. Espectro de Masas del compuesto 5.

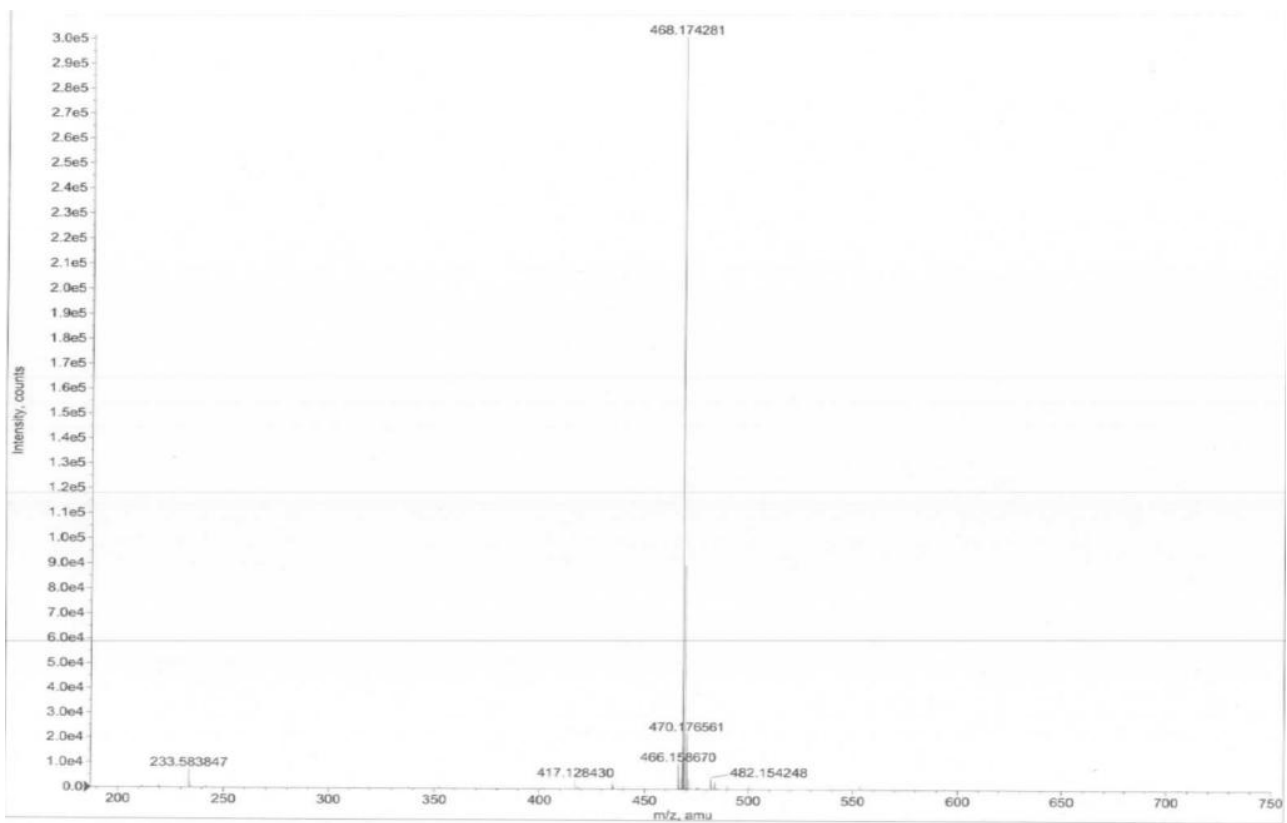


Figura 46. Espectro de Masas del compuesto 6.

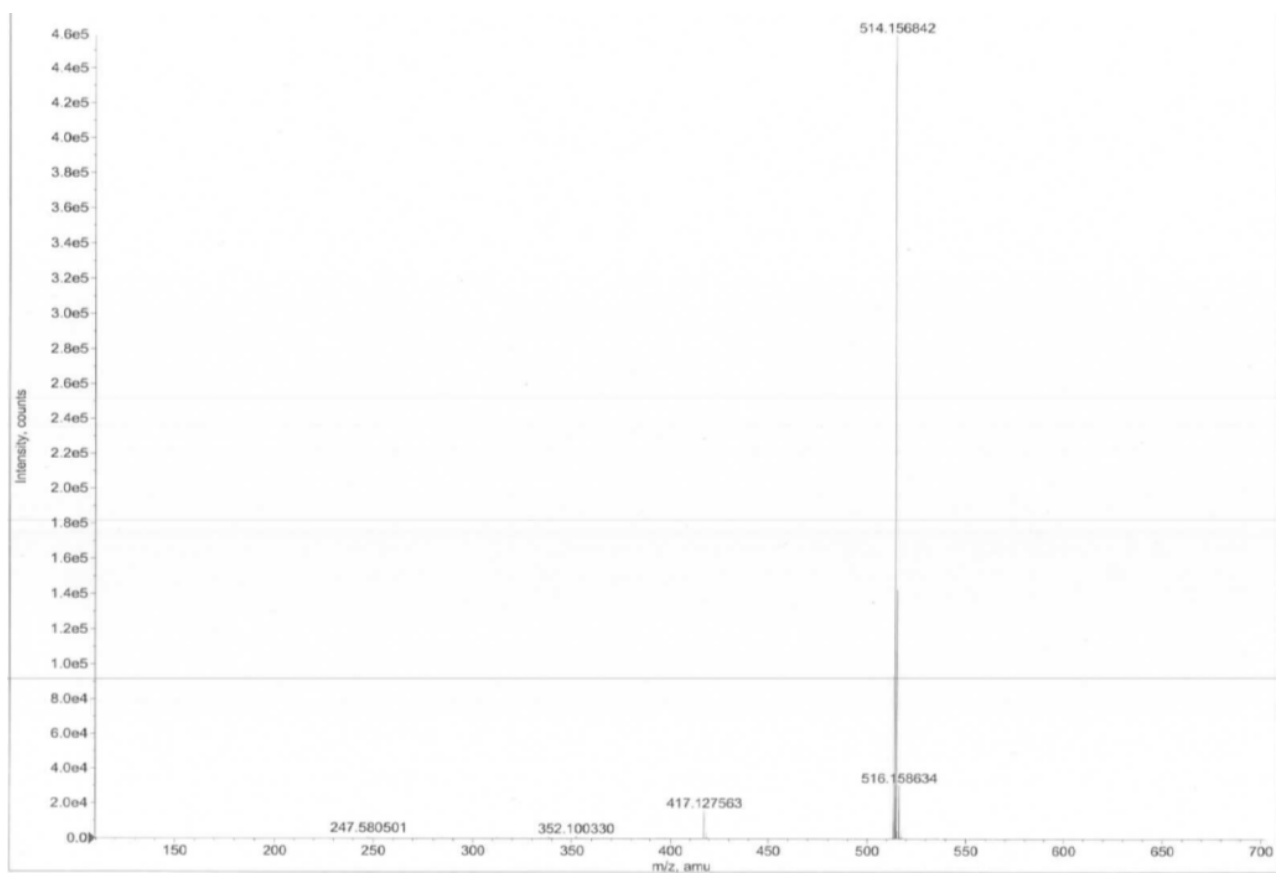


Figura 47. Espectro de Masas del compuesto 7.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. H. Beens, A. Weller; Excited molecular *n*-complexes in solution in *Organic Molecular Photophysics*. Edited by: Birks J. W. Wiley, New York; 1975.
2. Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig; *Chem. Rev.* 2003, **103**, 3899-4031.
3. W. Rettig; *J. Mol. Struct.* 1982, **84**, 303-327.
4. B. D. Allen, A. C. Benniston, A. Harriman, S. A. Rostron, C. Yu; *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005, **7**, 3035-3040.
5. M. K. Kuimova; *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012, **14**, 12671–12686.
6. J. Harkness; *J. Biorheol.* 1971, **8**, 171-93.
7. R. L. Letcher, S. Chien, T. G. Pickering, J. E. Sealey, J. H. Laragh; *Am. J. Med.* 1981, **70**, 1195-1202.
8. P. F. Roe, J. Harkness; *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 1975, **17**, 168-172.
9. E. Ernst, A. Matria, C. Schmözl, I. Magyarosy; *Br. J Haematol.* 1987, **65**, 485-487.
10. M. A. Haidekker, E.A. Theodorakis; *J. Biol. Eng.* 2010, **4**, 1-14.
11. G. Ferri, L. Nucara, T. Biver, A. Battisti, G. Signore, R. Bizzarri; *Biophys. Chem.* 2016, **208**, 17–25.
12. S. E. Braslavsky; *Pure Appl. Chem.* 2007, **79**, 293-465.
13. B. Valeur, M. N. Santos; *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2, 2012, 2<sup>nd</sup> Edition.
14. W. E. Safford, "Lignum nephriticum". Annual Report of the Board of Regents of the Smithsonian Institution, 1916, 271-298.
15. A. U. Acuña, F. Amat, P. Morcillo, M. Liras, B. Rodríguez; *Org. Lett.* 2009, **11**, 3020- 3023.
16. F. Perrin; *Ann. Phys.* 1229, **12**, 169–275.
17. [http://ayudahispano-3000.blogspot.mx/2015/10/fisicoquimica\\_34.html](http://ayudahispano-3000.blogspot.mx/2015/10/fisicoquimica_34.html).

18. B. Valeur, J. C. Brochon; *New Trends in Fluorescence Spectroscopy. Applications to Chemical and Life Sciences*, 2001, 7–33.
19. J. Perrin; *Trans. Faraday Soc.* 1992, **17**, 546–572.
20. A. Z. Jablonski; *Phys.* 1935, **94**, 38 – 46.
21. <http://www.ub.edu/talq/es/node/259>.
22. F. Weigert; *Verh. dD. Phys. Ges.* 1920, **1**, 100–102.
23. I. Johnson, M. Spence; *Molecular Probes Handbook, Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives*, 11<sup>th</sup> Edition, 57, 2010.
24. B. Valeur, M. N. Barberan-Santos; *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2<sup>nd</sup> Edition, 88-89, 380, 2012.
25. B. Valeur, M. N. Barberan-Santos; *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Second Edition, 132, 2012.
26. C. En Kung, K. Jutta Reed; *Am. Chem. Soc.* 1989, **28**, 6678-6686.
27. G. Weber, F. J. Farris; *Am. Chem. Soc.* 1979, **18**, 3075-3078.
28. W. Retting, R. Lapouyade; *Fluorescence Probes Based on Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) States and Other Adiabatic Photoreactions*, No. 348, 118-119, 1994.
29. B. Valeur, M. N. Barberan-Santos; *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2<sup>nd</sup> Edition, 385, 2012.
30. <https://pixabay.com/es/c%C3%A9lulas-hela-cultivadas-544312/>
31. X. Cao, W. Lin, Q. Yu, J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 6098-6101.
32. (a) G. Signore, R. Nifosi, L. Albertazzi, B. Storti, R. Bizzarri; *J. Am. Chem. Soc.* 2010, **132**, 1276–1288. (b) J. Wang, X. Qian, J. Cui; *J. Org. Chem.* 2006, **71**, 4308–4311.
33. J. R. Lakowicz; *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 4: Probe Design and Chemical Sensing*; Kluwer Academic Publishers: New York, 2002, 109-117.
34. K. Zheng, H. Chen, S. Fang, Y. Wang; *Sens. Actuators, B*, 2016, **223**, 193-198.



35. D. Su, C. L. Teoh, N. Gao, Q. Xu, Y. Chang; *ACS Sensors*. 2016, **16**, 1397, 1-9.
36. O. Nadiv, M. Shinitzky, H. Manu, D. Hecht, C. T. Roberts, D. Leroith, Y. Zick; *Biochem. J.* 1994, **298**, 443-450.
37. M. E. Nipper, S. Majd, M. Mayer, C. James. M. Lee, E. A. Theodorakis, M. A. Haidekker; *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1778**(4), 1148-1153.
38. M. Shinitzky; *Membrane Fluidity*; Ed Springer, Vol. 12, 1984, 1-51.
39. Z. Yang, Y. He, J. Lee; *J. Am. Chem. Soc.* 2013, **135**, 9181-9185.
40. H. Zhu, J. Fan, M. Li, J. Cao, Dr. J. Wang, X. Peng; *Chem. Eur. J.* 2014, **20**, 4691-4696.
41. (a) G. Deliconstantinos, V. Villiotou, J. C. Staverides; *Biochem. Pharmacol.* 1995, **49**(11), 1589-600; (b) S. J. Singer, G. L. Nicolson; *Science*, 1972, 720-731.
42. (a) H. R. Petty; *Microsc. Res. Tech.* 2007, **70**, 687-709; (b) K. Simons, D. Toomre; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000, **1**, 31; (c) S. Munro; *Cell* 2003, **115**, 377; (d) R. G. W. Anderson, K. Jacobson; *Science*, 2002, **296**, 1821.
43. H. Yoshida; *FEBS J.* 2007, **274**, 630-658.
44. (a) M. A. Haidekker, T. Ling, M. Anglo, H. Y. Stevens, J. A. Frangos, E. A. Theodorakis; *Chem. Biol.* 2001, **8**, 123-131. (b) M. A. H. Dekker, T. Brady, K. Wen, C. Okada, H. Y. Stevens, J. M. Snell, J. A. Frangos, E. A. Theodoraki; *Bioorg. Med. Chem.* 2002, **10**, 3627-3636. (c) F. Zhou, J. Shao, Y. Yang, J. Zhao, H. Guo, X. Li, S. Ji, Z. Zhang; *Eur. J. Org. Chem.* 2011, **25**, 4773-4787.
45. (a) M. K. Kuimova, S. W. Botchway, A. W. Parker, M. Balaz, H. A. Collins, H. L. Anderson, K. Suhling, P. R. Ogilby; *Nat. Chem.* 2009, **1**, 69-73. (b) D. Fischer, E. A. Theodorakis, M. A. Haidekker; *Nat. Protoc.* 2007, **2**, 227-236. (c) F. Liu, T. Wu, J. Cao, S. Cui, Z. Yang, X. Qiang, S. Sun, F. Song, J. Fan, J. Wang, X. Peng; *Chem. Eur. J.*, 2013, **19**, 1548-1553.
46. I. López-Duarte, T. Truc Vu, M. A. Izquierdo, J. A. Bull, M. K. Kuimova; *Chem. Commun.* 2014, **50**, 5282-5284.
47. Z. Yang, Y. He, J. H. Lee, W. Chae, W. X. Ren, J. H. Lee, C. Kang, J. S. Kim; *Chem. Commun.* 2014, **50**, 11672-11675.

48. H. M. Kim, B. H. Jeong, J. Y. Hyon, M. J. An, M. S. Seo, J. H. Hong, K. J. Lee, C. H. Kim, T. Joo, S. C. Hong, B. R. Cho; *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 4246-4257.
49. A. K. Dutta, K. Kamada; *J. Photochem. Photobiol. A; Chemistry* 1996, **93**, 57-64.
50. J. J. Chen, B. P. Yu; *Free Radical Biol. Med.* 1994, **17**, 411-418.
51. A. Colell, C. García-Ruiz, J. M. Lluís, O. Coll, M. Mari, J. C. Fernández-Checa; *J. Biol. Chem.* 2003, **278**, 33928-33935.
52. D. Tortorella, C. M. Story, J. B. Huppa, E. J. Wiertz, T. R. Jones, I. Bacik, J. R. Bennink, J. W. Yewdell, H. L. Ploegh; *J. Cell Biol.* 1998, **142**, 365-376.
53. J. S. Goodwin, K. R. Drake, C. L. Remmert, A. K. Kenworthy; *Biophys. J.* 2005, **89**, 1398-1410.
54. D. B. Goldstein; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1984, **24**, 43-64.
55. K. T. Pfaffenbach, C. L. Gentile, A. M. Nivala, D. Wang, Y. Wei, M. Pagliassotti, *J. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2010, **298**, E1027-E1035.
56. Y. Wei, D. Wang, C. L. Gentile, M. J. Pagliassotti; *Mol. Cell. Biochem.* 2009, **331**, 31-40.
57. S. Mukherjee, H. Raghuraman, A. Chattopadhyay; *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2007, **1768**, 59-66.
58. G. Diaz, M. Melis, B. Batetta, F. Angius, A. M. Falchi; *Micron* 2008, **39**, 819-824.
59. L. Yuan, W. Lin, Y. Xie, B. Chen, S. Zhu; *J. Am. Chem. Soc.* 2012, **134**, 1305-1315.
60. H. Lee, Z. Yang, Y. Wi, T. W. Kim, P. Verwilst, Y. H. Lee, G. Han, C. Kang, J. S. Kim; *Bioconjugate Chem.* 2015, **26**, 2474-2480.
61. A. Loudet, K. Burgess; *Chem. Rev.* 2007, **107**, 4891-4932.
62. H. B. F. Dixon, A. C. Bowden, C. Liebecq, K. L. Loening, G. P. Moss, J. Reedijk, S. F. Velick, P. Venetianer, J. F. G. Vliegthart, J. Reedijk, S. F. Velick, P. Venetianer, J. F. G. Vliegthart; *Pure Appl. Chem.* 1987, **59**, 779.
63. A. Treibs, F. H. Kreuzer, A. Liebigs; *J. Chem.* 1968, **718**, 208-223.

64. M. E. Pérez-Ojeda Rodríguez; Tesis doctoral, Desarrollo de nuevos nanomateriales híbridos con aplicaciones biofotónicas, Madrid, 2014.
65. M. Matsui, K. Funabiki, K. Nakaya; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2005, **78**, 464-467.
66. M. Shah, K. Thangaraj, M. L. Soong, L. T. Wolford, J. H. Boyer, I. R. Politzer, T. G. Pavlopoulos; *Heteroat. Chem. Commun.* 1999, 1889–1890.
67. J. H. Boyer, A. M. Haag, G. Sathyamoorthi, M. L. Soong, K. Thangaraj, T. G. Pavlopoulos; *Heteroat. Chem. Com.* 1993, **4**, 39-49.
68. R. W. Wagner, J. S. Lindsey; *Pure Appl. Chem.* 1996, **68**, 1373-1380.
69. T. G. Pavlopoulos; *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **1999**, 3613, 112.
70. R. D. Rieth, N. P. Mankad, E. Calimano, J. P. Sadighi; *Org. Lett.* 2004, **6**, 3981-3983.
71. W. Dehaen; Synthesis and application of reactive BODIPY dyes, Doctoral Thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica, 2010.
72. G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, **47**, 1184-1201.
73. G. Duran, E. Palao, A. R. Agarrabeitia, S. Moya, N. Boensb, M. J. Ortiz; *R. Soc. Chem.* 2014, **4**, 19210–19213.
74. T. Eicher, S. Hauptmann, *The Chemistry of Heterocycles*, 2<sup>nd</sup> Edition, Edit. WILWY-VCH 2003, 247.
75. a) R. D. H. Murray, J. Mendez, S. A. Brown; *The Natural Coumarins*, Wiley, New York 1982; b) R. D. H. Murray, *Nat. Prod. Reports* 1989, 591-592.
76. T. Sugino, K. Takana; *Chem. Lett.* **2001**, 110-111.
77. T. Eicher, H. J. Roth; *Synthese, Gewinnung und Charakterisierung von Arzneistoffen*, New York, 1986, 300-302.
78. B. M. Trost, F. D. Toste, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**, 6305-6306.
79. D. Barton, W. D. Ollis, *Comprehensive Organic Chemistry*, Vol. 4., p 629, Pergamon, Oxford **1979**.
80. M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh; *Métodos espectroscópicos en Química Orgánica*, 2<sup>nd</sup> Edición, Ed. Síntesis, España, 2005, p. 226.

81. Y. Kato, S. Ozawa, C. Miyamoto, Y. Maehata, A. Suzuki, T. Maeda, Y. Baba; *Cancer Cell Int.* 2013, **13**, 2-8.
82. M. H. Lee, N. Park, C. Yi, J. H. Han, J. H. Hong, K. P. Kim, D. H. Kang, J. L. Sessler, C. Kang, J. S. Kim; *J. Am. Chem. Soc.* 2014, **136**, 14136–14142.
83. X. Song, N. Li, C. Wang, Y. Xiao; *J. Mater. Chem. B.* 2017, **5**, 360-368.
84. J. R. Griffiths; *Br. J. Cancer* 1991, **64**, 425-427.