



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE
DERIVADOS DE CUMARINA COMO SONDAS FLUORESCENTES DE
MICROVISCOSIDAD.**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Javier Ordóñez Hernández

TUTOR: Dr. José Norberto Farfán García; Facultad de Química, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Alejandro Cordero Vargas; Instituto de Química, UNAM
Dra. María del Carmen Virginia Ortega Alfaro; Instituto de Ciencias Nucleares,
UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2018



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 esta 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.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 225 del Departamento de Química Orgánica, Posgrado de la Facultad de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. José Norberto Farfán García, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de becario 271117, así como al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP-5000-9056) y a el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-IN216616).

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas sus bendiciones.

Al Dr. José Norberto Farfán, por permitirme formar parte de su grupo de investigación desde la licenciatura y por todo su apoyo.

Al CONACyT por la beca 211117 para realizar mis estudios de doctorado.

Al PAPIIT-IN216616 y al PAIP-5000-9056.

Al Dr. Héctor García Ortega por su amistad y por compartirme un espacio dentro de su laboratorio.

A los miembros de mi comité tutelar: Dr. Alejandro Cordero Vargas y Dra. María del Carmen Virginia Ortega Alfaro por cada una de sus valiosas aportaciones al proyecto.

A los miembros del jurado: Dra. María del Pilar Carreón Castro, Dra. Patricia Guadarrama Acosta, Dr. José Gustavo Ávila Zárraga, Dr. Alejandro Cordero Vargas, Dr. Alejandro Dorazco González, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y por sus valiosas aportaciones.

Con cariño para la M. en C. Margarita Romero Ávila por su apoyo con los experimentos de RMN.

A mi querida Daniela Fregoso por su amistad, por todo su amor y todo su cariño.

A la Dra. Elba Xochitiotzi por su amistad y por todos sus sabios consejos, y porque la culpa fue suya al haber dicho que sí.

A la Dra. Cristina Jiménez Curiel por su amistad sincera y por siempre darme ánimos.

A cada una de las personas que colaboraron con el proyecto, al Dr. Arturo Jiménez Sánchez, Dra. Rosa Santillán y M. en C. Óscar González Antonio.

A mis padres (Felipe y Lupita) y hermanos (Felipe y Lupita) por su amor incondicional que siempre me han mostrado.

A mis primos Sonia y José Luis, y a mis sobrinas Jocelyn, Betsabé y Janaí por todo su apoyo a largo de esta etapa.

A Daniela Torres, Ángela Hernández y Eduardo Méndez, por ser mis amigos desde la licenciatura.

A mis estudiantes René Campos, Ilse Colorado, Elizabeth Munguía, Alexis Valencia, Joselin Guerrero, Álvaro Valdés, Luis Vázquez por su contribución en los diferentes proyectos de investigación.

A Alejandro Enríquez, Blas Flores, Carlos Jiménez, Elba Xochitiotzi, Magdalena Vázquez, Oscar González, por la convivencia de jueves por la noche.

A mis compañeros del laboratorio 201 y 225.

A Josefina Tenopala por todo su apoyo.

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

LIA Meeting CIO; Chemical Materials for their use on OPVs and NLO, en la modalidad de
CARTEL

Centro de Investigaciones en Óptica AC
Con el trabajo: Improving Local Microviscosity Sensitivity in Dual-Fluorescent Molecular
Rotors.

22 y 23 de junio de 2017, León, Guanajuato, México.

PUBLICACIONES

J. Ordóñez-Hernández, A. Jiménez-Sánchez, H. García-Ortega, N. Sánchez-Puig, M. Flores-Álamo, R. Santillan, N. Farfán, A series of dual-responsive Coumarin-Bodipy probes for local microviscosity monitoring, *Dyes Pigm.*, 157 (2018) 305-313.

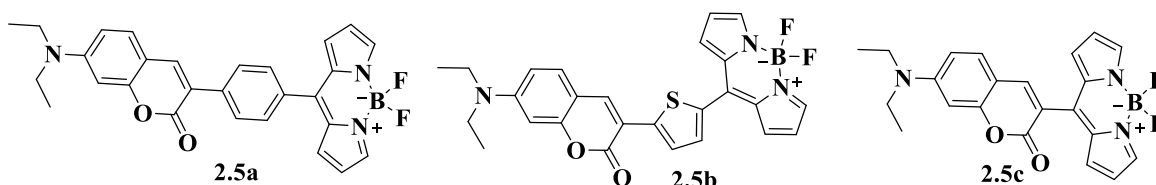
CONTENIDO

RESUMEN.....	1
CAPÍTULO 1	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1. Generalidades de las cumarinas y propiedades fotofísicas.....	3
1.2. Algunos conceptos fotofísicos.	4
1.2.1. Luminiscencia	4
1.2.2. Fluorescencia.....	5
1.2.3. Transiciones radiativas y no radiativas entre estados electrónicos.....	6
1.2.4. Procesos de des-excitación de moléculas fluorescentes.....	8
1.2.5. Sondas fluorescentes, indicadores, etiquetas y trazadores.	9
1.3. Evaluación de los parámetros físicos locales por medio de sondas fluorescentes.	13
1.3.1. Estimación de “microviscosidad”, fluidez y movilidad molecular.	13
1.3.2. Uso de rotores moleculares.	15
1.4. Sondas fluorescentes de microviscosidad celular.	15
1.4.1. Sondas basadas en intensidad fluorescente.	15
1.4.2. Sondas fluorescentes basadas en imágenes fluorescentes ratiométricas y de tiempo de vida.....	21
1.5. Detección química mediante fluorescencia.....	30
1.6. Referencias.....	31
CAPÍTULO 2	37
DERIVADOS DE CUMARINA-BODIPY UTILIZADOS COMO SONDAS FLUORESCENTES DE MICROVISCOSIDAD.	37
2.1. Introducción	37
2.2. Objetivos	38
2.3. Resultados y discusión.	39
2.3.1. Síntesis	39
2.3.2. Caracterización mediante espectroscopía de RMN de los compuestos 2.5a-2.5c.....	41
2.3.3. Estudio por difracción de Rayos X.....	47
2.3.4. Índice de extensión espacial en excitaciones de transferencia de carga.....	50
2.3.5. Análisis solvatocrómico.	51
2.3.6. Análisis logarítmico de Förster-Hoffmann.....	54

2.3.7. Respuesta fluorescente a valores de baja viscosidad.....	55
2.3.8. Anisotropía fluorescente.	56
2.3.9. Análisis de los orbitales naturales de transición (NTO).....	57
2.3.10. Microscopía confocal fluorescente.....	58
2.4. Conclusiones	60
2.5. Referencias.....	60
CAPÍTULO 3	63
DERIVADOS DE CUMARINA-BODIPY CON ENLACE TRIPLE C-C COMO GRUPO ESPACIADOR.....	63
3.1. Introducción	63
3.2. Objetivos	63
3.3. Resultados y análisis.	64
3.3.1. Síntesis	64
3.3.2. Caracterización mediante espectroscopía de RMN de los compuestos 3.7a y 3.7b.	66
3.3.3. Análisis solvatocrómico.	70
3.3.4. Dependencia de la fluorescencia hacia los cambios de viscosidad.	72
3.3.5. Optimización de geometría y estudios NTO.	73
3.3.6. Espectros de absorción en estado sólido.	76
3.4. Conclusiones	77
CAPÍTULO 4	79
PARTE EXPERIMENTAL.....	79
4.1. Reactivos e instrumentación.....	79
4.2. Síntesis y caracterización.	80
4.3. Referencias.....	93
CAPÍTULO 5	94
ANEXOS.....	94
5.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).	94
5.2. Propiedades fotofísicas.....	113
5.3. Espectros de absorción y de fluorescencia a diferentes valores de viscosidad.	116
5.4. Publicación.....	119

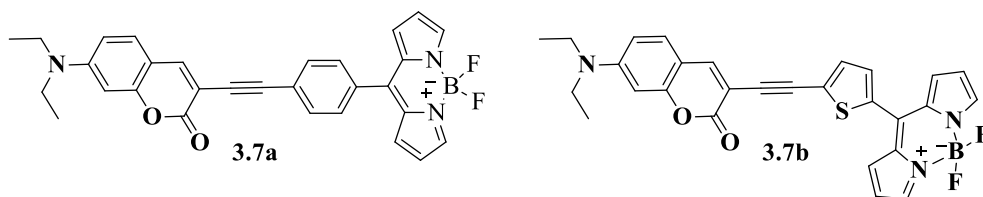
RESUMEN

El monitoreo local de la microviscosidad en las células vivas es una herramienta poderosa para determinar su estado de salud en un organelo específico o en el citosol. En la primera parte de esta tesis (Capítulo 2) se presenta el diseño racional de una familia de sondas duales de microviscosidad autocalibrables como una estrategia para mejorar la respuesta de la sonda en intervalos de baja viscosidad. La familia de sondas con dos bandas de emisión contiene dos fluoróforos correspondientes a los núcleos de cumarina y de bodipy y diferentes rotores moleculares unidos a los fluoróforos: fenileno (**2.5a**), tiofenileno (**2.5b**) y sin espaciador (**2.5c**). La arquitectura de las sondas corresponde a un sistema tipo *push-pull* en donde el núcleo del bodipy funciona como grupo electroattractor, mientras que el núcleo de la cumarina como núcleo electrodonador. Se encontró que una de las sondas (**2.5c**) es útil para determinar las variaciones de baja viscosidad en las células vivas donde la rigidez sutil del grupo rotor en la sonda puede aumentar su sensibilidad a la viscosidad. El análisis de difracción por rayos X, las mediciones de anisotropía fluorescente y los cálculos químicos cuánticos de la excitación electrónica por medio de un análisis orbital natural de transición (NTO) confirmaron la respuesta observada.



En la segunda parte del trabajo (Capítulo 3) se presenta la síntesis y caracterización de los compuestos **3.7a** y **3.7b** cuyas estructuras son parecidas a los compuestos **2.5a** y **2.5b**, con la variante de que se insertó un enlace triple C-C como un segundo grupo espaciador entre el núcleo de la cumarina y del fenileno (**3.7a**) y entre el núcleo de la cumarina y del tiofenileno (**3.7b**). Con este tipo de arquitectura se estudió la influencia del segundo espaciador sobre las propiedades fotofísicas de dichos compuestos tanto en disolución como en estado sólido, para ello se hizo un análisis solvatocrómico en 9 disolventes de

diferente polaridad, observando que los compuestos muestran una ligera respuesta hacia la polaridad, esta respuesta se comprobó mediante cálculos NTO. Se probó la sensibilidad de estos fluoróforos hacia la viscosidad en diferentes mezclas metanol: glicerol, sin embargo, no se obtuvo respuesta. Por último, se estudiaron las propiedades de absorción en estado sólido de **3.7a** y **3.7b**, en donde las bandas de absorción cercanas al IR y los valores de la brecha HOMO-LUMO indican que estos compuestos podrían tener aplicaciones optoelectrónicas por ejemplo en celdas solares orgánicas o como semiconductores.



CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1. Generalidades de las cumarinas y propiedades fotofísicas.

La 2*H*-cromen-2-ona y sus derivados, comúnmente llamadas cumarinas, pertenecen a una familia de compuestos naturales y sintéticos que exhiben una amplia variedad de actividades biológicas tales como antimicrobianos¹, antidepresivos², antioxidantes³, antiinflamatorios⁴, antinociceptivos⁵, antitumorales⁶ y antivirales.⁷

Esta familia de compuestos heterocíclicos también presenta interesantes propiedades fotofísicas tales como altos rendimientos cuánticos fluorescentes, largos desplazamientos de Stokes y amplios perfiles de absorción/emisión que se pueden modular del azul al infrarrojo cercano por sustitución con grupos electrodonadores y electroattractores sobre el núcleo de cumarina.⁸

Las propiedades fotofísicas de las cumarinas son dependientes de la capacidad electrodonadora y electroattractora de los sustituyentes unidos al núcleo. Recientemente, Branco y colaboradores encontraron un incremento en los desplazamientos de Stokes y en los coeficientes de extinción al extender el sistema π sobre la posición C-3.⁹ La combinación de un grupo electrodonador en la posición 7 y un grupo electroattractor en la posición 3 corresponde a un sistema *push-pull*, y da como resultado que el derivado de cumarina tenga bandas de absorción en la región visible debido a la transferencia de carga fotoinducida efectiva. Por ejemplo, las bandas de absorción de los derivados de cumarina pueden variar de 350 a 500 nm con sus bandas de emisión en el intervalo de 450-600 nm.

Las aminocumarinas, hidroxycumarinas y formilcumarinas se han usado comúnmente en el diseño y la síntesis de cumarinas funcionalizadas. Las aminocumarinas y las hidroxycumarinas son altamente fluorescentes y se utilizan como brillantadores ópticos,

tintes láser, sensores eficientes catión/anión¹⁰, sondas de fosgeno¹¹ y como sondas fluorescentes de viscosidad, polaridad, pH, etc.¹²⁻¹³, (en la sección 1.4 se aborda a detalle el tema de sondas fluorescentes de viscosidad, mostrando ejemplos de sondas fluorescentes de viscosidad basadas en el núcleo de cumarina).

También se han descrito cumarinas con un sistema *push-pull* que producen autoensamble por apilamiento π en el estado sólido, en donde sus características electrónicas pueden ser moduladas¹⁴ si se estudia qué tipo de interacciones no covalentes son claves para el funcionamiento de los materiales electrónicos orgánicos en forma cristalina.¹⁵

1.2. Algunos conceptos fotofísicos.

A continuación, se describen algunas propiedades fotofísicas que pueden llegar a presentar los compuestos fluorescentes.

1.2.1. Luminiscencia

La palabra luminiscencia, que viene del latín (lumen = luz), se define como: la emisión espontánea de radiación de especies excitadas electrónicamente o vibracionalmente que no se encuentran en equilibrio térmico con su ambiente. Existen varios tipos de luminiscencia que se clasifican de acuerdo con el modo de excitación (Tabla 1.1).¹⁶

Tabla 1.1. Diferentes tipos de luminiscencia.

Fenómeno	Modo de excitación
Fotoluminiscencia (fluorescencia, fosforescencia, fluorescencia retardada)	Absorción de luz (fotones)
Radioluminiscencia	Radiación ionizante (rayos-X, α , β , γ)
Catodoluminiscencia	Rayos catódicos (haz de electrones)
Electroluminiscencia	Campo eléctrico
Termoluminiscencia	Calentamiento después del almacenamiento previo de energía (por ejemplo, irradiación radioactiva)
Quimioluminiscencia	Reacción química (por ejemplo, oxidación)
Bioluminiscencia	<i>In vivo</i> reacción bioquímica
Triboluminiscencia	Fuerzas de fricción y electrostáticas
Sonoluminiscencia	Ultrasonido

Los compuestos luminiscentes pueden ser de varios tipos:

- Compuestos orgánicos: Hidrocarburos aromáticos (naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno, perileno, porfirinas, ftalocianinas, etc.) y sus derivados, colorantes (fluoresceína, rodaminas, cumarinas, oxazinas), polienos, difenilpolienos, algunos aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina), etc.
- Compuestos inorgánicos. Ion uranilo (UO_2^+), iones lantánidos (por ejemplo, Eu^{3+} , Tb^{3+}), vidrios dopados (por ejemplo, con Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag), cristales (ZnS , CdS , ZnSe , CdSe , GaS , GaP , $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Cr}_3^+$ (rubí)), nanocristales semiconductores (por ejemplo, CdSe), cúmulos metálicos, nanotubos de carbono y algunos fullerenos, etc.
- Compuestos organometálicos: Complejos metálicos de porfirina, complejos de rutenio (por ejemplo, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$), complejos de cobre, complejos con iones lantánidos, complejos con agentes quelatantes fluorogénicos (por ejemplo 8-hidroxiquinolina), etc.

1.2.2. Fluorescencia

La fluorescencia se define como la emisión de fotones que acompaña a la relajación $S_1 \rightarrow S_0$ con retención de la multiplicidad del espín (en el caso de moléculas orgánicas), la emisión fluorescente ocurre desde S_1 , y por lo tanto sus características (excepto polarización) no dependen de la longitud de onda de excitación.

La transición 0-0 es usualmente la misma para la absorción y para la fluorescencia. Sin embargo, el espectro de fluorescencia se encuentra a longitudes de onda más altas (energía más baja) que el espectro de absorción porque se pierde energía en el estado excitado debido a la relajación vibracional. De acuerdo con la regla de Stokes, la longitud de onda de emisión fluorescente debe siempre ser más alta que la de absorción. Sin embargo, en muchos casos, el espectro de absorción parcialmente traslapa el espectro de fluorescencia, es decir, una fracción de luz es emitida a longitudes de onda más cortas que la luz observada. Tal observación parece estar, a primera vista, en contradicción con el principio de conservación de la energía. Sin embargo, tal “defecto de energía” es compensado por el

hecho que, a temperatura ambiente, una pequeña fracción de moléculas están en un estado vibracional más alto que el nivel 0 (distribución entre los niveles de energía que cumple la ley de Boltzmann) en el estado basal, así como en el estado excitado. A una baja temperatura, esta desviación de la ley de Stokes debería de desaparecer.

En general, las diferencias entre los niveles vibracionales son similares en los estados basal y excitado, así que el espectro de fluorescencia comúnmente se asemeja a la primera banda de absorción (regla de “imagen de espejo”). La diferencia (expresada en número de onda) entre el máximo de la primera banda de absorción y el máximo de la banda de fluorescencia corresponde al desplazamiento de Stokes.

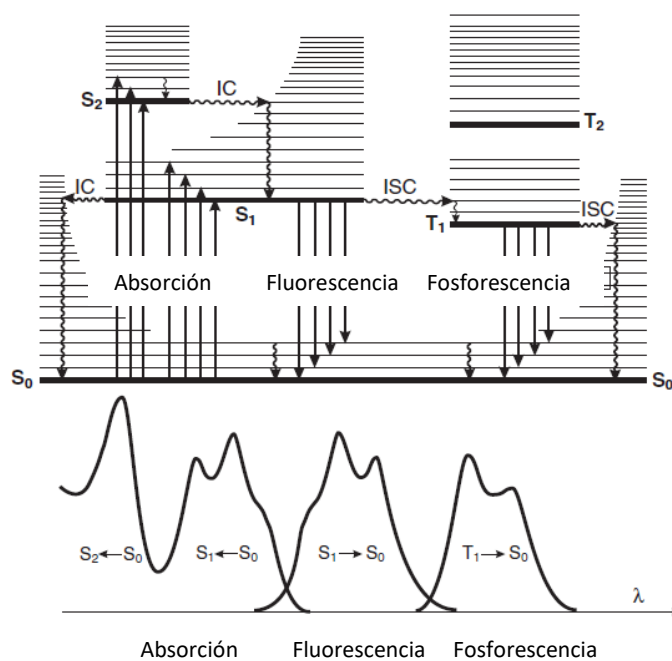
Cabe señalar que la emisión de un fotón es casi tan rápida que la absorción de un fotón ($\approx 10^{-15}$ s). Sin embargo, las moléculas excitadas permanecen en el estado S_1 por un cierto tiempo (algunas decenas de picosegundos a algunos cientos de nanosegundos, dependiendo del tipo de molécula y el medio) antes de emitir un fotón o experimentar otros procesos de des-excitación (conversión interna, cruce intersistemas). Así que, después de la excitación de una población de moléculas por un pulso muy corto de luz, la intensidad fluorescente disminuye exponencialmente con un tiempo característico, reflejando el tiempo de vida promedio de las moléculas en el estado excitado S_1 . Tal decaimiento en la intensidad es formalmente comparable con un decaimiento radioactivo que es también exponencial, con un tiempo característico, llamado periodo radioactivo, reflejando el tiempo de vida promedio de un radioelemento antes de la desintegración.

1.2.3. Transiciones radiativas y no radiativas entre estados electrónicos.

El diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 1.1) es conveniente para visualizar de una manera sencilla los posibles procesos: absorción de fotones, conversión interna, fluorescencia, cruce entre sistemas, fosforescencia, fluorescencia retardada y transiciones triplete-triplete. Los estados electrónicos singulete se denotan como S_0 (estado electrónico fundamental), S_1 , S_2 , ... y los estados tripletes, T_1 , T_2 , ... Los niveles vibracionales están asociados con cada estado electrónico. Es importante señalar que la absorción es muy rápida ($\approx 10^{-15}$ s) con respecto a todos los demás procesos, de modo que no hay desplazamiento concomitante de los núcleos según el principio de Franck-Condon. Las flechas verticales

correspondientes a la absorción comienzan desde el nivel de energía vibracional 0 (más bajo) de S_0 porque la mayoría de las moléculas se encuentran en este nivel a temperatura ambiente. La absorción de un fotón puede llevar a una molécula a uno de los niveles vibratorios S_1 , S_2, \dots , los posibles procesos de des-excitación posteriores se analizan a continuación.

La mayoría de las moléculas fluorescentes exhiben bandas de absorción y emisión anchas y no definidas, lo que significa que cada estado electrónico consiste en una variedad casi continua de niveles vibratorios. Si la diferencia de energía entre los niveles vibratorios 0 y 1 de S_0 y S_1 es, por ejemplo, de alrededor de 500 cm^{-1} , la relación N_1/N_0 llega a ser aproximadamente de 0.09. Por lo que la excitación puede ocurrir desde un nivel vibracional excitado del estado S_0 . Esto explica por qué el espectro de absorción puede superponerse parcialmente al espectro de fluorescencia.



Tiempos característicos	
Absorción	10^{-15} s
Relajación vibracional	$10^{-12} - 10^{-10} \text{ s}$
Tiempo de vida del estado excitado S_1	$10^{-10} - 10^{-7} \text{ s}$ Fluorescencia
Cruce intersistema	$10^{-10} - 10^{-8} \text{ s}$
Conversión interna	$10^{-11} - 10^{-9} \text{ s}$
Tiempo de vida del estado excitado T_1	$10^{-6} - 10 \text{ s}$ Fosforescencia

Figura 1.1. Diagrama de Perrin-Jablonski e ilustración de las posiciones relativas de los espectros de absorción, fluorescencia y fosforescencia.

1.2.4. Procesos de des-excitación de moléculas fluorescentes.

Una vez que una molécula es excitada por la absorción de un fotón, esta puede retornar al estado basal con emisión de fluorescencia, o fosforescencia después del cruce intersistemas, pero también puede experimentar una transferencia de carga intramolecular y cambio conformacional. Las interacciones en el estado excitado con otras moléculas pueden también competir con la des-excitación: transferencia de electrón, de protón o de energía, formación de excímeros. Esos caminos de des-excitación pueden competir con la emisión fluorescente si toman lugar en una escala de tiempo comparable con el tiempo promedio (tiempo de vida) en el que las moléculas permanecen en el estado excitado. Este tiempo promedio representa la ventana de tiempo experimental para la observación de procesos dinámicos. Las características de fluorescencia (espectro, rendimiento cuántico, tiempo de vida), que son afectadas por cualquier proceso en el estado excitado que implique interacciones de la molécula excitada con su entorno cercano, pueden proporcionar información sobre dicho microambiente. Cabe señalar que algunos procesos de estado excitado pueden conducir a especies fluorescentes, cuya emisión puede superponer a la de la molécula inicialmente excitada. Tal emisión debe distinguirse de la fluorescencia “primaria” que surge de la molécula excitada. El éxito de la fluorescencia como herramienta de investigación en el estudio de la estructura y la dinámica de la materia o de los sistemas vivos surge de la alta sensibilidad de las técnicas fluorométricas, la especificidad de las características de fluorescencia, debido al microambiente de la molécula que emite, y la capacidad de ésta para proporcionar información espacial y temporal. La Figura 1.2 muestra los parámetros físicos y químicos que caracterizan el microambiente y, por lo tanto, pueden afectar las características de fluorescencia de una molécula.

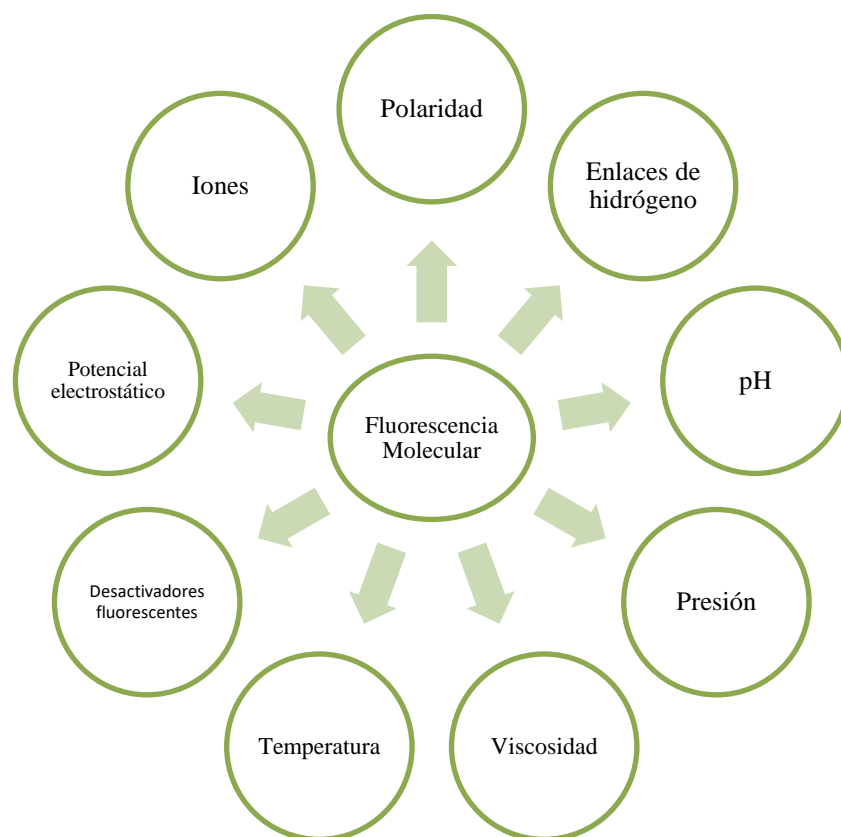


Figura 1.2. Parámetros que influyen en la emisión fluorescente.

1.2.5. Sondas fluorescentes, indicadores, etiquetas y trazadores.

Como una consecuencia de la fuerte influencia del medio circundante sobre la emisión fluorescente, las especies fluorescentes, usualmente llamadas fluoróforos, se utilizan para obtener información sobre parámetros locales tales como físicos, estructurales o químicos. El término sonda fluorescente se usa comúnmente, pero en el caso particular de un parámetro químico como el pH o la concentración de especies, se prefiere utilizar el término indicador fluorescente (por ejemplo, indicador fluorescente de pH). Por otro lado, cuando una molécula fluorescente es usada para ver o localizar especies, por ejemplo, por microscopía, los términos etiquetas fluorescentes y trazadores son comúnmente empleados. Esto implica que una molécula fluorescente está covalentemente unida a especies de interés: surfactantes, cadenas poliméricas, fosfolípidos, proteínas, oligonucleótidos, etc. Por ejemplo, el etiquetado de proteínas se puede lograr fácilmente por medio de compuestos

que tienen los grupos funcionales apropiados: por ejemplo, la formación de enlaces covalentes con grupos amino.

El carácter hidrofílico, hidrofóbico o anfifílico de un fluoróforo es esencial. En microscopía, la interacción selectiva de un fluoróforo con partes específicas del sistema bajo estudio (célula, tejido, etc.), que permite su visualización, es comúnmente llamada tinción, un término usado para los colorantes.

Los fluoróforos se pueden dividir en dos tipos: intrínsecos y extrínsecos. Los fluoróforos intrínsecos se encuentran en la naturaleza, por ejemplo, los aminoácidos aromáticos, NADH, flavinas, derivados de piridoxilo y clorofila, estos fluoróforos son ideales como sondas y trazadores. Los fluoróforos extrínsecos se agregan a la muestra para proporcionar fluorescencia cuando no existe, o para cambiar las propiedades espectrales de la muestra, algunos ejemplos son, el dansilo, fluoresceína, rodaminas, etc. Debido a la dificultad de síntesis de moléculas o macromoléculas unidas covalentemente a un fluoróforo, muchas investigaciones¹⁷ se llevan a cabo con fluoróforos interaccionando de manera no covalente. Los sitios de solubilización de tales sondas extrínsecas están gobernados por su naturaleza química, y las interacciones específicas que se llevan a cabo dentro de la región del sistema a investigar. El carácter hidrofílico, hidrofóbico o anfifílico de un fluoróforo es esencial. Una crítica común en el uso de este tipo de sondas extrínsecas es sobre la posible perturbación local inducida por la sonda sobre el microambiente que es probado. Hay de hecho varios casos de sistemas perturbados por sondas fluorescentes.¹⁸ Sin embargo, se debe enfatizar que hay muchos ejemplos de resultados consistentes con aquellos obtenidos por otras técnicas, que pueden ser encontradas en la literatura (temperatura de transición en bicapa lipídica, flexibilidad de cadenas poliméricas, etc.). Para minimizar la perturbación, se debe de poner atención al tamaño y forma de la sonda con respecto a la región que se va a probar. Si es posible, más de una sonda debe de usarse para obtener resultados consistentes.

La elección de una sonda fluorescente es crucial para no obtener interpretaciones ambiguas. Los aspectos principales que deben de tomarse en cuenta se muestran en la figura 1.3.

Las sondas fluorescentes y los trazadores pueden ofrecer una gran cantidad de información en varios campos como se muestra en la tabla 1.2. Es importante recalcar que otro tipo de sondas y trazadores también son usados en la práctica: por ejemplo, trazadores radioactivos,

y sondas de resonancia paramagnética electrónica que proporcionan información sobre su movilidad molecular. En contraste, las sondas fluorescentes son usadas en campos limitados de aplicaciones.

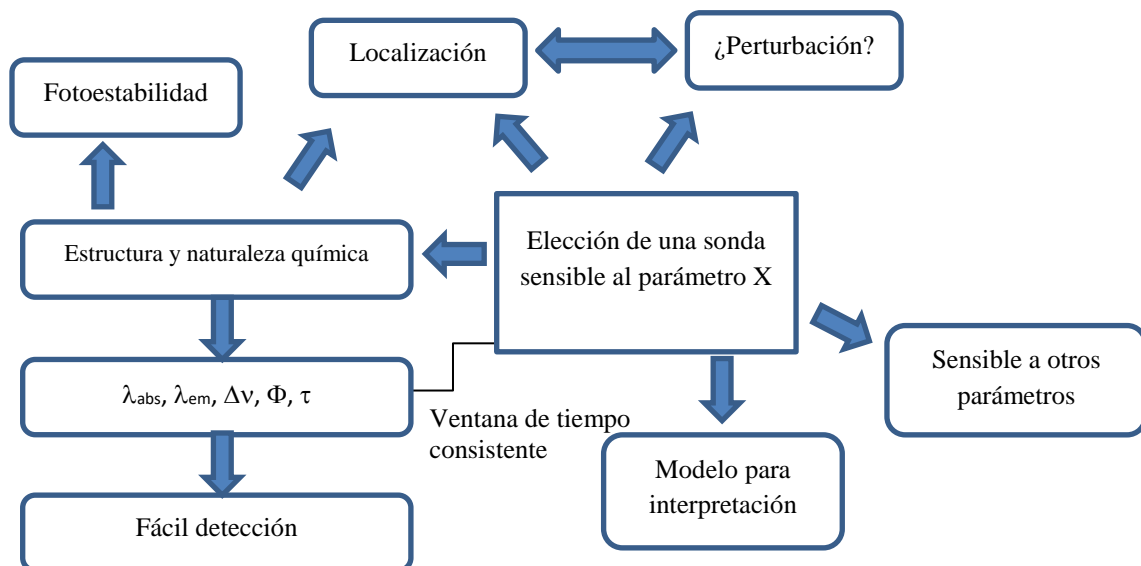


Figura 1.3. Estrategia para la elección de una sonda fluorescente. $\Delta\nu$, Φ , τ son: desplazamiento de Stokes, rendimiento cuántico, y tiempo de vida, respectivamente.

Tabla 1.2. Información proporcionada por sondas fluorescentes y trazadores en varios campos.

Campo	Información
Polímeros	Dinámica de cadenas de polímeros, microviscosidad, volumen libre, permeabilidad al oxígeno, miscibilidad, separación de fases, difusión de especies a través de redes poliméricas, monitoreo de la polimerización, degradación.
Superficies sólidas	Naturaleza de la superficie de la sílica coloidal, arcillas, zeolitas, geles de sílica, vidrios porosos Vycor®, alumina: rigidez, polaridad y modificación de superficies.
Disoluciones surfactantes	Concentración micelar crítica, concentración de reactivos entre partícula, agregación de surfactantes, propiedades de interface y polaridad, dinámica de surfactantes en solución, coeficientes de partición, transiciones de fase, influencia de aditivos.
Membranas biológicas	Fluidez, parámetros de orden, interacciones lípido-proteína, difusión translacional, cambios estructurales, potencial en membrana, complejos y uniones, efectos de aditivos, localización de proteínas.
Vesículas	Caracterización de la bicapa: microviscosidad, parámetros de orden, transición de fase, efecto de aditivos, pH interno, permeabilidad.
Proteínas	Sitios de unión, desnaturalización, accesibilidad a sitios, dinámica, distancias, transición conformacional.
Ácidos nucleicos	Flexibilidad, dinámica de torsión, estructura de hélice, deformación debida a agentes intercalantes, fotorrupturas, accesibilidad, carcinogénesis.
Células vivas	Visualización de membranas, lípidos, proteínas, ADN, ARN, antígenos de superficie, glicoconjugados de superficie, dinámica, permeabilidad, fusión y potencial en membranas, pH intracelular, calcio, sodio y cloruro citoplasmático, concentración de protones, estado redox, actividades enzimáticas, interacciones célula-célula y célula-virus, endocitosis, viabilidad, ciclo celular, actividad citotóxica.
Química clínica	Fluoroinmunoensayos, ensayos en proteasa y quinasa.

1.3. Evaluación de los parámetros físicos locales por medio de sondas fluorescentes.

Parámetros tales como la polaridad, viscosidad, temperatura, pH, y la presión juegan un papel principal en varios procesos físicos, químicos, bioquímicos y biológicos. En muchos casos, la emisión fluorescente es afectada por estos parámetros que pueden ser, en principio, estimados gracias a una elección apropiada de moléculas fluorescentes que actúan como sondas. Sin embargo, se debe poner atención a la validez de la estimación de parámetros como la polaridad y la viscosidad, mediante el uso de una molécula que proporcione información sobre su entorno. En cualquier caso, es más importante, en la mayoría de los casos, controlar los cambios de un parámetro físico que surja de una perturbación externa, que asignarle un valor a este parámetro.

1.3.1. Estimación de “microviscosidad”, fluidez y movilidad molecular.

La viscosidad es un parámetro macroscópico que pierde su significado físico a nivel molecular. Por lo tanto, el término “microviscosidad” debe usarse con precaución, y el término “fluidez” puede usarse alternativamente para caracterizar de manera muy general, los efectos de la resistencia viscosa y la cohesión del microambiente sondeado (polímeros, micelas, geles, bicapas lipídicas de vesículas, o membranas biológicas, etc.).

En todos los métodos fluorescentes (Figura 1.3) que permiten la evaluación de la fluidez de un microambiente por medio de una sonda fluorescente, la cantidad física subyacente es un coeficiente de difusión (rotacional o translacional) que expresa la resistencia viscosa de las moléculas circundantes. El principal problema es relacionar la constante de difusión D con la viscosidad η ; Se han propuesto muchas relaciones, sin embargo, no cumplen con una relación satisfactoria, debido principalmente al tamaño de las sondas es comparable al de las moléculas circundantes que forman el microambiente a sondear. Otra dificultad surge en el caso de conjuntos organizados tales como sistemas micelares, membranas biológicas, etc., debido a que el microambiente no es isotrópico.

En otras palabras, la viscosidad es un parámetro macroscópico y los intentos de obtener valores absolutos de viscosidad de un medio a partir de mediciones usando una sonda fluorescente no son posibles en la mayoría de los casos.

El término microviscosidad se usa a menudo, pero tampoco se pueden obtener valores absolutos, y lo mejor es hablar de una viscosidad equivalente, es decir, la viscosidad de un medio homogéneo en el que la respuesta de la sonda sea la misma. También representa una dificultad la elección del disolvente de referencia porque la rapidez de relajación rotacional de una sonda en varios disolventes con la misma viscosidad macroscópica depende de la naturaleza del disolvente (estructura química y posible orden interno).

Tabla 1.3. Técnicas principales de fluorescencia para la determinación de la fluidez.

Técnica	Características de la fluorescencia medida	Fenómeno	Comentarios
Rotores moleculares	Rendimiento cuántico fluorescente y/o tiempo de vida	Movimiento torsional interno	Muy sensible al volumen libre, experimento rápido
Formación de excímero	Espectros de fluorescencia		Experimento rápido
1) Intermolecular	Radio de excímero y bandas de monómero	Difusión translacional	Difusión perturbada por microheterogeneidad
2) Intramolecular	Radio de excímero y bandas de monómero	Difusión rotacional interna	Más confiable que la formación intermolecular
Extinción fluorescente	Rendimiento cuántico fluorescente y/o tiempo de vida	Difusión translacional	Adición de dos sondas, mismo inconveniente que la formación de excímero
Polarización fluorescente	Emisión anisotrópica	Difusión rotacional de la sonda	
1) Estado estable			Técnica simple pero la ley de Perrin comúnmente no es válida
2) Tiempo de vida			Técnica sofisticada pero muy valiosa, también proporciona parámetros de orden

1.3.2. Uso de rotores moleculares.

Los rotores moleculares fluorescentes son moléculas que exhiben rotación intramolecular en estado excitado y pueden ser calibradas por medios físicos (luz), químicos (especies iónicas) y fisicoquímicos (microviscosidad local).¹⁹⁻²¹ Por otro lado, las técnicas de polarización fluorescente pueden ser usadas para estimar la dinámica del rotor. Sin embargo, esas técnicas requieren que las sondas cumplan, en la medida de lo posible, los siguientes requisitos: 1) mínima perturbación con el medio; 2) simetría en el momento de transición y dirección de tal manera que las rotaciones puedan considerarse como isotrópicas (la estructura molecular del rotor necesita ser no planar); 3) interacciones específicas mínimas con las moléculas circundantes; 4) sensibilidad mínima del tiempo de vida del estado excitado al microambiente cuando se mide la anisotropía del estado estacionario.

Los rotores moleculares permiten estudiar los cambios en volumen libre de polímeros asociados con la reacción de polimerización, masa molecular, estereorregularidad, reticulación, relajación y flexibilidad de la cadena polimérica, separación por microfase, transiciones térmicas, degradación, y formación de gel.

En ciencias de la vida, los rotores moleculares son usados para sondear células vivas. Se puede obtener información sobre la fluidez de la membrana celular, el citoplasma, y el citoesqueleto. Los cambios en la viscosidad de la membrana celular a menudo están relacionados con procesos fisiológicos asociados con ciertas enfermedades (por ejemplo, la diabetes, enfermedad de Alzheimer, trastornos hepáticos) o el envejecimiento.²²

1.4. Sondas fluorescentes de microviscosidad celular.

1.4.1. Sondas basadas en intensidad fluorescente.

La viscosidad determina procesos de difusión controlada. Varios viscosímetros para la medición de grandes volúmenes de líquido se han desarrollado en los últimos años, como por ejemplo el viscosímetro de caída de bolas, el viscosímetro de pistón y el viscosímetro

rotatorio. Sin embargo, las mediciones de microviscosidad en los sistemas biológicos siguen siendo un problema. La viscosidad local dentro de una sola célula influye significativamente en múltiples procesos intracelulares. Los cambios anormales en la viscosidad local en una sola célula probablemente causan un mal funcionamiento celular o una enfermedad grave.²³ Por lo que las herramientas útiles para la medición de la microviscosidad tienen una gran demanda.

En años recientes, con la aplicación de la tecnología fluorescente, han surgido las sondas fluorescentes de microviscosidad, comúnmente llamadas “rotores moleculares”. Su estructura química se compone de un fluoróforo con un grupo espacial rotacional conjugado que es capaz de girar en torno al resto de la molécula. En ambientes poco viscosos, existe una rotación más rápida que relaja la energía de excitación y que extingue de manera significativa la fluorescencia y acorta el tiempo de vida fluorescente, mientras que en medios viscosos la rotación disminuye, reduciendo la posibilidad de pérdida de energía mediante vías no radiativas, aumentando la intensidad fluorescente y alargando el tiempo de vida fluorescente.

En 1982, R. O. Loutfy y colaboradores²⁴ describieron un grupo de rotores moleculares fluorescentes como sondas fluorescentes microscópicas (**1.1-1.3**) (Figura 1.4) para medir la rigidez torsional de los medios locales. Estas sondas son colorantes fluorescentes de tipo *push-pull*. La fluorescencia de estos colorantes se extingue en disoluciones no viscosas y también depende de la temperatura. Además, los tiempos de vida del estado excitado singulete de estos compuestos son cortos (3-10 ps), y la desactivación rápida del estado excitado es atribuida a la relajación torsional interna rápida.

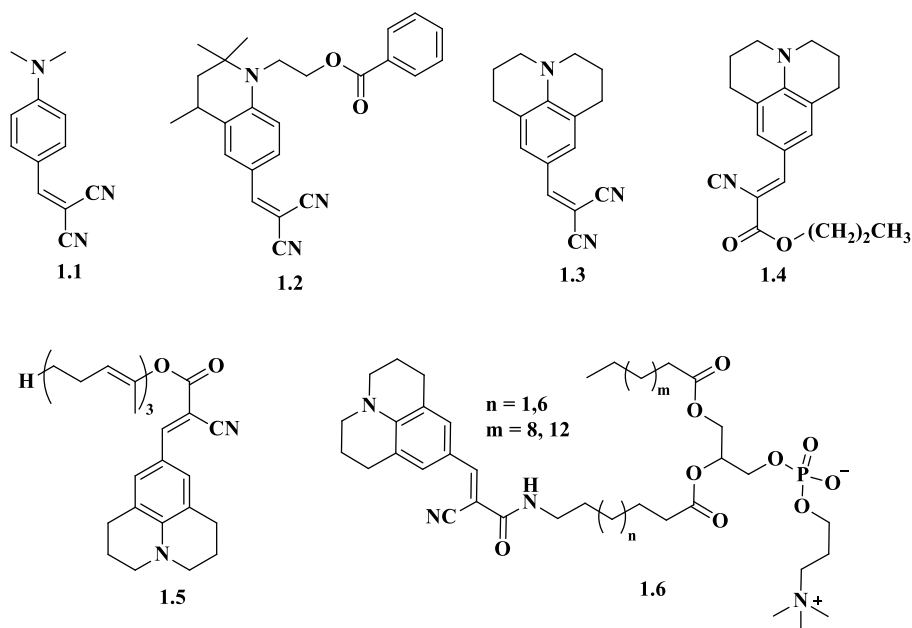


Figura 1.4. Estructuras químicas de los rotores moleculares **1.1-1.6**.

Reed y colaboradores²⁵ emplearon el compuesto **1.3**, para investigar la microviscosidad de algunas bicapas artificiales por ejemplo micelas de dodecilsulfato sódico (SDS) y vesículas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Tras correlacionar los rendimientos cuánticos de fluorescencia con la viscosidad, se midió la microviscosidad efectiva por medio del concepto de volumen libre para los disolventes con una viscosidad de media a alta (712 cP). También se midieron las microviscosidades efectivas en vesículas de DPPC y éstas se encontraban en el intervalo de 70-120 cP con la temperatura entre 60 y 101 °C.

Theodorakis y colaboradores²⁶ sintetizaron una serie de derivados de 9-(dicianovinil)-julolidina (**1.4-1.5**). Estas moléculas presentan cadenas hidrocarbonadas de diferentes longitudes para controlar la compatibilidad hacia la membrana celular. El rotor molecular **1.5** mostró una sensibilidad mayor (más de 20 veces) que **1.4** cuando se mapean los cambios de viscosidad en la membrana. Estos autores también informaron otra familia de rotores moleculares (**1.6**) unidos a fosfolípidos²⁷. Estos rotores se unieron mediante un grupo polimetileno al extremo hidrófobo o hidrófilo de una estructura de fosfolípidos. Esta modificación estructural no afectó la sensibilidad del rotor hacia la viscosidad y permitió la acumulación adecuada en bicapas artificiales, así como la localización completa en la membrana plasmática de células vivas.

Haidekker y colaboradores²⁸ investigaron las relaciones estructura-propiedad de una serie de rotores moleculares que contienen *N,N*-dialquilanilina (**1.7-1.11**) (Figura 1.5), con respecto a la longitud de onda de emisión fluorescente, la intensidad y la sensibilidad a la microviscosidad. Se descubrió que la extensión de la conjugación entre el fragmento donador y la unidad aceptora influye dramáticamente en la longitud de onda fluorescente y evidentemente en el desplazamiento de Stokes. El nitrógeno de las cadenas laterales de alquilo no afecta significativamente a las longitudes de onda de excitación y de emisión. Los cambios en la estructura molecular generan diferentes rendimientos cuánticos de fluorescencia y diferentes sensibilidades en las mediciones de viscosidad.

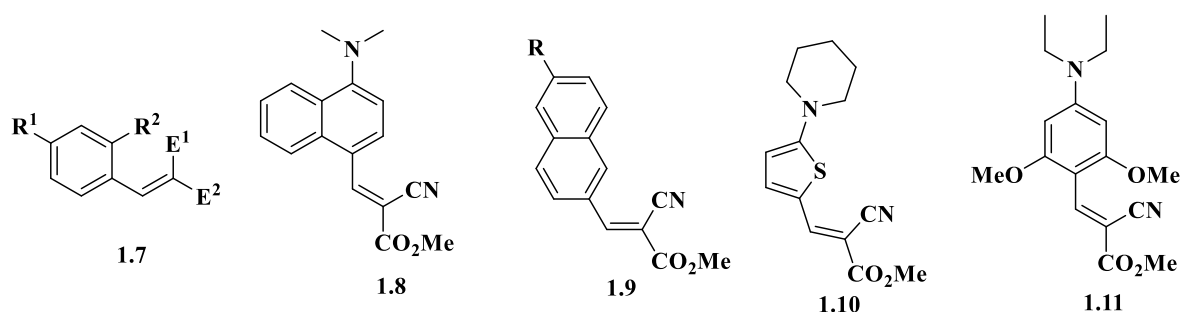


Figura 1.5. Estructuras químicas de las moléculas **1.7-1.11**.

Una serie de rotores moleculares fluorescentes **1.12-1.19** (Figura 1.6) para mediciones de viscosidad fueron sintetizados por Zhao y colaboradores.²⁹ Ellos estudiaron la relación entre la sensibilidad de los rotores hacia la viscosidad del disolvente y la polaridad a través de diferentes métodos, tales como absorción de UV/Vis, espectros de emisión fluorescente y cálculos teóricos DFT/TD-DFT. Estos rotores muestran un gran desplazamiento hacia el rojo en las longitudes de emisión a 620 nm y desplazamientos de Stokes de 170 nm. En diferentes disolventes, los rotores moleculares muestran diversas respuestas de fluorescencia, por ejemplo, los rotores funcionan como rotores moleculares no fluorescentes en disolventes con alta viscosidad, pero baja polaridad, como en el PEG400 o en el aceite de dimetilsilicona, mientras que muestran propiedades de rotor molecular fluorescente con la mezcla etilenglicol/glicerol.

En los compuestos **1.18-1.19**, el disolvente influye en la emisión fluorescente y en las propiedades del rotor molecular. Además, los resultados de la titulación del ácido

trifluoroacético y los cálculos DFT/TD-DFT demostraron que los estados excitados de emisión de los rotores corresponden a estados excitados locales (LE), lo cual indica que la rotación interna a través del enlace doble C=C (grupo dicianovinilo) es el estado S_1 , el principal canal de desactivación no radiante. Además, la extensión de la conjugación π de los rotores, crea una barrera de rotación más grande sobre el enlace doble C=C en el estado S_1 , lo que resulta en el bloqueo de canales no radiativo y un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia para estos compuestos.

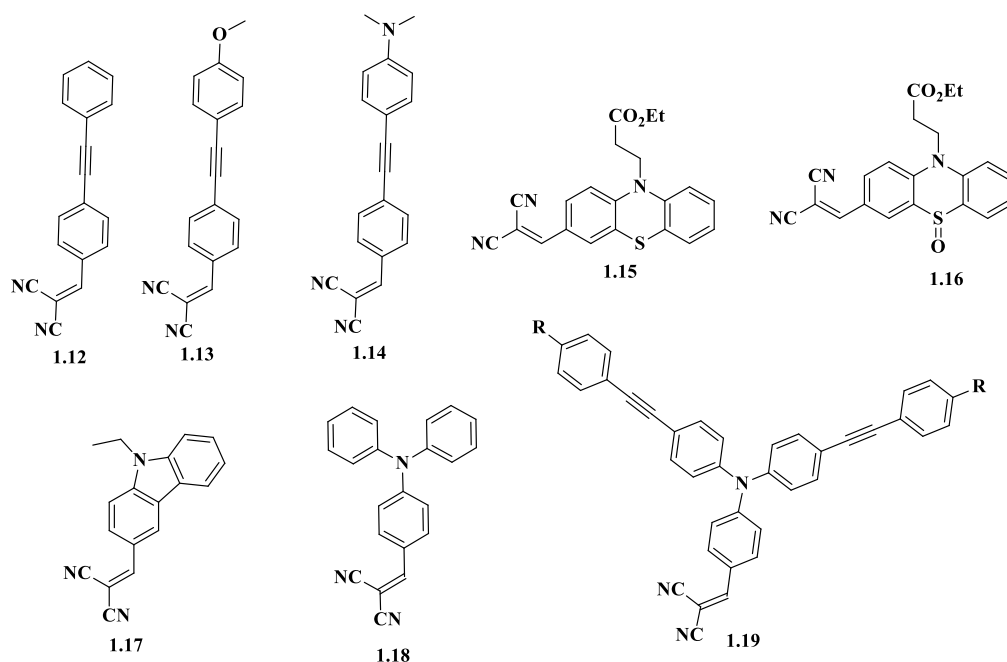


Figura 1.6. Estructuras químicas de los compuestos **1.12-1.19**.

Como la absorción y la emisión fluorescente de **1.1-1.3** se localizan principalmente en la región de 350-500 nm, no son adecuadas para mediciones de viscosidad en tiempo real *in vivo*.²⁴⁻²⁵ Benniston y colaboradores²⁰ reportaron un rotor molecular que consta de dos fluoróforos de bodipy unidos mediante un espaciador (**1.20**) (Figura 1.7), y estudiaron su capacidad para monitorear los cambios de viscosidad local. Esta sonda evitó la interferencia TICT (transferencia de carga intramolecular de torsión) y posee longitudes de onda de absorción y de emisión más aceptables para probarlas *in vivo*. La rotación del anillo de *meso*-fenileno del núcleo de bodipy y la distorsión del núcleo de dipirriño promueven que

no haya desactivación en el estado excitado, dando como resultado una extraordinaria sensibilidad a la viscosidad.

El compuesto **1.21** posee un grupo *meso*-fenilo y usualmente se funcionaliza con cadenas de alquilo para facilitar su incorporación a medios biológicos y la evaluación de la viscosidad del ambiente circundante.³⁰⁻³¹ El tamaño del espaciador fenileno favorece su rotación y por lo tanto la sensibilidad hacia la viscosidad local. El compuesto **1.22** tiene un grupo *meso*-fenantreno unido al bodipy y fue diseñado y estudiado por Harriman.³¹ El sustituyente de fenantreno es voluminoso y no permite una rotación libre a través del enlace C-C, pero puede oscilar variando el ángulo diedro. La rotación afecta muy poco las propiedades fotofísicas del bodipy, y esto implica que la sonda fluorescente **1.22** sea una sonda poco sensible a la viscosidad.

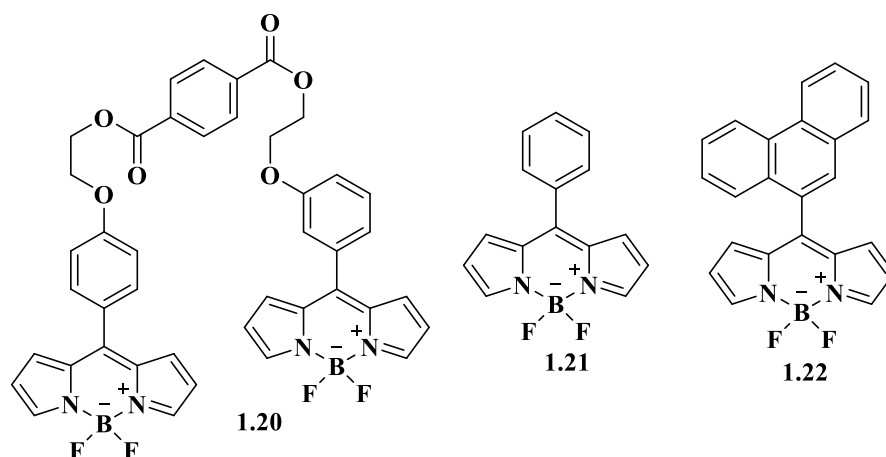


Figura 1.7. Estructuras químicas de los rotores moleculares **1.20-1.22**.

Zhu y colaboradores sintetizaron dos moléculas de ferroceno-bodipy (**1.23-1.24**) (Figura 1.8), cuya arquitectura obedece a un sistema típico *push-pull*. La sonda **1.23**, a diferencia de **1.24**, contiene un grupo espaciador más largo, y además presenta buena respuesta hacia la viscosidad, cuya emisión fluorescente aumenta drásticamente a medida que la viscosidad aumenta, incluso en una disolución de baja viscosidad. Por lo que este compuesto es un potencial candidato como sonda de viscosidad para la detección de enfermedades en sistemas biológicos.

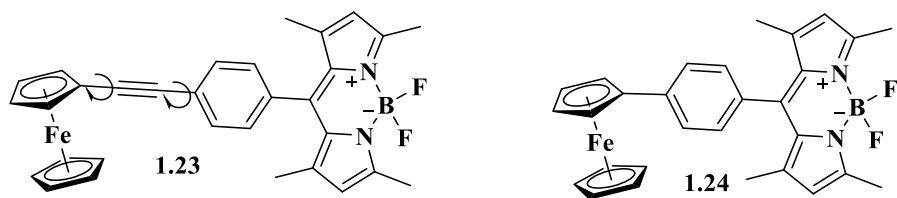


Figura 1.8. Estructuras químicas de los compuestos **1.23-1.24**.

En 2016, S. Ch. Lee y colaboradores³² publicaron cuatro sondas fluorescentes (**1.25-1.28**) basadas en pirrol, cuya arquitectura consiste en un sistema *push-pull*, en donde el grupo diciano actúa como electroatractor y el núcleo pirrólico como electrodonador. Estos rotores moleculares exhiben una gran intensidad fluorescente, con un orden de magnitud más alto que los análogos fenólicos (DAP) debido a que la rotación del pirrol asimétrico los hace sensibles a la viscosidad, fueron utilizados para medir la viscosidad intracelular. Por lo tanto, la introducción de diferentes grupos pirrólicos asimétricos es una estrategia para obtener rotores moleculares con alto contraste fluorescente.

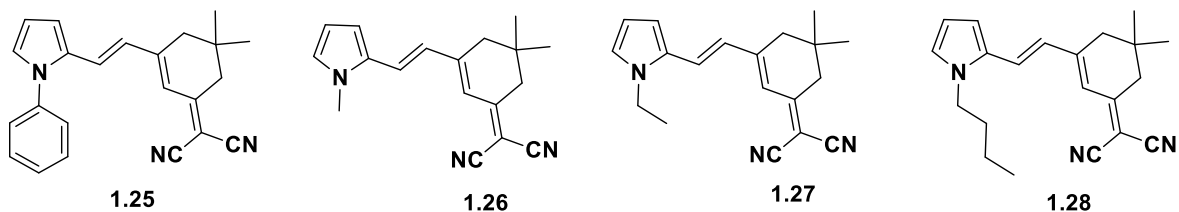


Figura 1.9. Estructuras de sondas fluorescentes basadas en pirrol.

1.4.2. Sondas fluorescentes basadas en imágenes fluorescentes ratiométricas y de tiempo de vida.

Las sondas de viscosidad basadas en la intensidad fluorescente son incapaces de determinar cuantitativamente la microviscosidad intracelular, debido a variaciones espaciales en la concentración y la heterogeneidad de los medios intracelulares.²⁴⁻³² Por lo tanto, han surgido nuevos rotores moleculares capaces de cuantificar la viscosidad en fase

heterogénea o en células vivas. Se ha sugerido que estos rotores pueden medir con precisión la viscosidad biológica mediante la ratiometría y tiempo de vida de imagen fluorescente. A continuación, se citan algunos ejemplos.

En 1993, Luby-Phelps³³ y colaboradores desarrollaron un par ratiométrico para la determinación fluorométrica de la viscosidad de los disolventes. Este par ratiométrico está compuesto por el colorante Cy3 y el colorante Cy5 (Figura 1.10) unidos a macromoléculas transportadoras. Cuando se varía la viscosidad del ambiente, la proporción de intensidad fluorescente (ICy3/ICy5) en una mezcla de las macromoléculas en disolución es dependiente de la viscosidad del disolvente e independiente de otros parámetros del disolvente tales como polaridad, temperatura y enlaces de hidrógeno. Las proporciones (ICy3/ICy5) son insensibles a las biomacromoléculas (proteínas). Después de que el compuesto macromolecular marcado con Cy3 y Cy5 se inyectara en el citoplasma de células vivas, la formación de imágenes ratiométricas indica que la viscosidad del citoplasma no es significativamente diferente a la del agua y no muestra variación espacial.

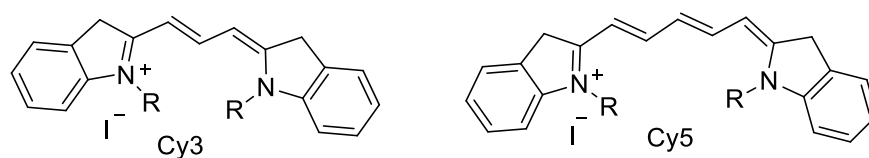


Figura 1.10. Estructuras de los colorantes Cy3 y Cy5.

Wandelt y colaboradores³⁴ estudiaron la microviscosidad de las células en músculos lisos torácicos de rata a través de imágenes ratiométricas, utilizando el compuesto **1.29** (Figura 1.11) como una sonda permeable a la membrana. Cuando se excita a 469 o 360 nm, esta sonda muestra una emisión dual en una disolución acuosa, generando una banda de emisión alrededor de 600 nm. La proporción de las dos bandas (I_{469}/I_{360}) es muy sensible a la microviscosidad local. La emisión fluorescente ocurre en 600 nm.

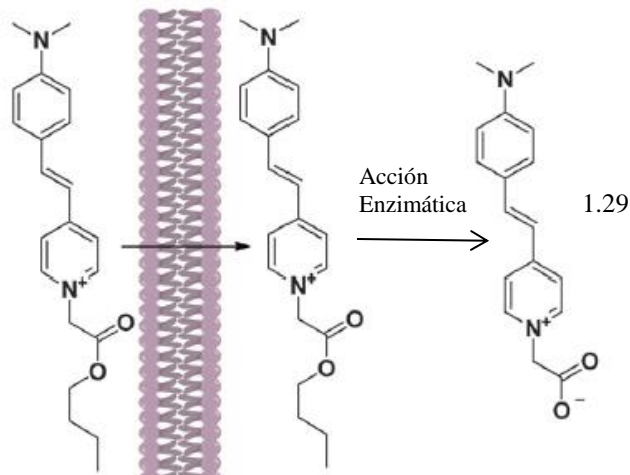


Figura 1.11. Reacciones químicas propuestas para el compuesto **1.29** pasando a través de las membranas celulares.

En 2006, Haidekker y colaboradores³⁵⁻³⁶ reportaron la primera sonda fluorescente ratiométrica para mediciones de viscosidad (**1.30**). El diseño de la sonda está basado en el uso de dos fluoróforos, el ácido 7-metoxicumarin-3-carboxílico (MCCA) y el fluoróforo CCVJ (Figura 1.12). El grupo MCCA que actúa como un grupo electrodonador es insensible a la viscosidad, mientras que el grupo CCVJ es altamente dependiente de la viscosidad. El espaciador de los fluoróforos permite una transferencia de energía de MCCA al aceptor CCVJ.

Nipper y colaboradores³⁷ desarrollaron otro rotor molecular fluorescente (**1.31**) que tiene la habilidad de autocalibrarse superando los gradientes de concentración local. Se incorporó dentro de un modelo liposomal de dilauroilfosfatidilcolina (DLPC) que fue tratado con propanol, un agente fluidizante de membrana. Los colorantes que se autocalibran pueden ser utilizados para monitorear la viscosidad en tiempo real de liposomas, y tiene la principal ventaja sobre las mediciones de tiempo de vida fluorescente, el bajo costo en la instrumentación.

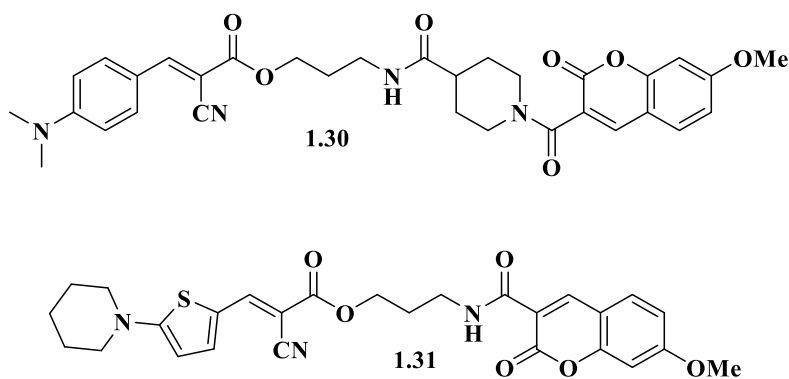


Figura 1.12. Composición química de los sensores **1.30-1.31**.

Kuimova y colaboradores³⁸ diseñaron un rotor molecular ratiométrico (**1.32**) (Figura 1.13), cuya arquitectura corresponde a un dímero de porfirina unido mediante dos enlaces triples conjugados C-C, esta sonda se utilizó para obtener imágenes y cuantificar la viscosidad intracelular. Este dímero presenta dos bandas de máxima emisión (710 y 780 nm), debido a sus dos conformaciones, la banda a 710 nm corresponde a una conformación torcida de las porfirinas y la banda a 780 nm corresponde a la conformación coplanaria del dímero de porfirina. Debido a la rotación relativa de los dos núcleos de porfirina, la emisión del monómero se observó principalmente en medios altamente viscosos. Este compuesto también funciona como sensibilizador en terapia fotodinámica de cáncer (PDT). Cuando el dímero de porfirina se expone a la radiación de luz, se generan agentes citotóxicos ($^1\text{O}_2$ de corta vida que pueden cambiar la viscosidad celular). El compuesto **1.32** también se puede utilizar para inspeccionar los cambios de viscosidad mediante imágenes de fluorescencia ratiométrica.

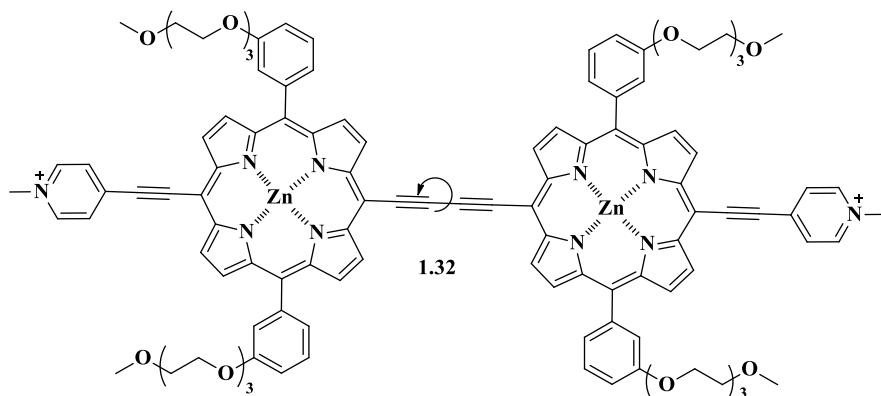


Figura 1.13. Estructura química del rotor molecular **1.32**.

Adicionalmente, la microscopía de imagen de tiempo de vida fluorescente (FLIM) es otro método en la investigación de la viscosidad celular. A diferencia de la intensidad fluorescente, la vida útil fluorescente es independiente de la concentración de un fluoróforo y otros factores, y se puede utilizar para detectar el estado dinámico excitado o la agregación. En años recientes este método ha recibido mucho interés en la investigación como una herramienta poderosa en los campos de la química y de la bioquímica.

En 2008, Kuimova y Suhling³⁹ diseñaron un rotor molecular para mapear la microviscosidad local utilizando FLIM. Después de comparar las propiedades fluorescentes de una serie de colorantes basados en el núcleo de bodipy, ellos concluyeron que el compuesto **1.33** (Figura 1.14), un bodipy *meso*-fenilsustituído con una larga cadena alifática, es un candidato ideal para el rotor molecular. Encontraron que la imagen de tiempo de vida fluorescente es sensible a la microviscosidad local. El tiempo de vida fluorescente incrementa de 0.7 ± 0.05 a 3.8 ± 0.1 ns con un incremento en la viscosidad del medio circundante de 28 a 950 cP. FLIM se utilizó para mapear la distribución de la viscosidad en células por incubación con el rotor molecular. El bodipy *meso*-sustituído se puede utilizar en FLIM y mediciones de decaimiento de fluorescencia resuelta por polarización.

Suhling y colaboradores⁴⁰ sintetizaron otro bodipy con una larga cadena hidrofóbica para dirigirlo a regiones no acuosas de la membrana intracelular (**1.34**). Comparado con **1.33**, el rotor molecular **1.34** puede dar información sobre variaciones espaciales en la viscosidad de ambientes biológicos a través de FLIM. Los tiempos de vida fluorescente de los dos colorantes se midieron en un amplio intervalo de viscosidades, que varían de los 100 ps a los 4 ns.

Kuimova y colaboradores⁴¹ determinaron la distribución de la viscosidad heterogénea en un recubrimiento de microburbujas mediante el registro de imágenes FLIM del colorante **1.33** sensible a la viscosidad. El compuesto **1.34** se puede incorporar sin problemas en una microburbuja con un surfactante encapsulado y rodeado por una capa de fosfolípidos. Los resultados confirmaron que las microburbujas eran suficientemente estables en presencia de radiación láser a bajas potencias para obtener imágenes FLIM, y exhibían un gran cambio en la viscosidad a través de la población de microburbujas.

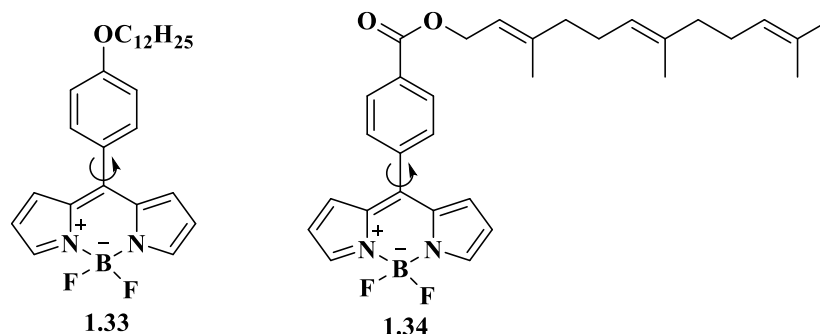


Figura 1.14. Estructuras químicas de rotores moleculares **1.33-1.34** basados en bodipy.

El concepto de una sonda de viscosidad dual fue planteado por primera vez por Peng y colaboradores,⁴² en donde la sonda de viscosidad **1.35** (Figura 1.15) contiene el grupo Cy5 y un grupo formilo en la posición central de la cadena de polimeteno, y se utilizó para medir la respuesta fluorescente hacia la viscosidad intracelular. Este rotor fue el primer compuesto con el que se lograron obtener imágenes fluorescentes bimodales de viscosidad celular, incluidas las imágenes ratiométricas y FLIM. La restricción de la rotación del grupo formilo en ambientes viscosos promueve un incremento marcado en la fluorescencia y un alargamiento en la duración del tiempo de vida fluorescente (de 200 a 1450 ps aproximadamente). Este rotor fluorescente muestra dos bandas de absorción (λ_{abs} 400 y 613 nm en etanol) y de emisión (λ_{em} 456 nm (azul) y 650 nm (rojo) en etanol), y exhibe una respuesta ratiométrica y un cambio en el desplazamiento de Stokes (aproximadamente 250 nm).

La microscopía de dos fotones (TPM) ha sido ampliamente aplicada en la detección fluorescente y en la obtención de imágenes. El grupo de Peng⁴³ reportó una sonda fluorescente ratiométrica (**1.36**) para obtener imágenes de la viscosidad celular y tisular con buenas propiedades de absorción de dos fotones. Este rotor se obtuvo uniendo un aldehído de carbazol con una sal de 2,3,3-trimetilindolenio. Mostró una banda de máxima absorción a 380 nm y dos bandas de emisión localizadas a 485 y 580 nm. Se observó una mejora de la fluorescencia de **1.36** al aumentar la viscosidad del disolvente, con la banda de emisión a 580 nm (roja) incrementando mucho más rápido que la banda a 485 nm (azul). Esta sonda fue capaz de mapear la viscosidad celular.

Min⁴⁴ diseñó un rotor molecular híbrido genético-químico (**1.37**) para medir el ambiente local de una proteína específica usando FLIM. La trimetoprima (TMP) se unió al colorante Cy3, que fue elegido como un indicador sensible a la viscosidad debido a la rotación del fragmento. La trimetoprima fue empleada como ligante específico hacia la dihidrofolato reductasa (eDHFR). El tiempo de vida fluorescente de **1.37** es independiente de la concentración del fluoróforo. Este compuesto representa una herramienta prometedora para obtener información valiosa de las funciones de las proteínas en el microambiente complejo y de constante cambio, con alta especificidad y buena resolución espacio-temporal.

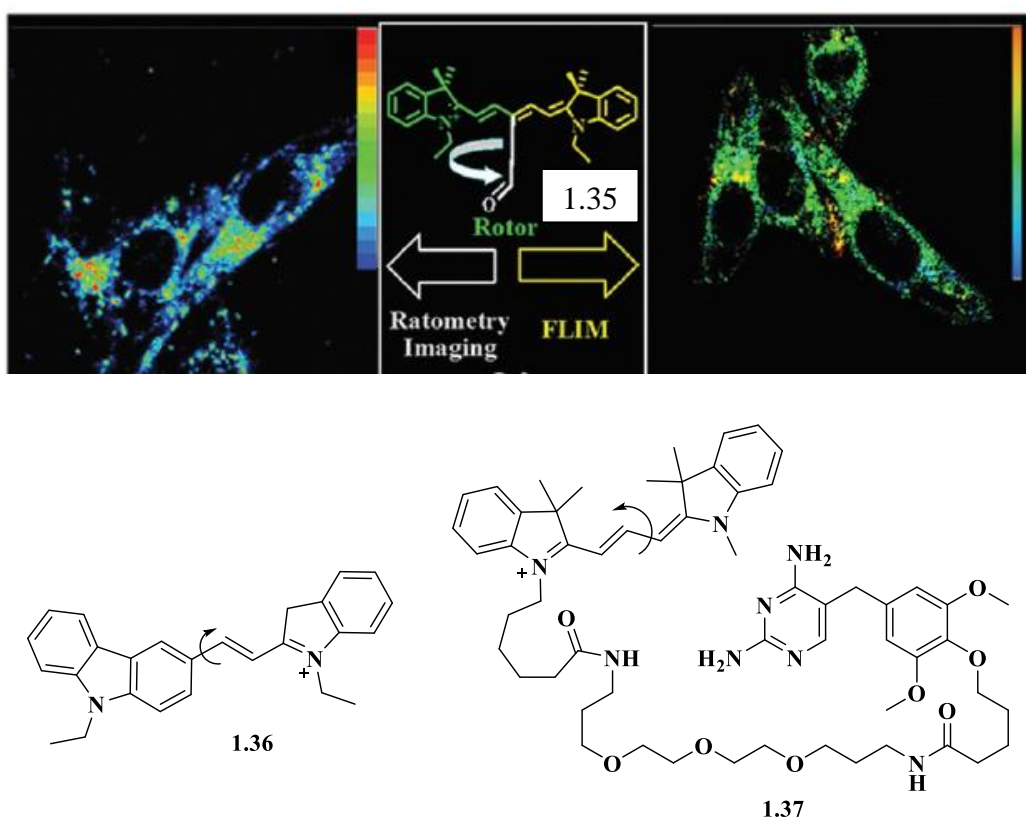


Figura 1.15. Rotores moleculares fluorescentes basados en cianina (**1.35-1.37**).

Xi y colaboradores⁴⁵ reportaron la primera sonda fluorescente basada en el núcleo de bodipy (**1.38**) para imagen de viscosidad lisosomal (Figura 1.16). El rotor molecular posee un núcleo de morfolina que lo vuelve selectivo al lisosoma. La intensidad fluorescente de **1.38**, es sensible al pH y a la viscosidad. El tiempo de vida fluorescente de **1.38** mostró respuesta hacia los cambios de viscosidad y fue independiente de los cambios de polaridad

y de pH. La sonda es útil para el monitoreo en tiempo real de los cambios dinámicos en la viscosidad lisosomal en células a través de la técnica FLIM.

Los cambios de viscosidad en la matriz mitocondrial pueden jugar un papel crucial en la modulación de la difusión de los metabolitos y en el metabolismo mitocondrial. Kim y colaboradores⁴⁶ diseñaron sondas de viscosidad duales que se autocalibran (**1.39-1.40**) y permiten medir la viscosidad mitocondrial. Las sondas están constituidas por un núcleo de cumarina y uno de bodipy, conectados a través de un espaciador fenilo que promueve un sistema de transferencia de energía de enlace (TBET), y el grupo trifenilfosfonio dirige la sonda hacia la mitocondria. Este sistema tiene la ventaja sobre los pares moleculares de transferencia de energía resonante de Förster en que no evitan la incertidumbre causada por la distancia variable y por la orientación dipolar de los dos fluoróforos. Se observaron relaciones lineales entre la proporción fluorescente de los dos fluoróforos, el tiempo de vida fluorescente, y la viscosidad, lo que sugiere que estas sondas se pueden utilizar para la obtención de imágenes de viscosidad mitocondrial. El rotor también fue capaz de determinar los cambios de viscosidad bajo apoptosis mitocondrial causada por el tratamiento con monensina y nistatina: La viscosidad incrementa de 60 a 110 cP.

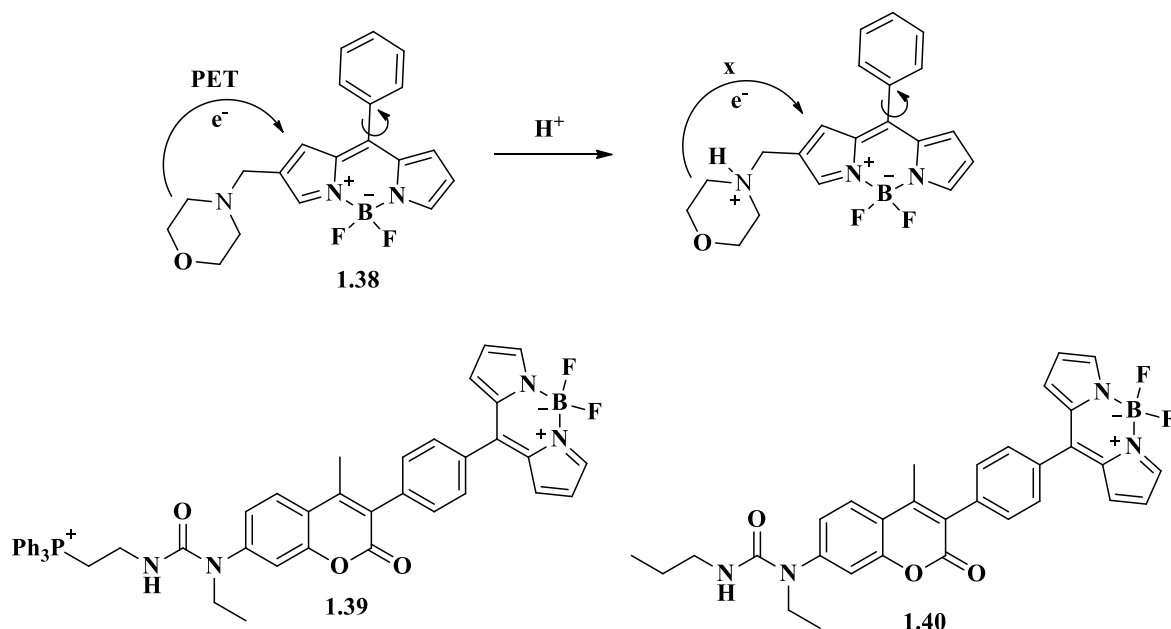


Figura 1.16. Rotores moleculares fluorescentes selectivos a organelos (**1.38-1.40**).

M. Zhao y colaboradores⁴⁷ reportaron una sonda fluorescente ratiométrica de excitación de dos fotones, soluble en agua basada en un fragmento aniónico de diacetato de 2,2'-fenilazano y uno catiónico de 1,2,3,3-tetrametil-3*H*-indol-1-ilo **1.41** (Figura 1.17). Este sensor es sensible a la viscosidad de la mitocondria en células y presenta dos bandas de emisión fluorescente, la proporción de la intensidad fluorescente (I_{569}/I_{384}) contra el logaritmo de la viscosidad ($\log \eta$) permite el monitoreo y la cuantificación de los cambios anormales de la viscosidad en la mitocondria. Esta sonda fluorescente permitió además distinguir entre la viscosidad de células HepG2 normales y las tratadas con nistatina.

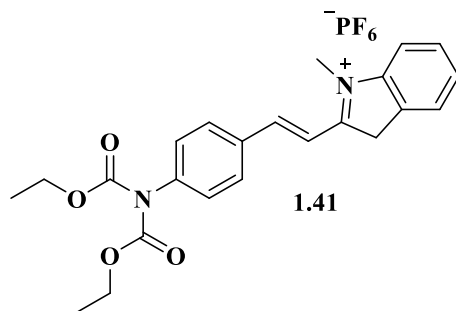


Figura 1.17. Estructura de la sonda fluorescente **1.41**.

En 2017 T. Matsumoto y colaboradores⁴⁸ reportaron tres derivados de dibenzoborol **1.42-1.44** (Figura 1.18), estos compuestos presentan dos bandas de emisión y funcionan como sensores fluorescentes ratiométricos que discriminan la viscosidad de alcanos con diferente longitud de la cadena. La sensibilidad de la emisión fluorescente de estos compuestos se debe a la transición de la transferencia de carga intramolecular (BICT) que es inducida por el rompimiento del enlace B-N. El concepto de emisión BICT puede ser válido para la construcción y diseño de sondas que detecten diferencias en un ambiente local y para obtener materiales ópticamente funcionales con alta sensibilidad a la transición de las especies y de los intermediarios reactivos.

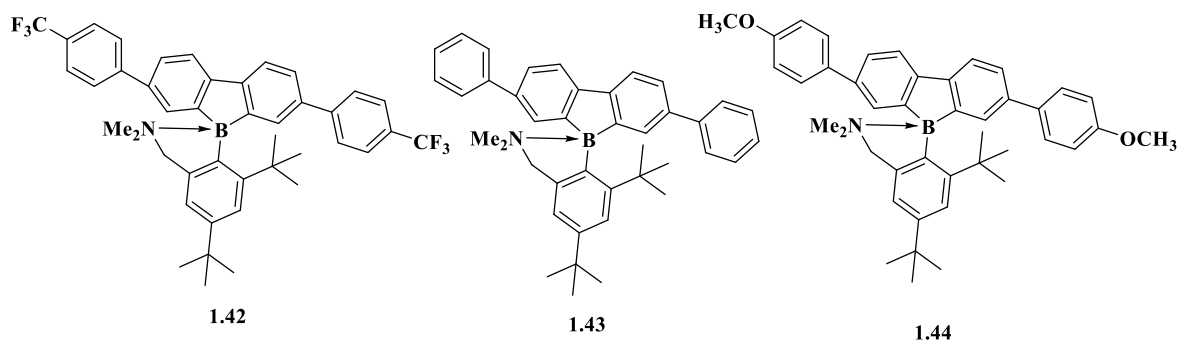


Figura 1.18. Estructuras de sondas fluorescentes derivadas de dibenzoborol.

1.5. Detección química mediante fluorescencia.

Las técnicas analíticas basadas en fluorescencia son ampliamente utilizadas debido a las distintas ventajas que ofrecen para la detección de la fluorescencia en términos de sensibilidad, selectividad, tiempo de respuesta y observación local (por ejemplo la espectroscopia de imagen fluorescente). La gran mejora en la sensibilidad y en la resolución espacial o temporal de los instrumentos garantiza el éxito de esta técnica.¹⁶

Cuando un analito es fluorescente, la detección fluorométrica directa es posible por medio de un espectrofluorímetro que opera a una longitud de excitación adecuada. Este es el caso de los hidrocarburos aromáticos (por ejemplo, en el petróleo crudo), las proteínas (por ejemplo, en el suero sanguíneo, en la leche de vaca), algunos fármacos (por ejemplo morfina), clorofila, etc. Se han aplicado en numerosos campos: análisis de contaminantes del aire y el agua, aceites, alimentos, fármacos, el monitoreo de procesos industriales y de especies de importancia clínica, etc.

Sin embargo, muchos iones o moléculas no son fluorescentes y se deben de utilizar métodos indirectos para su detección. Estos métodos son el objeto de numerosas investigaciones debido a su alta demanda en química analítica, bioquímica clínica, medicina, ciencias ambientales, etc. Muchos analitos químicos y bioquímicos se pueden detectar por métodos fluorescentes: cationes (H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Cd^{2+} , etc.), aniones (haluro, citratos, carboxilatos, fosfatos, ATP, etc.), moléculas neutras

(azúcares, por ejemplo la glucosa), gases (O₂, CO₂, NO, etc.) y analitos (amino ácidos, coenzimas, carbohidratos, nucleósidos, nucleótidos), y macromoléculas biológicas (proteínas, ADN, etc.)

Se han utilizado muchos términos en el campo de la detección fluorescente: sensores fluorescentes, fluorosensores, quimiosensores fluorescentes, sensores fluorescentes moleculares, sensores luminiscentes, biosensores fluorescentes, sensores ópticamente fluorescentes, etc. Es importante remarcar que un sensor sensible (compuesto fluorescente) que indica la presencia de un analito debido a los cambios en sus características fluorescentes de dispositivo de detección óptica, esto es, la fuente de luz,

1.6. Referencias

1. (a) M. Walasek, A. Grzegorzcyk, A. Malm, K. Salicka-Wozniak, Bioactivity guided isolation of antimicrobial coumarins from *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (Apiaceae) fruits by high-performance counter-current chromatography, *Food Chem.* 186 (2015) 133-138; (b) Y.B. Tsassi, H. Hussain, B.Y. Meffo, S.F. Kouam, E. Dongo, B. Schulz, I. Green, K. Krohn, Antimicrobial coumarins from the stem bark of *Afraegle paniculata*, *Nat. Prod. Commun.* 5 (2010) 559-561.
2. (a) K.W. Sashidhara, R.K. Modokuri, S. Singh, K. Bhaskara-Rao, G. Aruna-Tea, S. Gupta, S. Shukla, Design and synthesis of new series of coumarineaminopyran derivatives possessing potential anti-depressant-like activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 337-341; (b) J.C. Capra, M.P. Cunha, D.G. Machado, A.D.-E. Zomkowski, B.G. Mendes, A.R.-S. Santos, M.G. Pizzolati, A.L.-S. Rodrigues, Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems, *Eur. J. Pharmacol.* 643 (2010) 232-238.
3. I. Mitra, A. Saha, K. Roy, Quantification of contributions of different molecular fragments for antioxidant activity of coumarin derivatives based on QSAR analyses, *Can. J. Chem.* 91 (2013) 428-441.
4. J. Grover, S. M. Jachak, Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development, *RSC Adv.* 5 (2015) 38892-38905.

5. F. Oliveira da Lima, F.R. Nonato, R.D. Couto, J.M. Barbosa-Filho, X.P. Nunes, R. Ribeiro dos Santos, M.B.-P. Soares, C.F. Villareal, Mechanisms involved in the antinociceptive effects of 7-hydroxycoumarin, *J. Nat. Prod.* 74 (2011) 596-602.
6. A. Thakur, R. Singla, V. Jaitak, Coumarins as anticancer agents: a review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies, *Eur. J. Med. Chem.* 101 (2015) 476-495.
7. E. Kudo, M. Taura, K. Matsuda, M. Shimamoto, R. Kariya, H. Goto, S. Hattori, S. Kimura, S. Okada, Inhibition of HIV-1 replication by a tricyclic coumarin GUT-70 in acutely and chronically infected cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 606-609.
8. (a) D.K. Singh, M. Nath, Synthesis and photophysical properties of β -triazole bridged porphyrinecoumarin dyads, *RSC Adv.* 5 (2015) 68209-68217; (b) Q. Wu, Z. Liu, D. Cao, R. Guan, K. Wang, Y. Shan, Y. Xu, L. Ma, Coumarin amide derivatives as fluorescence chemosensors for cyanide anions, *Mat. Chem. Phys.* 161 (2015) 43-48; (c) K.S. Hettie, T.E. Glass, Coumarin-3-aldehyde as a scaffold for the design of tunable PET-modulated fluorescent sensors for neurotransmitters, *Chem. Eur. J.* 20 (2014) 17488-17499; (d) J. Wang, M. Li, D. Qi, W. Shen, R. He, S.H. Lin, Exploring photophysical properties of metal-free coumarin sensitizers: an efficient strategy to improve the performance of dye-sensitized solar cells, *RSC Adv.* 4 (2014) 53927-53938; (e) J. Liu, H. Yuan-Qiang, Z. Yingying, N. Hongxing, L. Wang, P. Zhang, D. Song, Y. Shi, W. Guo, Simultaneous fluorescence sensing of Cys and GSH from different emission channels, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 574-577; (f) C.M. Krauter, J. Moehring, T. Buckup, M. Pempointer, M. Motzkus, Ultrafast branching in the excited state of coumarin and umbelliferone, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 17846-17861; (g) D. Frath, A. Poirel, G. Ulrich, A. de Nicola, R. Ziessel, Fluorescent boron(III) iminocoumarins (Boricos), *Chem. Commun.* 49 (2013) 4908-4910.
9. J. Gordo, J. Avo, A.J. Parola, J.C. Lima, A. Pereira, P.S. Branco, Convenient synthesis of 3-vinyl and 3-styryl coumarins, *Org. Lett.* 13 (2011) 5112-5115.
10. H. Zhang, D. M. Rudkevich, A FRET Approach to Phosgene Detection, *Chem. Commun.* (2007) 1238-1239.
11. M. C. DeRosa, D. J. Hodgson, G. D. Enright, B. Dawson, C. E. B. Evans, R. J. Crutchley, Iridium luminophore Complexes for unimolecular oxygen sensors, *J. Am. Chem. Soc.* 126(24) (2004) 7619-7626.

12. M. L. Horng, J. A. Gardeski, A. Papazyan, M. Maroncelli, Subpicosecond measurements of polar solvation dynamics: coumarin 153 revisited, *J. Phys. Chem.* 99(48) (1995) 17311.
13. F. Morlet-Savary, C. Ley, P. Jacques, J. P. Fouasier, *J. Phys. Chem. A.* 105 (2001) 11026.
14. L.J. Zhang, B.-Z. Yin, 7-Diethylamino-2-oxo-2*H*-chromene-3-carbohydrazide, *Acta Cryst.* E67 (2011) o1107.
15. N. Abid-Jarraya, K. Khemakhem, H. Turki-Guermazi, S. Abid, N. Saffon, S. FeryForgues, Solid-state fluorescence properties of small iminocoumarin derivatives and their analogues in the coumarin series, *Dyes Pigm.* 132 (2016) 177-184.
16. B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence, principles and applications*, second edition, Wiley-VCH, Weinheim Germany, (2012)
17. R. P. Haugland, Handbook of fluorescent probes and research chemicals, 9th ed. Molecular Probes Inc, OR, 1996 (477-936).
18. J. R. Lakowicz, Topics in fluorescence spectroscopy plenum press. New York. Vol. 10 Concepts in fluorescence sensing pt. B: Macromolecular Sensing (2005).
19. B. Valeur, Fluorescent probes for evaluation of local physical, structural parameters, in molecular luminescence spectroscopy. Methods and applications: Part 3, S.G. Schulman (Ed.), John Wiley & Sons, Inc., New York, 1993, pp. 109–149.
20. C.E. Kung, J.K. Reed, Fluorescent molecular rotors: a new class of probes for tubulin structure and assembly, *Biochemistry*, 28 (16) (1989) 6678–6686.
21. M. Dakanali, T.H. Do, A. Horn, A. Chongchivivat, T. Jarusreni, D. Lichlyter, G. Guizzunti, M.A. Haidekker, E.A. Theodorakis, Self-calibrating viscosity probes: design and subcellular localization, *Bioorg. Med. Chem.*, 20 (14) (2012) 4443–4450.
22. D. Senyilmaz, S. Virtue, X. Xu, C. Y. Tan, J. L. Griffin, A. K. Miller, A. Vidal-Puig, A. A. Teleman, Regulation of mitochondrial morphology and function by stearylolation of TFR1., *Nature*, 525 (7567) (2015) 124-125.
23. (a) F. Liu, T. Wu, J. Cao, S. Cui, Z. Yang, X. Qiang, S. Sung S., F. Song, J. Fan, J. Wang, X. Peng, Ratiometric detection of viscosity using a two-photon fluorescent sensor, *Chem. Eur. J.*, 19(5) (2013) 1548-1553. (b) Z. V. Varga, P. Ferdinandy, L. Liaudet, P. Pacher, Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity, *Am. J. Physiol. Heart*

- Circ. Physiol.*, 309(9) (2015) 1453-1467. (c) X. Song, N. Li, C. Wang, Y. Xiao, Targetable and fixable rotor for quantifying mitochondrial viscosity of living cells by fluorescence, *J. Mater. Chem. B*, 5 (2017) 360-368
24. R. O. Loutfy, B. A. Arnold, Effect of viscosity and temperature on torsional relaxation of molecular rotors, *J. Phys. Chem.*, 86 (1982) 4205–4211.
25. C. E. Kung, J. K. Reed, Microviscosity measurements of phospholipid bilayers using fluorescent dyes that undergo torsional relaxation, *Biochemistry*, 25(20) (1986) 6114–6121.
26. M. A. Haidekker, T. Ling, M. Anglo, H. Y. Stevens, J. A. Frangos, E. A. Theodorakis, New fluorescent probes for the measurement of cell membrane viscosity, *Chem. Biol.*, 8(2) (2001) 123–131.
27. M. A. Haidekker, T. Brady, K. Wen, C. Okada, H. Y. Stevens, J. M. Snell, J. A. Frangos, E. A. Theodorakis, Phospholipid-bound molecular rotors: synthesis and characterization, *Bioorg. Med. Chem.*, 10 (2002), 3627–3636.
28. J. Sutharsan, D. Lichlyter, N. E. Wright, M. Dakanali, M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, Molecular rotors: Synthesis and evaluation as viscosity sensors, *Tetrahedron*, 66(14) (2010) 2582–2588.
29. F. Zhou, J. Shao, Y. Yang, J. Zhao, H. Guo, X. Li, S. Ji, Z. Zhang, Molecular rotors as fluorescent viscosity sensors: Molecular design, polarity sensitivity, dipole moments changes, screening solvents, and deactivation channel of the excited states, *Eur. J. Org. Chem.*, (2011) 4773–4787.
30. M. A. H. Alamiry, A. C. Benniston, G. Copley, K. J. Elliott, A. Harriman, B. Stewart, Y. G. Zhi, A molecular rotor based on an unhindered boron dipyrromethene (bodipy) dye, *Chem. Mater.*, 20(12) (2008) 4024–4032.
31. A. C. Benniston, A. Harriman, V. L. Whittle and M. Zelzer, Molecular rotors based on the boron dipyrromethene fluorophore, *Eur. J. Org. Chem.*, 3 (2010) 523–530.
32. S. C. Lee, J. Heo, J. W. Ryu, C. L. Lee, S. Kim, J. S. Tae, B. O. Rhee, S. W. Kima, O. P. Kwon, Pyrrolic molecular rotors acting as viscosity sensors with high fluorescent contrast, *Chem. Commun.*, 52 (2016) 13695-13698.
33. K. Luby-Phelps, S. Mujumdar, R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, W. Galbraith, A. S. Waggoner, *Biophys. J.*, 65 (1993) 236-242.

34. B. Wandelt, P. Cywinski, G. D. Darling, B. R. Stranix, Single cell measurement of micro-viscosity by ratio imaging of fluorescence of styrylpyridinium probe, *Biosens. Bioelectron.*, 20(9) (2005) 1728–1736.
35. M. A. Haidekker, T. P. Brady, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis, A ratiometric fluorescent viscosity sensor, *J. Am. Chem. Soc.*, 128(2) (2006) 398–399.
36. D. Fischer, E. A. Theodorakis, M. A. Haidekker, Synthesis and use of an in-solution ratiometric fluorescent viscosity sensor, *Nat. Protoc.*, 2(1) (2007) 227–236.
37. M. E. Nipper, M. Dakanali, E. Theodorakis, M. A. Haidekker, Detection of liposome membrane viscosity perturbations with ratiometric molecular rotors, *Biochimie*, 93(6) (2011) 988–994.
38. M. K. Kuimova, S. W. Botchway, A. W. Parker, M. Balaz, H. A. Collins, H. L. Anderson, K. Suhling, P. R. Ogilby, Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death, *Nat. Chem.*, 1 (2009) 69–73.
39. M. K. Kuimova, G. Yahiolu, J. A. Levitt, K. Suhling, Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 130(21) (2008) 6672–6673.
40. J. A. Levitt, M. K. Kuimova, G. Yahiolu, P.-H. Chung, K. Suhling, D. Phillips, Membrane-bound molecular rotors measure viscosity in live cells via fluorescence lifetime imaging, *J. Phys. Chem. C*, 113(27) (2009) 11634–11642.
41. N. A. Hosny, G. Mohamedi, P. Rademeyer, J. Owen, Y. Wu, M.-X. Tang, R. J. Eckersley, E. Stride, M. K. Kuimova, Mapping microbubble viscosity using fluorescence lifetime imaging of molecular rotors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110 (2013) 9225–9230.
42. X. Peng, Z. Yang, J. Wang, J. Fan, Y. He, F. Song, B. Wang, S. Sun, J. Qu, J. Qi, M. Yan, Fluorescence ratiometry and fluorescence lifetime imaging: Using a single molecular sensor for dual mode imaging of cellular viscosity, *J. Am. Chem. Soc.*, 133(11) (2011) 6626–6635.
43. F. Liu, T. Wu, J. Cao, S. Cui, Z. Yang, X. Qiang, S. Sun, F. Song, J. Fan, J. Wang, X. Peng, Ratiometric detection of viscosity using a two-photon fluorescent sensor, *Chem. – Eur. J.*, 19(5) (2013) 1548–1553.

44. E. Gatzogiannis, Z. Chen, L. Wei, R. Wombacher, Y.-T. Kao, G. Yefremov, V. W. Cornish, W. Min, Mapping protein-specific micro-environments in live cells by fluorescence lifetime imaging of a hybrid genetic-chemical molecular rotor tag, *Chem. Commun.*, 48 (2012) 8694–8696.
45. L. Wang, Y. Xiao, W. Tian, L. Deng, Activatable rotor for quantifying lysosomal viscosity in living cells, *J. Am. Chem. Soc.*, 135 (2013) 2903–2906.
46. Z. Yang, Y. He, J. H. Lee, N. Park, M. Suh, W. S. Chae, J. Cao, X. Peng, H. Jung, C. Kang, J. S. Kim, A self-calibrating bipartite viscosity sensor for mitochondria, *J. Am. Chem. Soc.*, 135 (2013) 9181–9185.
47. M. Zhao, Y. Zhu, J. Su, Q. Geng, X. Tian, J. Zhang, H. Zhou, S. Zhang, J. Wua, Y. Tian, A water soluble two photon fluorescence chemosensor for ratiometric imaging of mitochondrial viscosity in living cells, *J. Mater. Chem. B*, 4 (2016) 5907.
48. T. Matsumoto, H. Takamine, K. Tanaka, Y. Chujo, Design of bond cleavage induced intramolecular charge transfer emission with dibenzoboroles and their application to ratiometric sensors for discriminating chain lengths of alkanes, *Mater. Chem. Front.*, 1 (2017) 2368-2375.

CAPÍTULO 2

DERIVADOS DE CUMARINA-BODIPY UTILIZADOS COMO SONDAS FLUORESCENTES DE MICROVISCOSIDAD.

2.1. Introducción

El monitoreo del estatus físico en células usando sondas fluorescentes que sean capaces de medir la viscosidad intracelular es una herramienta prometedora para el diagnóstico de varias enfermedades, por ejemplo, diabetes, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y diferentes tipos de cáncer. Por lo que es importante desarrollar compuestos con alta sensibilidad hacia pequeños cambios de viscosidad.¹

Para la medición de la viscosidad intracelular se han utilizado rotores fluorescentes duales que constan de un grupo electrodonador y uno electroattractor unidos mediante un grupo espaciador que rota libremente y que es capaz de extinguir la fluorescencia en ambientes de baja viscosidad y de mejorarla en medios viscosos.² En este sentido, los sistemas cumarina-bodipy constituyen una familia prometedora e interesante de compuestos con excelentes propiedades fotofísicas, que además de presentar desplazamientos de Stokes y amplios coeficientes de absorción y de emisión que se pueden modular, la separación de sus bandas de emisión permite una buena respuesta λ -ratiométrica. Mientras que las mediciones de microviscosidad en células vivas y/u organelos específicos han sido descritas previamente, la sensibilidad analítica de los rotores moleculares permanece pobremente caracterizada. La mayoría de los trabajos hacen énfasis en la sensibilidad instrumental, tiempo de respuesta, y en la naturaleza de la respuesta óptica.³ Sin embargo, esas sondas no han sido cuidadosamente diseñadas y evaluadas para pequeñas variaciones de microviscosidad que comprenden un factor crucial que determina la sensibilidad analítica intrínseca de la sonda. De hecho, muchos de los trabajos describen una calibración típica del fluoróforo con cambios extremadamente grandes en viscosidad que no ocurren en muestras biológicas reales.⁴

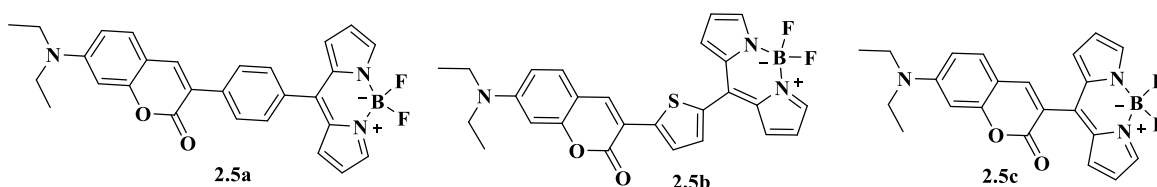
Por otro lado, el monitoreo de pequeñas variaciones de microviscosidad es una tarea desafiante, ya que la sonda necesita dar una respuesta fluorescente con variaciones de solo 0.1 cP. Las pequeñas variaciones de microviscosidad pueden ser logradas por una perturbación externa tal como la temperatura, presión, y por la adición de agentes químicos o fármacos que inducen el malfuncionamiento celular causado por cambios estructurales o hinchamiento.⁵

2.2. Objetivos

Sintetizar y caracterizar mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas una nueva familia de rotores moleculares fluorescentes duales cumarina-bodipy que contienen un grupo conector entre ambos fluoróforos: fenileno (**2.5a**), tiofenileno (**2.5b**) y sin conector (**2.5c**).

Evaluar la dinámica rotacional mediante técnicas de anisotropía fluorescente, análisis estructural de rayos X y cálculos cuánticos de la excitación electrónica por medio de orbitales naturales de transición (NTO).

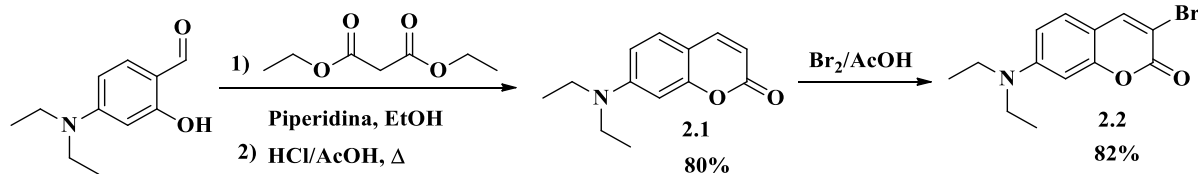
Mejorar la sensibilidad de las sondas fluorescentes en pequeños intervalos de viscosidad (variaciones de 0.1-0.01 cP) para poder determinar el estatus celular.



2.3. Resultados y discusión.

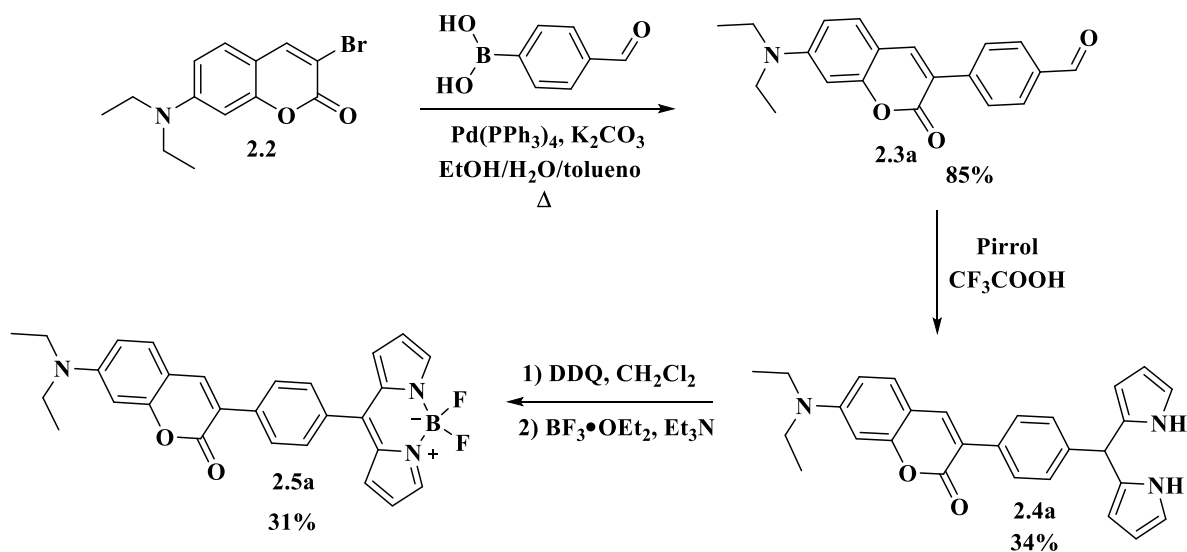
2.3.1. Síntesis

Los compuestos *meso*-(4-(7-(dietilamino)-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)fen-1-il)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno (**2.5a**), *meso*-(5-(7-(dietilamino)-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)tiofen-2-il)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno (**2.5b**) y *meso*-(7-(dietilamino)-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno (**2.5c**) fueron obtenidos como se describe en los esquemas 2.1-2.5. El compuesto **2.1** fue obtenido a través de una reacción de condensación de Knoevenagel entre el 4-(dietilamino)salicilaldehído y malonato de dietilo en etanol bajo condiciones de reflujo, se utilizó piperidina como base. Posteriormente se efectuaron las reacciones de hidrólisis y descarboxilación bajo condiciones fuertemente ácidas utilizando una mezcla de HCl y ácido acético a reflujo que permiten la obtención del compuesto **2.1** (80%). El cual se bromó en la posición tres, empleando bromo en ácido acético, obteniendo el compuesto **2.2** (82%) (Esquema 2.1).

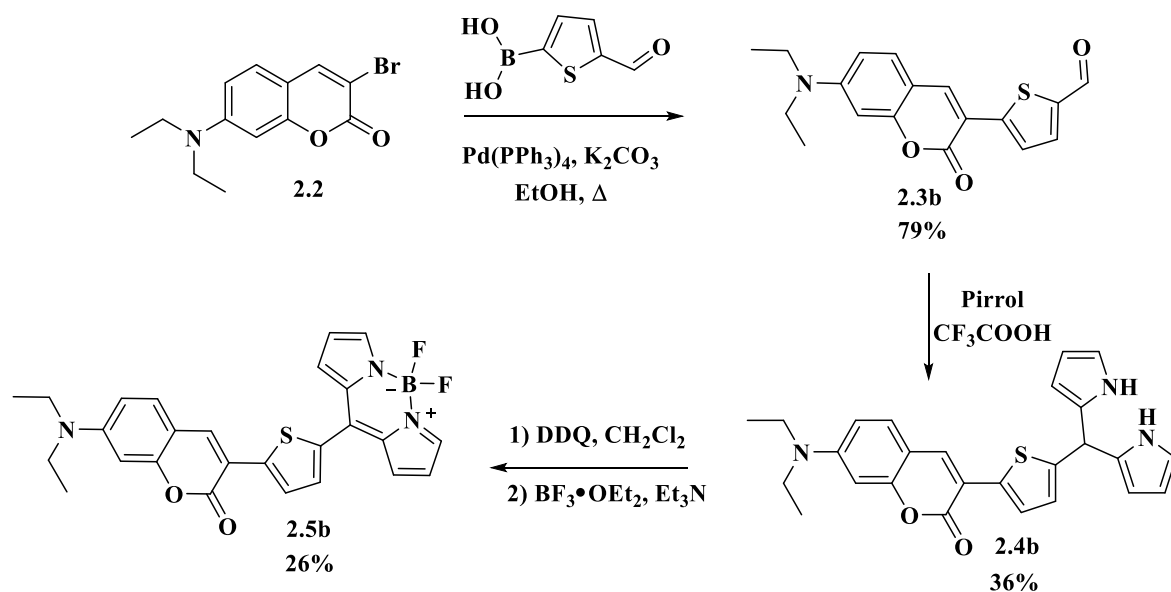


Esquema 2.1. Síntesis del compuesto **2.2**.

El compuesto **2.2** se sometió a una reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura utilizando como sustratos el ácido 4-formilfenilborónico y el ácido 4-formiltien-2-ilborónico obteniéndose los compuestos **2.3a** (85%) y **2.3b** (79%), respectivamente. Con la finalidad de obtener los compuestos **2.4a** y **2.4b**, los compuestos **2.3a** y **2.3b** se disolvieron en diclorometano anhidro, utilizando un exceso de pirrol y ácido trifluoroacético, la purificación de la mezcla de reacción conduce a los derivados de dipirrometano **2.4a** (34%) y **2.4b** (36%). Estos compuestos se oxidaron con DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona) y se complejaron con BF₃•OEt₂ usando trietilamina como base, obteniéndose los compuestos **2.5a** (31%) y **2.5b** (26%) (Esquemas 2.2 y 2.3).



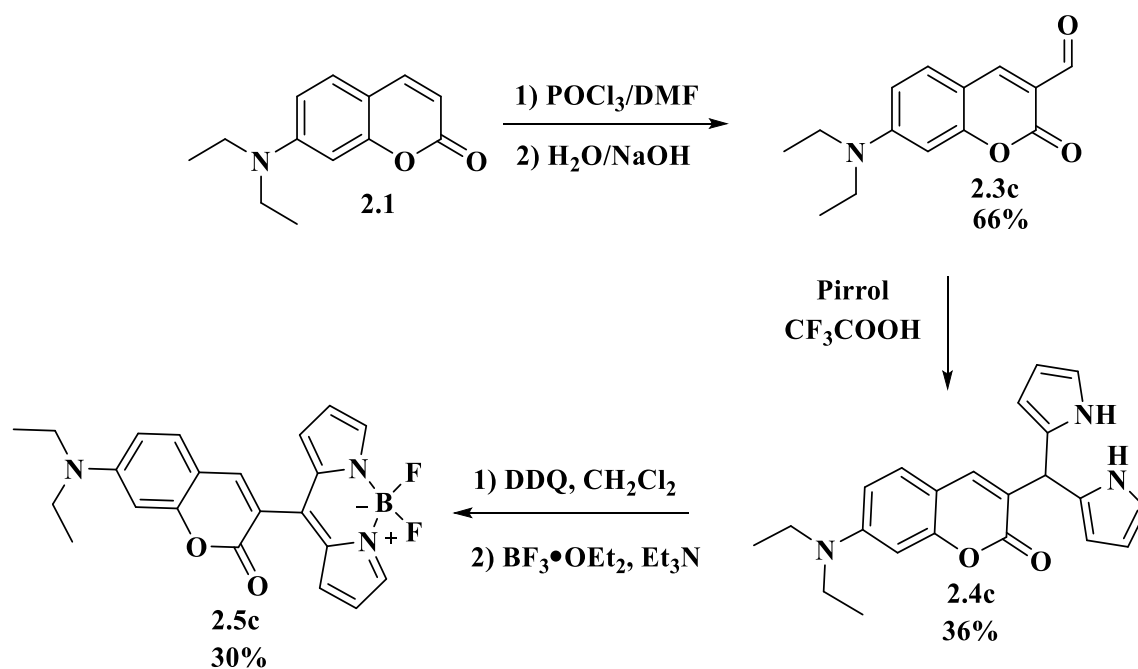
Esquema 2.2. Síntesis del compuesto **2.5a**.



Esquema 3. Síntesis del compuesto **2.5b**.

Para obtener el compuesto **2.5c**, se llevó a cabo una reacción de formilación de Vilsmeier-Haack sobre el compuesto **2.1** usando POCl_3 y DMF anhidra obteniéndose el compuesto **2.3c** (66%). Una subsecuente reacción de condensación con exceso de pirrol y ácido trifluoroacético permite la obtención del compuesto **2.4c** (36%) que al ser oxidado con

DDQ seguido de la reacción de complejación con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ se obtiene el compuesto **2.5c** (30%) (Esquema 2.4).



Esquema 4. Síntesis del compuesto **2.5c**.

Todos los compuestos se caracterizaron por técnicas espectroscópicas de IR, RMN ^1H y ^{13}C , de absorción, de emisión fluorescente y espectrometría de masas. Los compuestos **2.5a-2.5c** fueron caracterizados además por RMN ^{11}B y ^{19}F .

2.3.2. Caracterización mediante espectroscopía de RMN de los compuestos **2.5a-2.5c**.

A continuación, se analizarán los espectros de RMN de ^1H , ^{19}F , ^{11}B , así como los espectros bidimensionales HMBC de los compuestos finales **2.5a-2.5c** con la finalidad de explicar los desplazamientos químicos comunes, así como los desplazamientos particulares, dependiendo del grupo espaciador unido a la posición 3 del núcleo de cumarina.

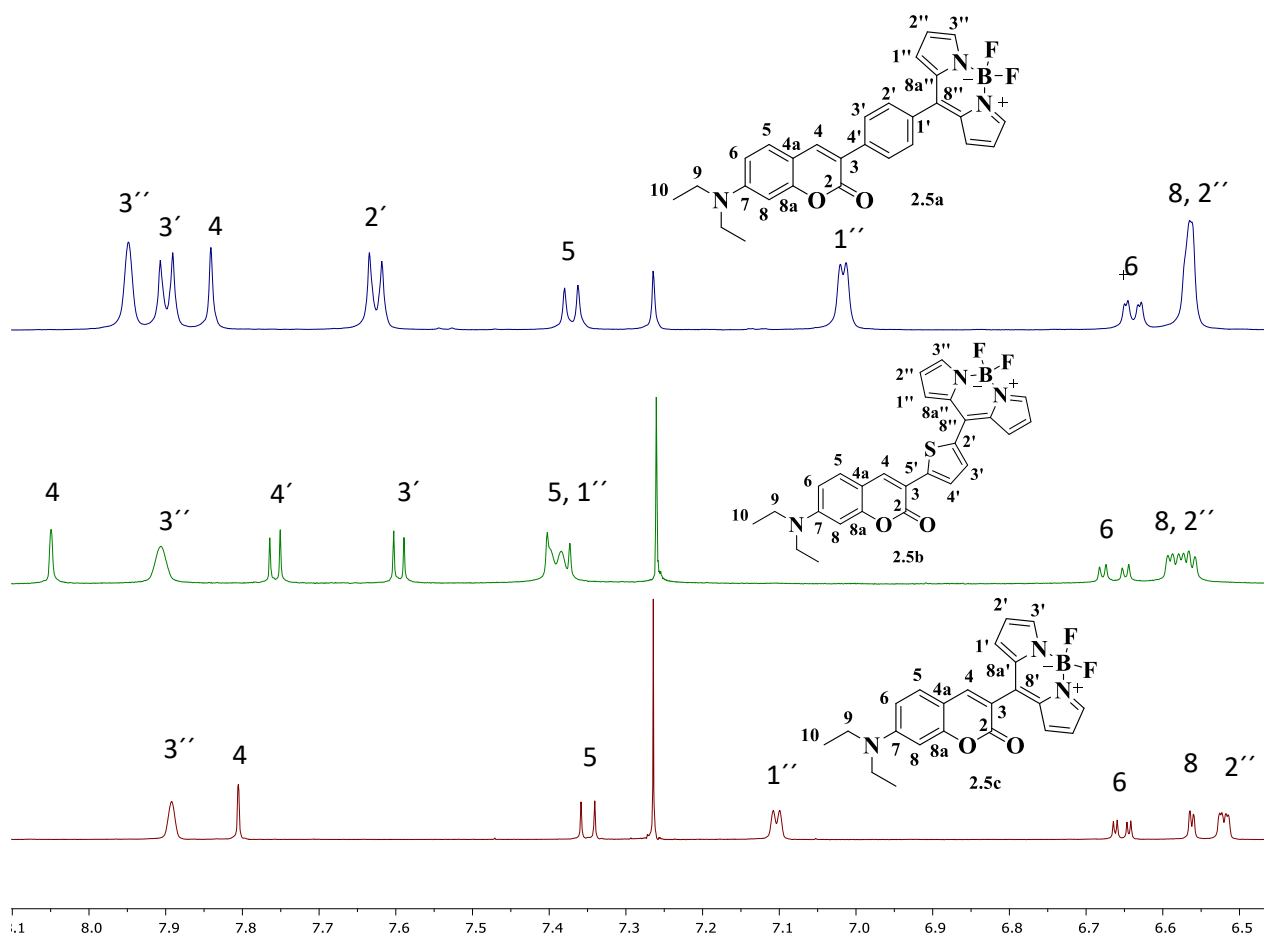


Figura 2.1. Espectros de RMN ^1H de los compuestos **2.5a** (500 MHz), **2.5b** (300 MHz) y **2.5c** (500 MHz) en CDCl_3 .

En la figura 2.1 se presentan los espectros de RMN ^1H de los productos **2.5a-2.5c**. Se observan las señales del hidrógeno H-3'' a 7.95 ppm para **2.5a**, 7.91 ppm para **2.5b** y 7.89 ppm para **2.5c** correspondiente al núcleo de bodipy como señales anchas. También se aprecian las otras dos señales de los hidrógenos H-1'' y H-2'' del núcleo del bodipy. En el caso del compuesto **2.5a**, se observan dos señales dobles del sistema AA'BB' pertenecientes a los hidrógenos 3' (7.90 ppm) y 2' (7.63 ppm) que presentan una constante de acoplamiento de $J = 8.2$ Hz. Mientras que para **2.5b**, se observan las dos señales dobles del sistema AB pertenecientes a los hidrógenos 4' (7.76 ppm) y 3' (7.59 ppm) que presentan una constante de acoplamiento de $J = 4.1$ Hz. Con respecto a las señales de los hidrógenos del núcleo de la cumarina, se observa la señal simple del hidrógeno vinílico H-4 a 7.84 ppm para **2.5a**, 8.05 ppm para **2.5b** y 7.81 ppm para **2.5c**. También se observa la

señal doble del hidrógeno H-5, en el caso de **2.5b** la señal se traslapa con la del hidrógeno H-1'', la señal del hidrógeno H-6 se desdobra con una multiplicidad de doble de dobles debido a que se encuentra acoplado con el hidrógeno H-8 con una constante de acoplamiento de $J = 8.8$ Hz con H-5 para el compuesto **2.5a** y de $J = 8.9$ Hz para **2.5b** y **2.5c** y con el hidrógeno H-8 con una constante de acoplamiento de $J = 2.2$ Hz para **2.5a** y de $J = 2.5$ Hz para **2.5b** y **2.5c**.

Para confirmar la presencia de boro y flúor en las estructuras, se obtuvieron los espectros de RMN de ^{11}B y ^{19}F (Figuras 2.2 y 2.3)

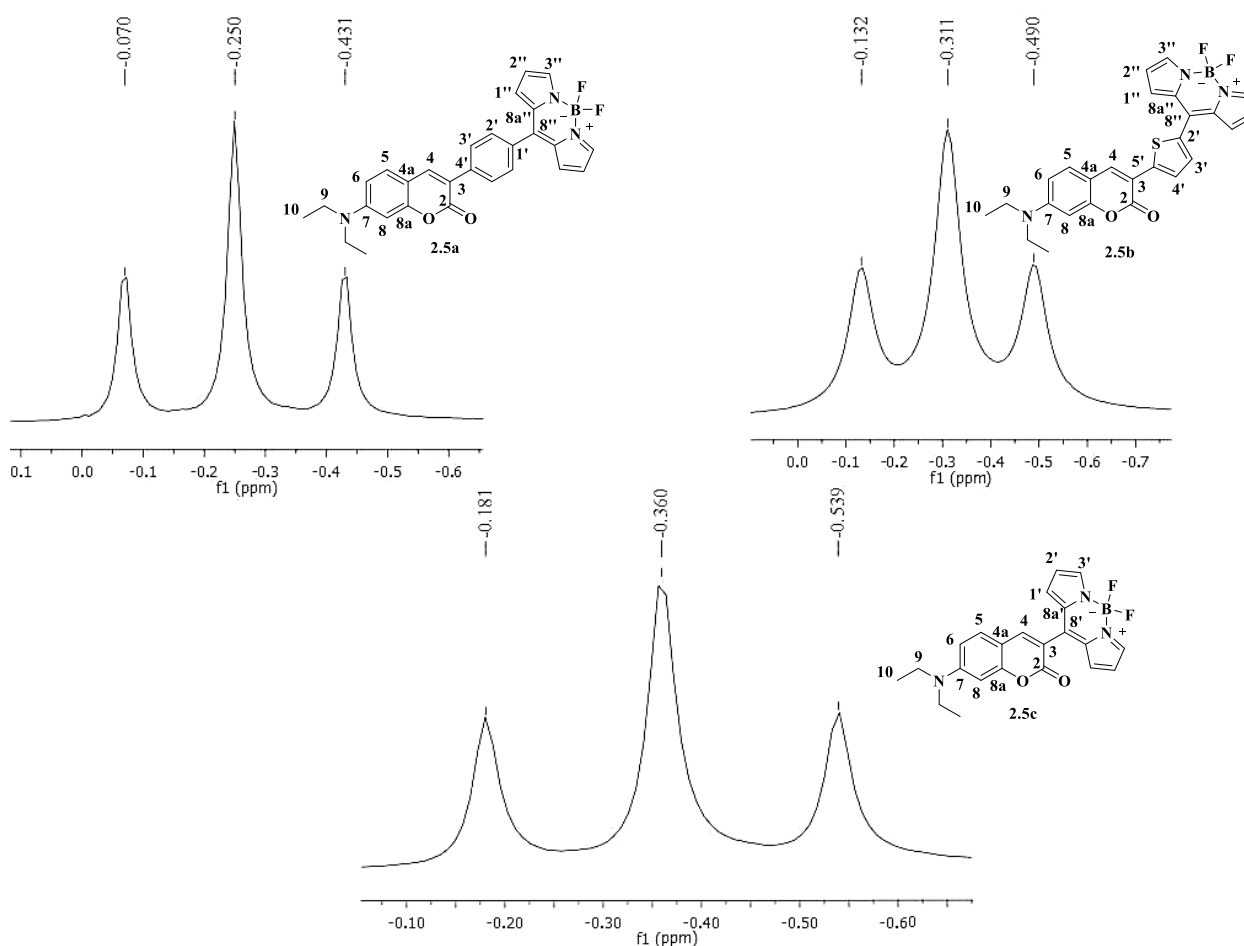


Figura 2.2. Espectros de RMN ^{11}B para los compuestos **2.5a-2.5c** (160.4 MHz) en CDCl_3 .

En la figura 2.2 se muestran los espectros de RMN ^{11}B para los compuestos **2.5a-2.5c**, en cada espectro se observa una señal triple a -0.25 Hz para **2.5a**, -0.31 Hz para **2.5b** y -0.36 Hz para **2.5c** con una constante de acoplamiento para los tres compuestos de $J_{\text{B-F}} = 28.8$ Hz.

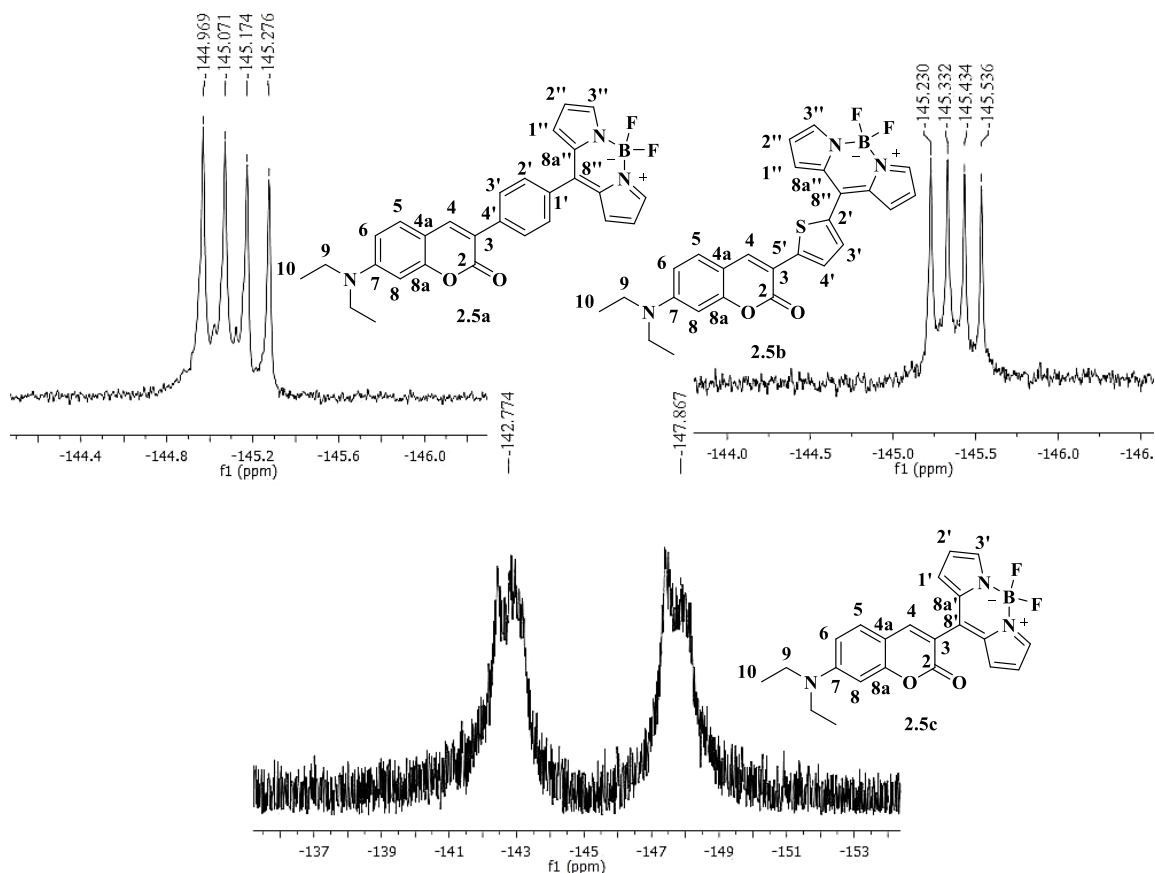


Figura 2.3. Espectros de RMN ^{19}F para los compuestos **2.5a-2.5c** (282.4 MHz) en CDCl_3 .

En la figura 3 se muestran los espectros de RMN ^{19}F para los compuestos **2.5a-2.5c**. Se observa una señal cuadruple a -145.12 ppm para **2.5a** y a -142.77 ppm para **2.5b** con una constante de acoplamiento para ambos compuestos de $J_{\text{B-F}} = 28.8$ Hz. El cuarteto observado, se debe a que los dos átomos de ^{19}F son magnéticamente equivalentes y se encuentran acoplados a un núcleo de ^{11}B que tiene un espín nuclear de $3/2$.

En el caso del compuesto **2.5c**, se observan dos señales cuádruples a -147.87 ppm y a -142.77 ppm, las cuales nos indican que los dos átomos de flúor no son magnéticamente

equivalentes debido a la rotación restringida a través del enlace σ que conecta a los núcleos de bodipy-cumarina.

Se utilizó el espectro heteronuclear de dos dimensiones HMBC (heteronuclear Multiple Bond Correlation) con la finalidad de estudiar los acoplamientos carbono e hidrógeno de 2 a 4 enlaces de distancia y asignar de manera correcta cada una de las señales de ambos núcleos. (Figuras 2.4-2.6)

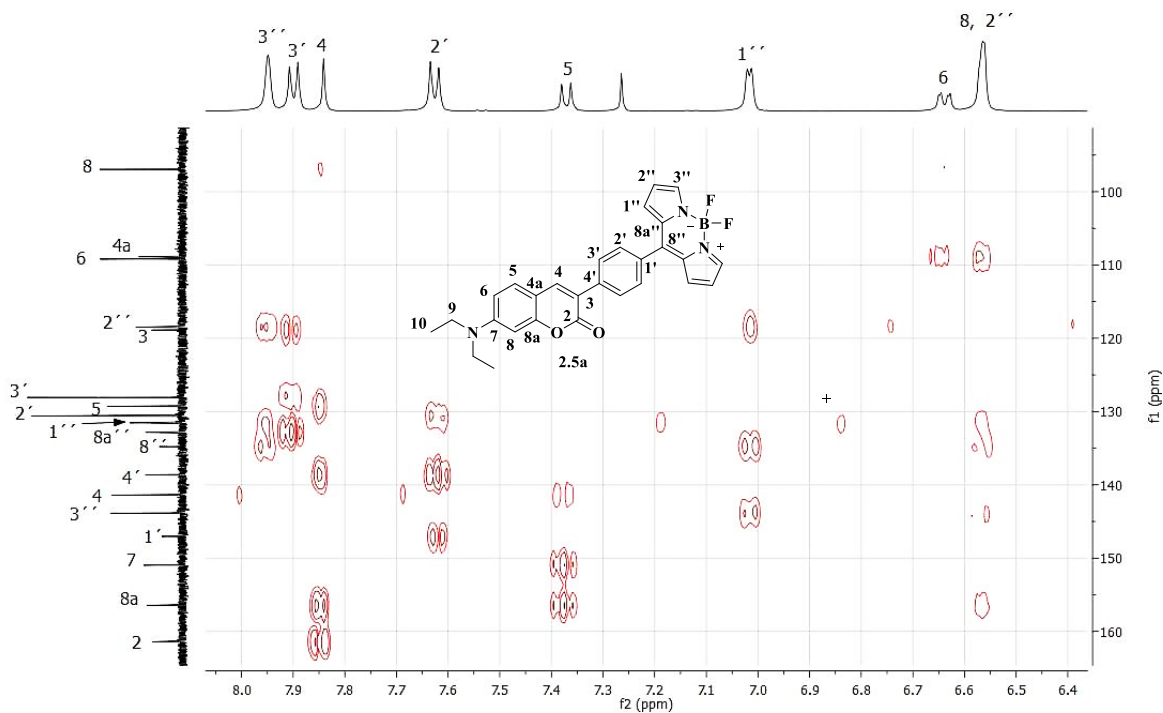


Figura 2.4. Espectro HMBC del compuesto **2.5a** en CDCl_3 .

En la figura 2.4 se presenta el espectro de HMBC del compuesto **2.5a**, con este espectro se pudieron identificar los hidrógenos y carbonos $2'$ y $3'$, ya que $\text{H-}2'$ se encuentra acoplado con el carbono $\text{C-}1'$ a dos enlaces, y con el carbono $\text{C-}8a''$ a cuatro enlaces, mientras que el hidrógeno $\text{H-}3'$ se acopla con el carbono $\text{C-}3$ a tres enlaces.

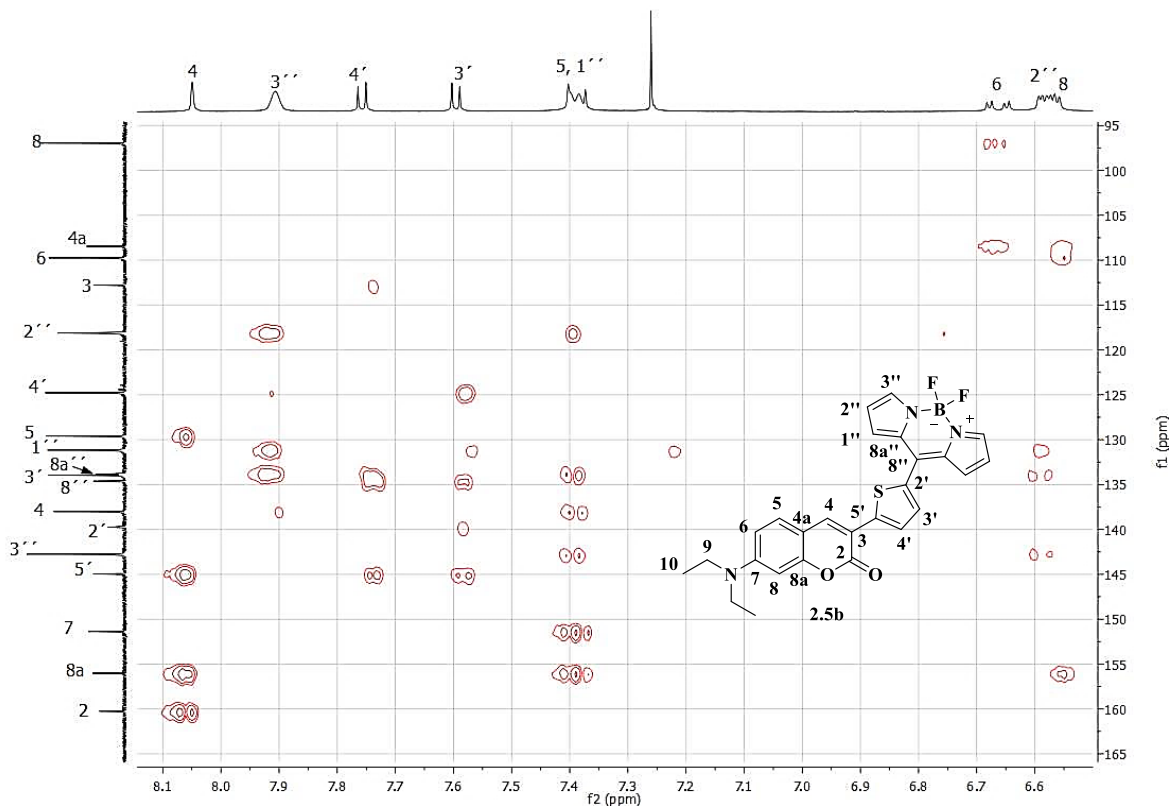


Figura 2.5. Espectro HMBC del compuesto **2.5b** en CDCl_3 .

En el espectro HMBC del compuesto **2.5b** que se muestra en la figura 2.5, con este espectro se lograron identificar los hidrógenos y carbonos 3' y 4' del sistema AB. En el espectro se puede observar que los hidrógenos H-3' y H-4' se acoplan a un enlace con su respectivo carbono C-3' y C-4'; además el hidrógeno H-4' se acopla a dos enlaces con el carbono C-5' y con el carbono C-3 a tres enlaces, así como el hidrógeno H-3' se acopla con el carbono C-2' a dos enlaces.

En la figura 2.6 se muestra el espectro HMBC para el compuesto **2.5c**. Se puede observar que el hidrógeno H-4 del núcleo de cumarina que se encuentra acoplado con los carbonos C-8', C-8a, C-5 y C-2 a 3 enlaces, así como el hidrógeno H-1' del núcleo de bodipy que se encuentra acoplado con el carbono C-3' a tres enlaces y con los hidrógenos C-8a' y C-2' a dos enlaces.

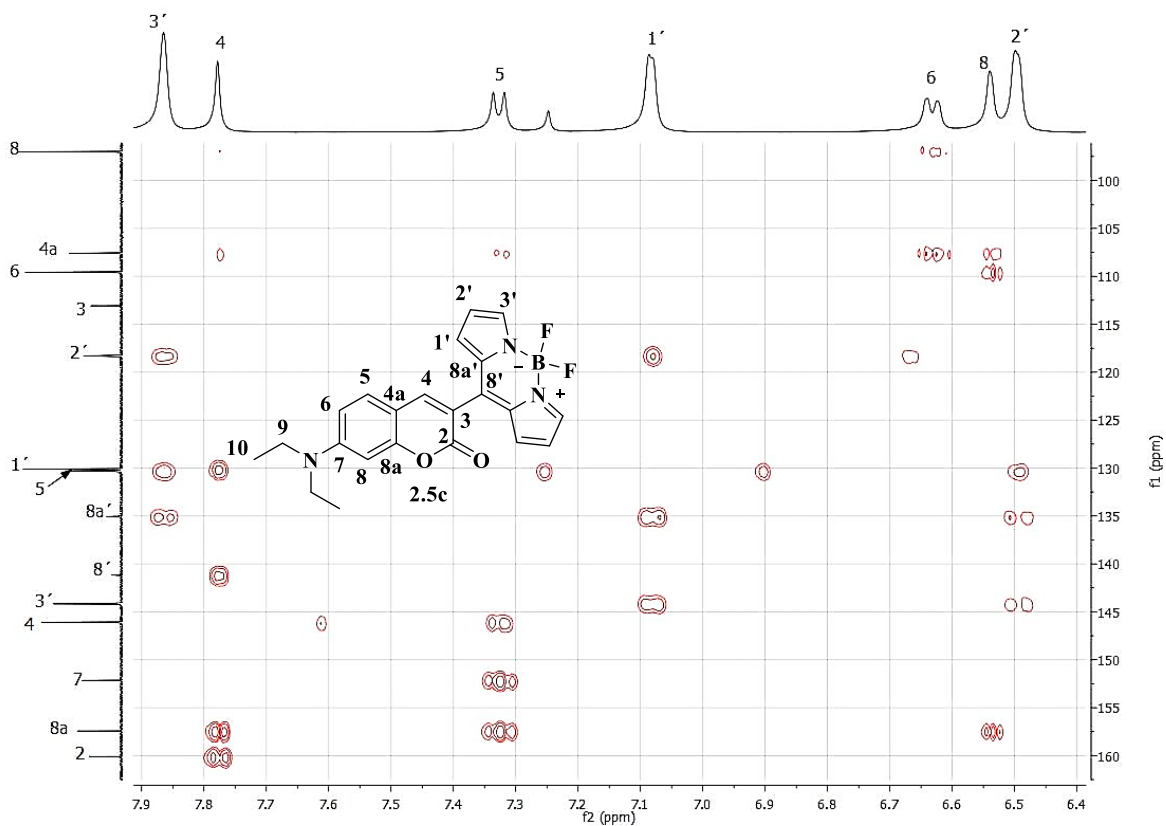


Figura 2.6. Espectro HMBC del compuesto **2.5c** en CDCl_3 .

2.3.3. Estudio por difracción de Rayos X.

Se lograron obtener cristales adecuados para difracción de rayos X, para los tres compuestos **2.5a-2.5c**, utilizando como sistema de cristalización una mezcla de disolventes cloroformo/tolueno. En la tabla 2.1 se muestran los datos cristalográficos de los tres compuestos. Los estudios de rayos X de monocristal muestran que los compuestos **2.5a**, **2.5b** y **2.5c** cristalizan en sistemas monoclinicos con grupos espaciales $P2_1/n$, $C2/c$ y $P2_1/c$ respectivamente, con dos moléculas por celda unitaria para el compuesto **2.5a**, ocho moléculas para el compuesto **2.5b** y dos moléculas para el compuesto **2.5c**.

Código de identificación	2.5a	2.5b	2.5c
Fórmula empírica	C ₂₉ H ₂₄ B F ₂ N ₂ O ₂	C ₂₆ H ₂₂ B F ₂ N ₃ O ₂ S	C ₅₁ H ₄₇ B ₂ F ₄ N ₆ O ₄
Masa de formula empírica	481.31	489.33	905.56
Temperatura	130(2) K	130(2) K	130(2) K
Longitud de onda	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P 2 ₁ /n	C 2/c	P 2 ₁ /c
Dimensiones de celda unitaria	a = 17.5876(13) Å b = 6.5658(5) Å c = 19.7675(17) Å β = 90.838(7)°.	a = 21.4049(12) Å b = 6.7587(3) Å c = 31.0397(16) Å β = 92.034(5)°.	a = 10.7015(4) Å b = 23.1896(8) Å c = 9.1926(4) Å β = 99.183(4)°.
Volumen	2282.4(3) Å ³	4487.7(4) Å ³	2252.03(15) Å ³
Z	4	8	2
Densidad (calculado)	1.401 Mg/m ³	1.449 Mg/m ³	1.335 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0.099 mm ⁻¹	0.192 mm ⁻¹	0.096 mm ⁻¹
F(000)	1004	2032	946
Tamaño del cristal	0.380 x 0.110 x 0.040 mm ³	0.550 x 0.160 x 0.110 mm ³	0.390 x 0.180 x 0.070 mm ³
Intervalo Theta para datos	3.464 a 25.345°	3.299 a 29.003°	3.462 a 29.463°
Intevalo de índices	-20 ≤ h ≤ 21, -7 ≤ k ≤ 6, -23 ≤ l ≤ 23	-28 ≤ h ≤ 26, -9 ≤ k ≤ 8, -38 ≤ l ≤ 40	-14 ≤ h ≤ 14, -29 ≤ k ≤ 30, -12 ≤ l ≤ 12

Tabla 6.1. Datos cristalográficos para los compuestos **2.5a**, **2.5b** y **2.5c**.

En el compuesto **2.5a**, el ángulo de torsión fenilo-cumarina es de 51.31 ° con una distancia de enlace que conecta a esos fragmentos de 1.475 Å; mientras que el ángulo formado entre los planos cumarina-bodipy es de 14.32 °. La unidad asimétrica del compuesto **2.5b** está formada por una molécula cumarina-tiofenileno-bodipy, mientras que la estructura del compuesto **2.5c** consiste en una molécula cumarina-bodipy. (Figuras 2.7-2.9).

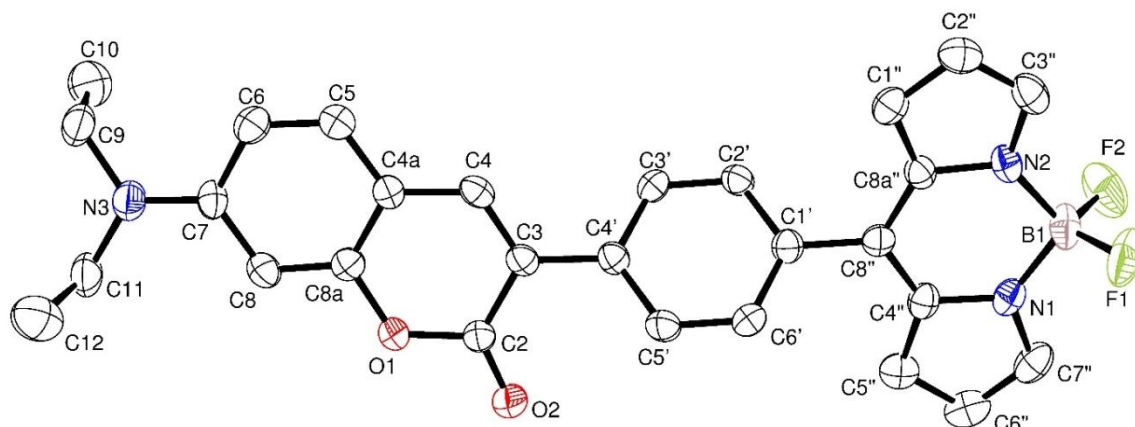


Figura 2.7. Diagrama Mercury de **2.5a** con un nivel de probabilidad del 60%. Distancias de enlace (Å): C(8a)-C(8) 1.368(3), C(8a)-O(1) 1.384(3), C(7)-N(3) 1.363(3), C(2)-O(2) 1.211(3), C(3)-C(4') 1.476(3), C(8'')-C(1') 1.475(3), B(1)-F(1) 1.387(4), B(1)-N(1) 1.543(4); Ángulos de torsión (°): C(4)-C(3)-C(4')-C(3') -35.4(3), C(4)-C(3)/C(8'')-C(8a'') 14.4(3), C(2)-C(3)-C(8'')-C(4'') 13.7(3), C(8a'')-C(8'')-C(1')-C(2') 51.2(3); Ángulos entre planos (°): Cumarina-bodipy 14.32(5), cumarina-fenileno 36.99(4), fenileno-bodipy 51.31(4).

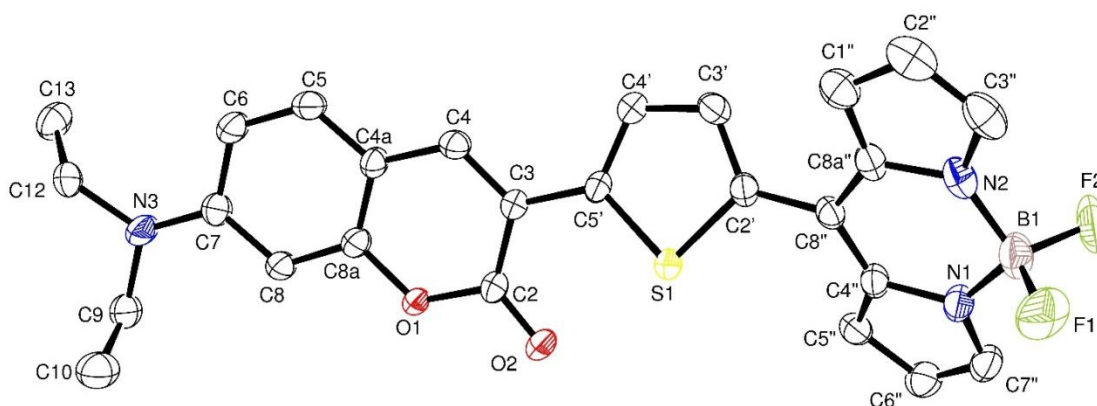


Figura 2.8. Diagrama Mercury de **2.5b** con un nivel de probabilidad de 60%. Distancias de enlace (Å): C(8a)-C(8) 1.368(3), C(8a)-O(1) 1.376(3), C(7)-N(3) 1.357(3), C(2)-O(2) 1.209(3), C(3)-C(5') 1.458(3), C(8'')-C(2') 1.454(3), B(1)-F(1) 1.389(3), B(1)-N(1) 1.538(4), C(5')-S(1) 1.726(3); Ángulos de torsión (°): C(4)-C(3)-C(5')-C(4') -14.7(4), C(4)-C(3)/C(8'')-C(8a'') 24.9(3), C(2)-C(3)/C(8'')-C(4'') 24.8(2), C(8a'')-C(8'')-C(2')-C(3') 41.0(4); Ángulos entre planos (°): Cumarina-bodipy 30.94(6), cumarina-tiofenileno 30.94(6).

19.34(9), tiofenileno-bodipy 42.24(6).

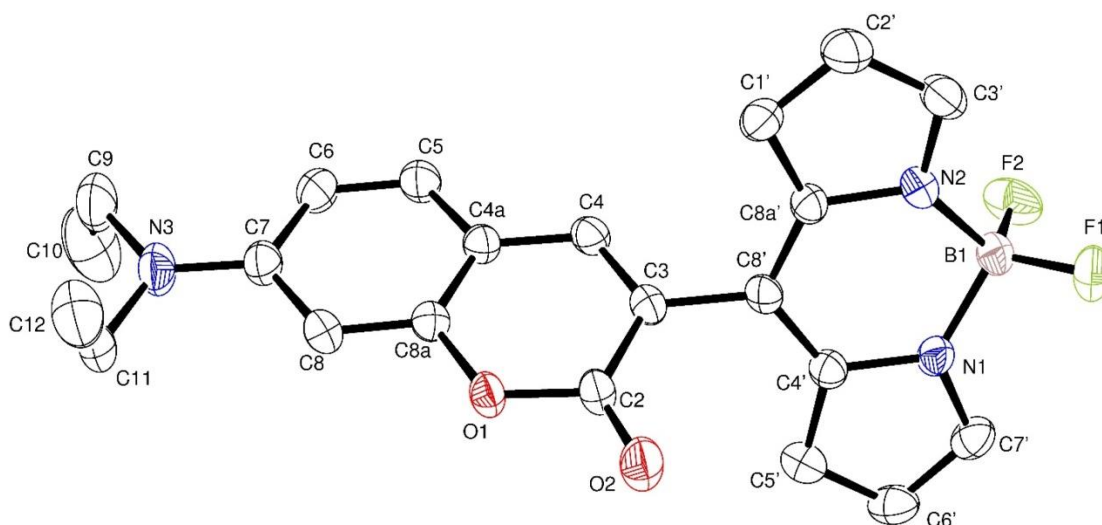


Figura 2.9. Diagrama Mercury de **2.5c** con un nivel de probabilidad del 60%. Distancias de enlace (Å): C(8a)-C(8) 1.369(2), C(8a)-O(1) 1.376(2), C(7)-N(3) 1.360(2), C(2)-O(2) 1.206(2), C(3)-C(8') 1.478(2), B(1)-F(1) 1.378(2), B(1)-N(1) 1.545(2); Ángulos de torsión (°): C(4)-C(3)-C(8')-C(4') 63.7(2), C(2)-C(3)-C(8')-C(8a') 66.1(2); Ángulos entre planos (°): Cumarina-bodipy 68.45(3).

Los ángulos de torsión entre los planos de cumarina-bodipy **2.5a** (14.32 °), **2.5b** (30.94 °) y **2.5c** (68.45 °), muestran que entre más grande sea el espaciador entre el sistema cumarina-bodipy se crea una tendencia fuerte a la planaridad, facilitando de esta manera la dinámica rotacional.

2.3.4. Índice de extensión espacial en excitaciones de transferencia de carga.

En el compuesto **2.5b**, la introducción de un grupo tiofenileno puede inducir una polarización en la distribución electrónica, esto conduce a una estructura en forma de V que disminuye significativamente la transferencia de carga intramolecular.⁶ De hecho, un análisis cuidadoso mediante los parámetros de excitación de transferencia de carga, el llamado índice de extensión espacial,⁷ revela que la fracción de carga electrónica

transferida bajo des excitación del estado local excitado (LE) de la sonda **2.5a** es de $q_{CT} = 0.85$ y una distancia espacial $D_{CT} = 9.16 \text{ \AA}$ del centroide donador al centroide aceptor. Esta distribución de electrones corresponde a una diferencia del momento dipolar de 27.6 D. El índice H definido como la mitad de la suma del eje centroide a lo largo de la dirección donador-aceptor es de 2.35, este valor resulta ser 4.47 \AA más bajo que la longitud de excitación de transferencia de carga, esto significa que no existe traslape entre los centroides donador-aceptor, permitiendo una alta eficiencia en el proceso de transferencia de carga. En el caso de las sondas fluorescentes **2.5b** y **2.5c**, se obtuvieron valores de q_{CT} de 0.69 y 0.84 y distancias espaciales de 6.81 \AA y 5.47 \AA respectivamente, conduciendo a valores de índice H de 2.92 y 1.97, esto significa que hay un mayor traslape (0.96 \AA y 1.53 \AA más bajos que la longitud de excitación de transferencia de carga).

Una importante supresión de la interferencia por la polaridad del disolvente es promovida.⁸ De manera similar, la sonda **2.5c** experimenta una disrupción importante en las interacciones de transferencia de carga intramolecular debido a la conformación torcida que la sonda adopta en su eje longitudinal. Sin embargo, como se muestra en la sección de cálculos teóricos, se puede observar que de acuerdo con los orbitales naturales de transición HONTO-LUNTO, la distribución electrónica para el compuesto **2.5c** se extiende casi sobre la misma región, en donde en general el núcleo de bodipy contribuye más al nivel LUNTO, el proceso de transferencia de carga intramolecular (ICT) es menos fuerte en el compuesto **5c**.

2.3.5. Análisis solvatocrómico.

Se llevó a cabo un análisis solvatocrómico para los compuestos **2.5a-2.5c** empleando 31 disolventes de diferente polaridad (Figura 2.10). Las pequeñas variaciones estructurales no solo modifican la polaridad del disolvente, sino que también mejoran significativamente la sensibilidad hacia los cambios de viscosidad, particularmente a variaciones pequeñas. En general, la posición de las bandas de absorción exhibe un comportamiento no monótonico con incrementos en la polaridad del disolvente. Sin embargo, en disolventes donadores de protones tales como *n*-octanol, alcohol bencílico, ciclohexanol, *i*-butanol, *n*-butanol, *i*-

propanol, etanol, 2-cloroetanol, polietilenglicol, etilenglicol, metanol y agua, las tres sondas muestran bandas de absorción adicionales en el intervalo de 500-600 nm. En los espectros de fluorescencia, el patrón de las bandas desplazadas hacia el rojo es también observado en el intervalo de 600-800 nm y puede ser atribuido a interacciones de puente de hidrógeno disolvente-soluto.

Además, el análisis solvatocrómico indica que existe una fuerte dependencia del desplazamiento de Stokes lo cual significa que bajo fotoexcitación se presentan variaciones geométricas en el estado excitado de la sonda dependiendo del medio. De hecho, una gran variación se observa para la sonda **2.5a** (658 cm^{-1} en pentano a 5700 cm^{-1} en agua) mientras que **2.5c** presenta pequeñas variaciones (1020 cm^{-1} en pentano a 5360 cm^{-1} en agua) destacando que existe ligeramente un menor movimiento rotacional conformacional para el compuesto **2.5c**.

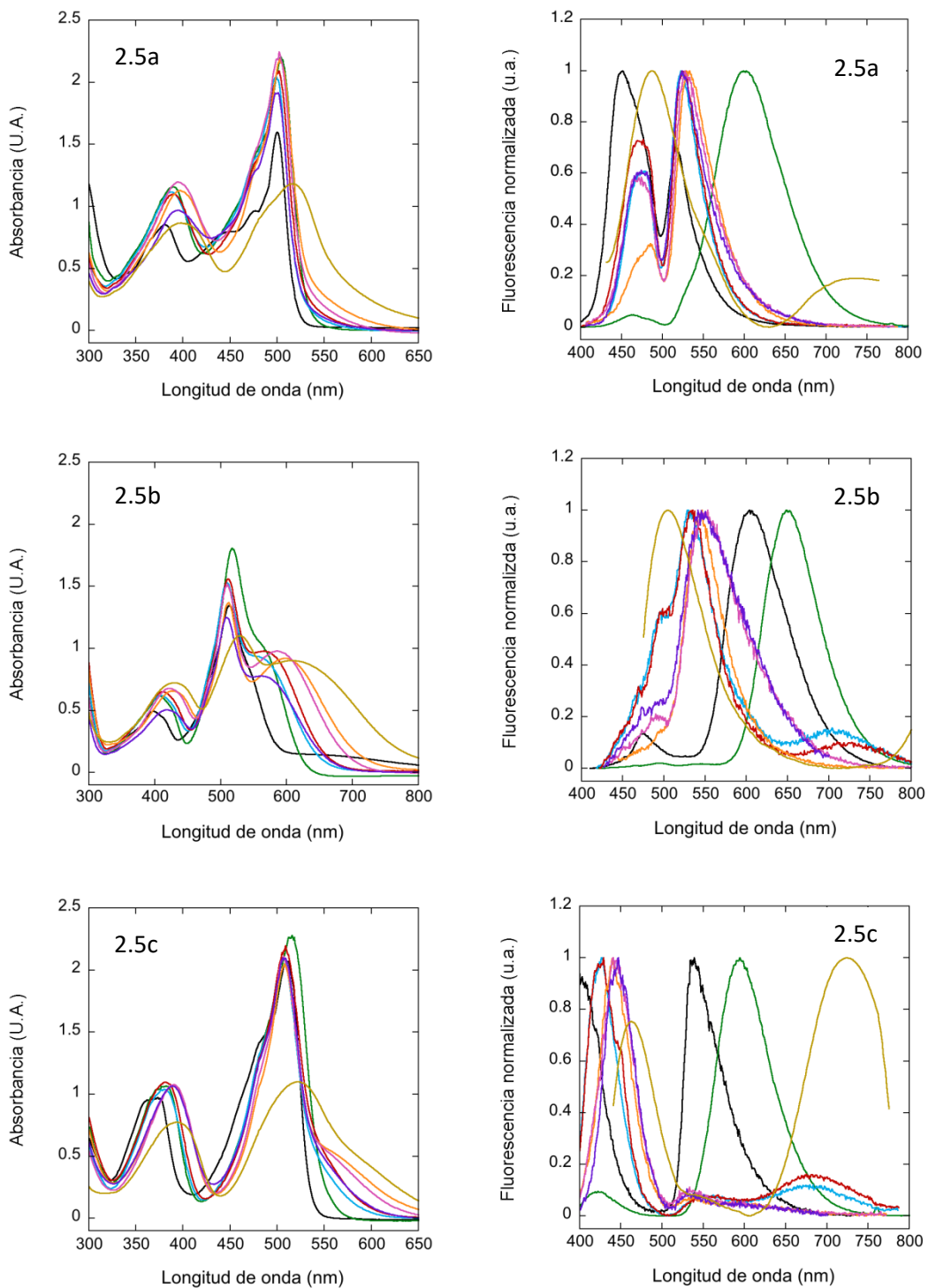


Figura 2.10. Espectros de UV/Vis y de emisión fluorescente para las sondas **2.5a-2.5c**. Algunos disolventes fueron omitidos por claridad, los datos con las propiedades espectroscópicas en todos los disolventes utilizados se presentan en las tablas 6.1-6.3 de la sección de anexos. El código de colores es el siguiente: Pentano (negro), *p*-xileno (verde), AcOEt (azul), THF (rojo), DMSO (anaranjado), NMF (rosa), EtOH (púrpura), agua (oro).

2.3.6. Análisis logarítmico de Förster-Hoffmann.

La influencia de la viscosidad sobre la emisión fluorescente se estudió primeramente por medio de un análisis logarítmico de Förster-Hoffmann, en donde los rendimientos cuánticos fluorescentes se obtuvieron tomando como referencia la rodamina B en etanol (rendimiento cuántico = 0.7, $\lambda_{exc} = 510$ nm) utilizando mezclas de diferente proporción de metanol:glicerol. La figura 2.11 muestra que para cada una de las sondas existe una relación lineal entre el rendimiento cuántico y la variación de viscosidad, esto sugiere que la dinámica rotacional es una función de la variación de viscosidad.

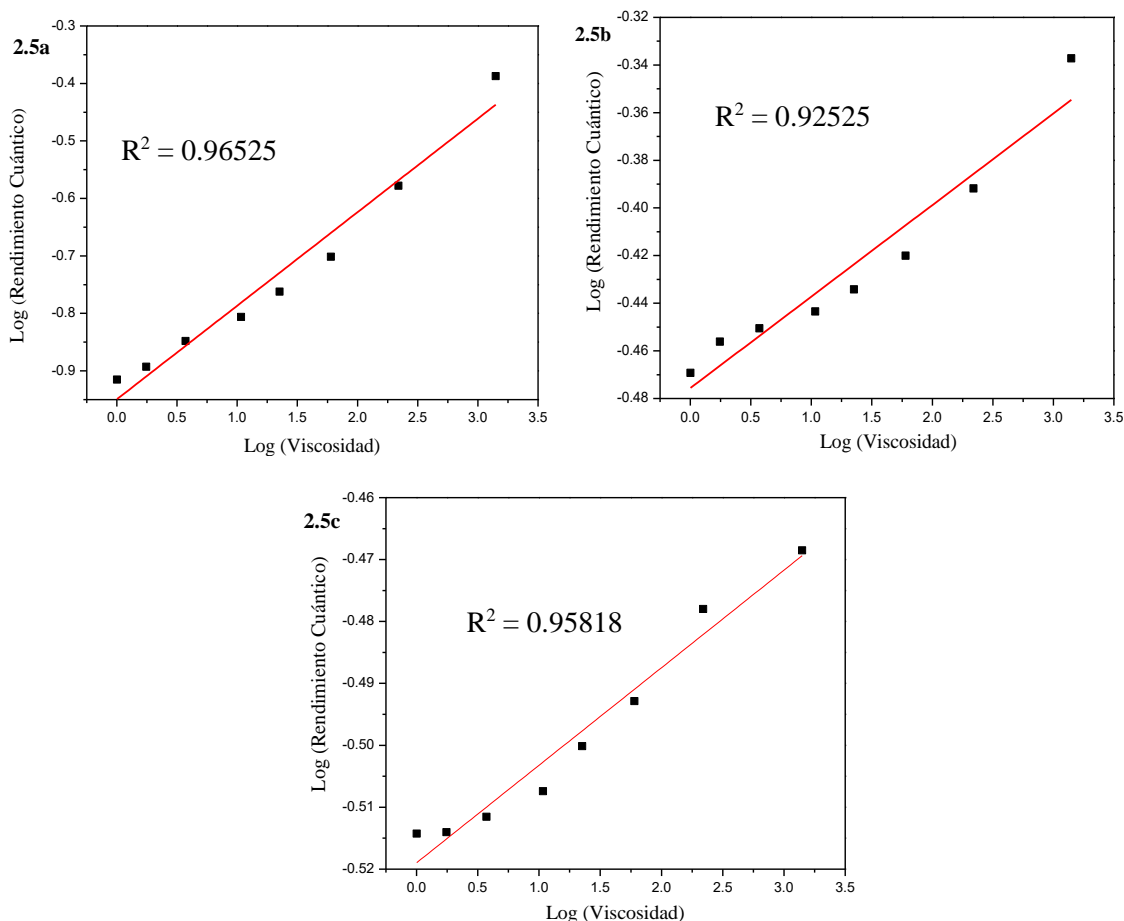


Figura 2.11. Ajuste lineal del logaritmo del rendimiento cuántico relativo versus el logaritmo de la viscosidad para las sondas **2.5a-2.5c**.

2.3.7. Respuesta fluorescente a valores de baja viscosidad.

Se llevó a cabo un análisis de la dependencia de la fluorescencia en un amplio intervalo de valores de viscosidad, particularmente, la influencia de pequeños cambios a bajas viscosidades. La Figura 2.12 muestra los perfiles de viscosidad para cada una de las sondas utilizando mezclas metanol:glicerol. Como se puede observar, en regiones de baja viscosidad, solo la sonda **2.5c** muestra un incremento lineal en la intensidad fluorescente, mientras que las sondas **2.5a-2.5b** muestran una disminución anómala de la fluorescencia. Estos resultados implican que sólo la sonda **2.5c** puede detectar ligeros cambios de viscosidad en una región de baja viscosidad con un intervalo lineal bueno. Para confirmar estos resultados, se analizó la respuesta de anisotropía fluorescente para cada una de las sondas.

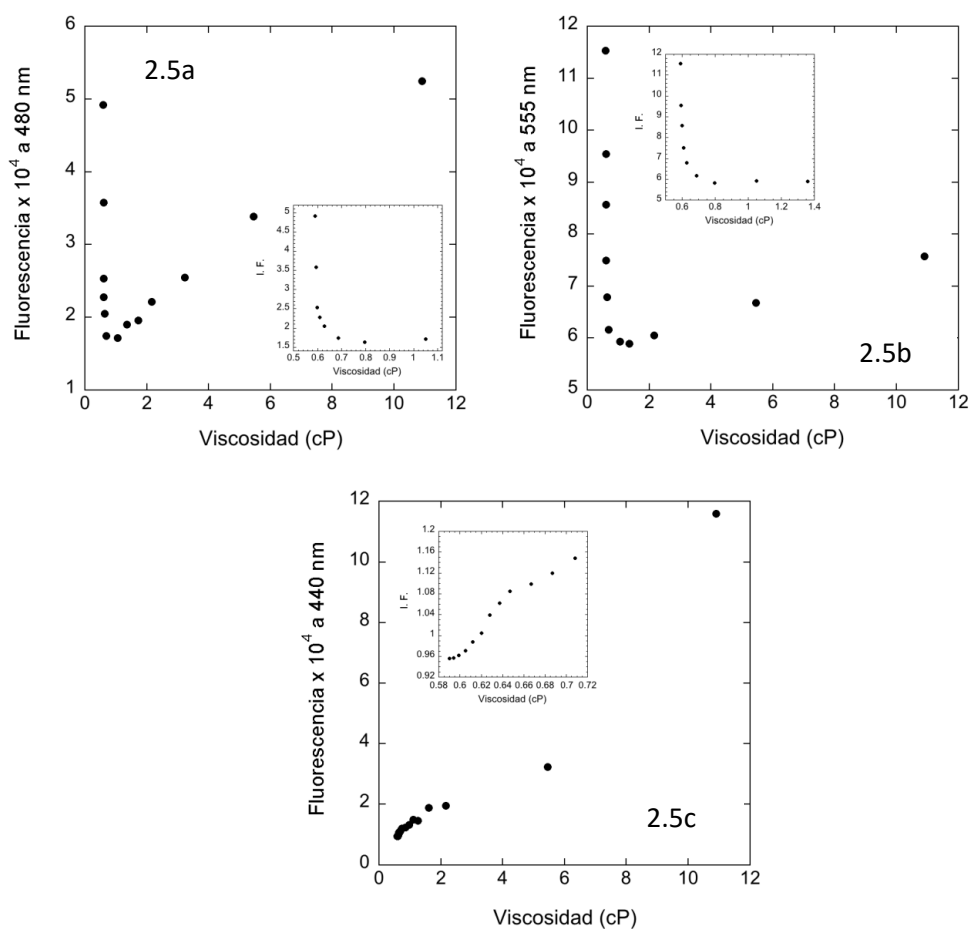


Figura 2.12. Perfiles de viscosidad de los compuestos **2.5a-2.5c** a una concentración 40 μ M utilizando mezclas metanol:glicerol.

2.3.8. Anisotropía fluorescente.

La anisotropía fluorescente representa un método para determinar la orientación molecular y la movilidad, esto ayuda a comprender como la viscosidad local afecta las propiedades fotofísicas de las sondas. Los fluoróforos son excitados con luz polarizada, dado que el vector eléctrico es paralelo al vector de transición de la molécula, durante el tiempo de vida del estado excitado, la molécula rota cambiando el plano de polarización.⁹

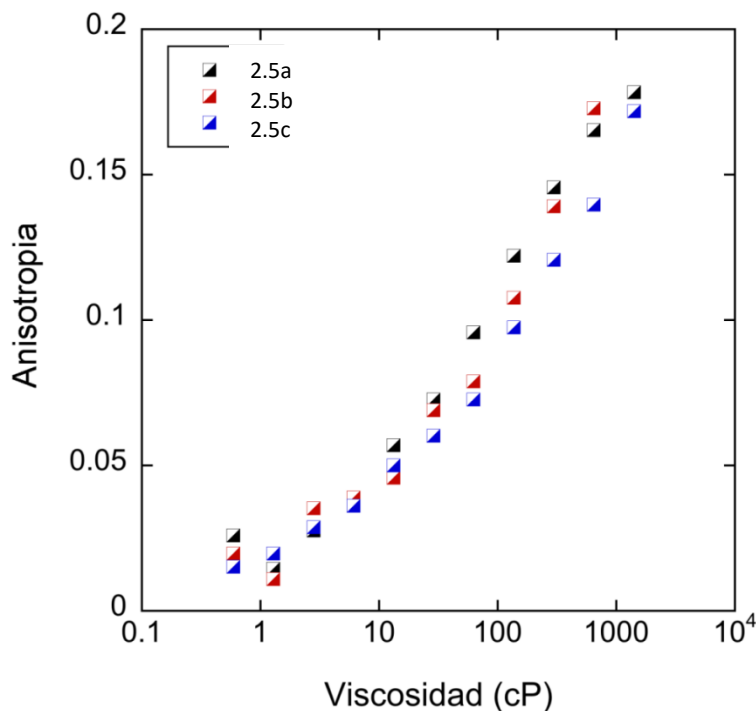


Figura 2.13. Perfiles de anisotropía fluorescente de los compuestos **2.5a-2.5c** a una concentración 40 μM , evaluados en un intervalo de viscosidad de 0.59-1410 cP.

Como se puede observar en la figura 2.13, los tres rotores moleculares muestran una respuesta lineal de anisotropía fluorescente frente al aumento de viscosidad. Es importante destacar la sensibilidad de la sonda **2.5c**, ya que muestra una tendencia lineal aún en intervalos de baja viscosidad (0.6-10 cP), este comportamiento puede ser atribuido a una dinámica de vibración rotacional relativamente más alta, ya que en esta sonda el movimiento unidireccional y de rotación total está impedido por factores estéricos.

2.3.9. Análisis de los orbitales naturales de transición (NTO).

Para tener una idea más completa sobre cómo la estructura molecular de las tres sondas influye sobre las propiedades ópticas observadas, se llevó a cabo un análisis mediante la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT). Los cálculos se hicieron utilizando el nivel de teoría PBE0, con la base de cálculo 6-31+G (d,p) y el modelo de solvatación PCM-metanol para determinar la geometría molecular óptima para cada una de las sondas. El estudio TD-DFT se llevó a cabo mediante el análisis NTO, la cual es la representación orbital más compacta para una determinada excitación electrónica. Se llevó a cabo el análisis de las propiedades de absorción de las moléculas en la región frontera HOMO-LUMO.


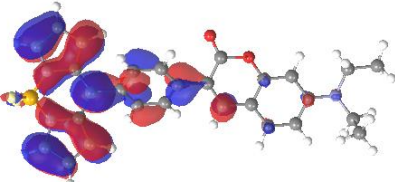
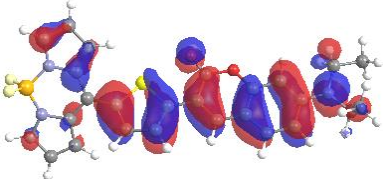
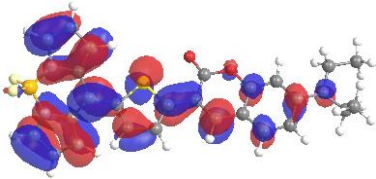
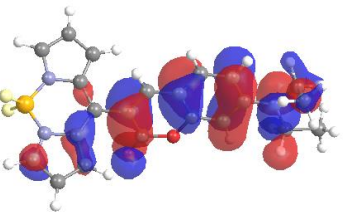
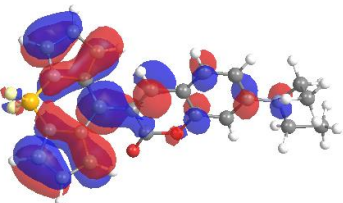
Absorción 505 nm $f=0.330$ $w = 1.00$ HOMO-LUMO	 Hueco (2.5a)	 Partícula (2.5a)
Absorción 518 nm $f = 0.847$ $w = 0.99$ HOMO-LUMO	 Hueco (2.5b)	 Partícula (2.5b)
Absorción 480 nm $f = 0.281$ $w = 0.82$ HOMO-LUMO	 Hueco (2.5c)	 Partícula (2.5c)

Figura 2.14. Orbitales naturales de transición (NTO) para los compuestos 2.5a-2.5c. La columna de la izquierda muestra la longitud de onda en nanómetros, la fuerza del oscilador (f), valor eigen (w) y la ocupación OM.

La figura 2.14 muestra la distribución NTO para los compuestos **2.5a-2.5c**. Como se puede notar, las tres moléculas pueden ser vistas como estructuras dipolares planas con una simetría C_s . La transición electrónica del estado basal ($|g\rangle$) al primer estado excitado ($|e_1\rangle$) es representado como $A' \rightarrow A''$. Como se puede observar en la figura 2.15, existe un fuerte carácter de transferencia de carga intramolecular (ICT) en la transición $A' \rightarrow A''$ en el compuesto **2.5a** en la distribución hueco-partícula, el hueco se extiende a lo largo del eje de la cumarina, mientras que el electrón está principalmente extendido en el núcleo del bodipy, en el caso de **2.5b** también se aprecia un carácter ICT pero menos extendido. Por otro lado, se observa una pequeña ICT para el compuesto **2.5c**, que se debe a una ligera torsión presente en la molécula. Todas estas observaciones indican que existe una baja interferencia en la polaridad durante el monitoreo de la viscosidad cuando se usa la sonda **2.5c**, en comparación con las otras dos sondas.

2.3.10. Microscopía confocal fluorescente.

Además, se presentan las imágenes de microscopía confocal fluorescente de células HeLa teñidas con las sondas a una concentración $5 \mu\text{M}$ y encontramos el mejor contraste de imagen en el compuesto **2.5c**. Las células HeLa fueron sembradas en tres diferentes microplacas de 8 pozos a una densidad de 15 000 células por pozo durante 1 día utilizando como medio RPMI suplementado con 10% de FBS. Después, las sondas con medio RPMI fueron adicionadas sobre cada pozo durante 30 minutos antes de llevar a cabo los experimentos de imagen.

Las sondas se localizan principalmente en el citosol como se muestra en la figura 2.15. Este tipo de localización celular, puede ser una consecuencia de la ausencia de distribución de carga formal y de su baja hidrofobicidad que evita la localización en membranas celulares. El patrón de emisión ratiométrico (Figura 2.15A) nos permitió estimar el estatus de la viscosidad de la célula con la sonda **2.5c**. Usamos para ello la calibración ratiométrica (Figura 2.15B), observando esta calibración para la sonda y las imágenes ratiométricas para las células tienen un buen intervalo dinámico lineal. Por lo tanto, la comparación entre la curva de calibración ratiométrica para la sonda **2.5c** y la imagen ratiométrica de células vivas, indica una variación de viscosidad en el intervalo de 1.3-62 cP (valores ratio de 6 a

16) utilizando la escala metanol-glicerol. Por ejemplo, la distribución de la viscosidad para las membranas en la región del núcleo tiene un valor entre 40-50 cP con una región predominante de 43 cP (14.2), mientras que la región del citosol tiene un valor de viscosidad de 1.3 cP (6.6) (Figura 2.15C).

El canal rojo presenta una intensidad débil debido a la escasa conjugación π en la sonda **2.5c**. Las mediciones de viscosidad no sufren interferencia causada por interacciones específicas dentro de la célula, tales como integración en membranas o intercalación proteína y ARN nuclear.

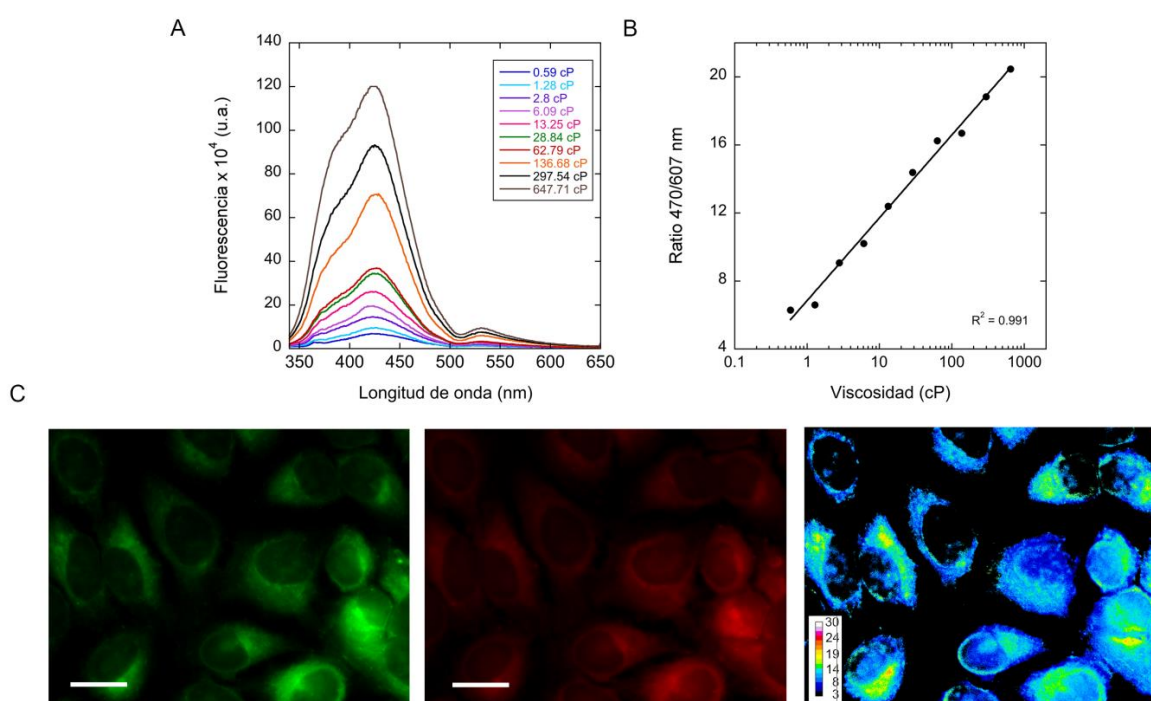


Figura 2.15. A) Espectros de emisión fluorescente a diferentes valores de viscosidad de 0.59 a 647.71 cP para la sonda **2.5c** utilizando mezclas metanol-glicerol. B) Curva de calibración ratiométrica (Ratio 470/607 nm vs viscosidad en cP). C) imágenes confocales fluorescentes, en el verde ($\lambda_{em} = 470$ nm), en el rojo ($\lambda_{em} = 613$ nm) y canales ratiométricos (verde/rojo) para las células HeLa teñidas con 5 μ M para la sonda **2.5c**. La escala bar representa 20 μ M mientras que el recuadro en la imagen ratiométrica representa la escala bar ratio en pseudo-colores.

2.4. Conclusiones

En conclusión, en este trabajo se describe una nueva familia de rotores moleculares fluorescentes duales basados en los núcleos de cumarina-bodipy. Se encontró que la sonda **2.5c** es capaz de monitorear pequeñas diferencias de viscosidad en células vivas. Estudios de rayos X muestran que un espaciador de mayor tamaño entre los núcleos de Cumarina-Bodipy promueve la planaridad, facilitando la dinámica rotacional (**2.5a-2.5b**). Los pequeños incrementos en la viscosidad tienen una fuerte influencia sobre las propiedades fluorescentes de la sonda **2.5c**. Además, la sensibilidad hacia los cambios de viscosidad se extiende en un amplio intervalo, en el caso de **2.5c** puede detectar pequeños cambios de viscosidad aún en intervalo de baja viscosidad ($r = 5-22$), las mediciones de anisotropía fluorescente confirman estos resultados.

Finalmente, la detección de la microviscosidad local en células HeLa teñidas con las sondas fue determinada por medio de un análisis ratiométrico, encontrando un mejor contraste de imagen con la sonda **2.5c**. Aunque las sondas se localizan principalmente en el citosol, estos resultados pueden tomarse en cuenta para el diseño de nuevas sondas que interaccionen con el organelo.

2.5. Referencias

1. D. Senyilmaz, S. Virtue, X. Xu, C. Y. Tan, J. L. Griffin, A. K. Miller, A. Vidal-Puig, A. A. Teleanu, Regulation of mitochondrial morphology and function by stearylolation of TFR1, *Nature*, 525(7567) (2015) 124-125.
2. (a) M. A. Haidekker, T. P. Brady, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis, A ratiometric fluorescent viscosity sensor, *J. Am. Chem. Soc.*, 128(2) (2006) 398–399. (b) K. Luby-Phelps, S. Mujumdar, R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, W. Galbraith, A. S. Waggoner, A novel fluorescence ratiometric method confirms the low solvent viscosity of the cytoplasm, *Biophys. J.*, 65(1) (1993) 236–242.
3. (a) B. Valeur, Fluorescent probes for evaluation of local physical, structural parameters, in molecular luminescence spectroscopy. Methods and applications: Part 3, S. G. Schulman ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, **1993**, pp. 109-149. (b) C. E. Kung, J. K. Reed,

Fluorescent molecular rotors: A new class of probes for tubulin structure and assembly, *Biochemistry*, 28(16) (1989) 6678-6686. (c) M. Dakanali, T. H. Do, A. Horn, A. Chongchivivat, T. Jarusreni, D. Lichlyter, G. Guizzunti, M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, Self-calibrating viscosity probes: Design and subcellular localization, *Bioorg. Med. Chem.*, 20(14) (2012) 4443-4450.

4. (a) B. Wandelt, P. Cywinski, G. D. Darling, B. R. Stranix, Single cell measurement of micro-viscosity by ratio imaging of fluorescence of styrylpyridinium probe, *Biosens. Bioelectron.*, 20(9) (2005) 1728-1736. (b) E. Gatzogiannis, Z. Chen, L. Wei, R. Wombacher, Y. T. Kao, G. Yefremov, V. W. Cornish, W. Min, Mapping protein-specific Micro-environments in live cells by fluorescence lifetime imaging of a hybrid genetic-chemical molecular rotor tag, *Chem. Commun.*, 48(69) (2012) 8694-8696. (c) J. Li, Y. Zhang, H. Zhang, X. Xuan, M. Xie, S. Xia, G. Qu, H. Guo, Nucleoside-based ultrasensitive fluorescent probe for the dual-mode imaging of microviscosity in living cells, *Anal. Chem.*, 88(10) (2016) 5554-5560.

5. (a) F. Liu, T. Wu, J. Cao, S. Cui, Z. Yang, X. Qiang, S. Sung S., F. Song, J. Fan, J. Wang, X. Peng, Ratiometric detection of viscosity using a two-photon fluorescent sensor, *Chem. Eur. J.*, 19(5) (2013) 1548-1553. (b) Z. V. Varga, P. Ferdinandy, L. Liaudet, P. Pacher, Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 309(9) (2015) 1453-1467. (c) X. Song, N. Li, C. Wang, Y. Xiao, Targetable and fixable rotor for quantifying mitochondrial viscosity of living cells by fluorescence, *J. Mater. Chem. B*, 5 (2017) 360-368.

6. A.S. Klymchenko, Solvatochromic and fluorogenic dyes as environment-sensitive probes: design and biological applications, *Acc. Chem. Res.* 50 (2) (2017) 366–375.

7. Z.R. Grabowski, K. Rotkiewicz, Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures, *Chem. Rev.* 103 (2003) 3899–4032.

8. O.A. Kucherak, P. Didier, Y. Mély, A.S. Klymchenko, Fluorene analogues of prodan with superior fluorescence brightness and solvatochromism, *J. Phys. Chem. Lett.* 1 (2010) 616–620.

9. B. M. Uzhinov, V. L. Ivanov, M. Y. Melnikov, Molecular rotors as luminescence sensors of local viscosity and viscous flow in solutions and organized systems, *Russ. Chem. Rev.* 80 (12) (2011) 1179–1190.

CAPÍTULO 3

DERIVADOS DE CUMARINA-BODIPY CON ENLACE TRIPLE C-C COMO GRUPO ESPACIADOR.

3.1. Introducción

Como se estudió en el capítulo anterior, los fluoróforos de tipo *push-pull* cumarina-bodipy constituyen una familia interesante de compuestos que funcionan como sondas fluorescentes duales de microviscosidad.¹ Para la medición de la viscosidad intracelular se han utilizado diferentes rotores fluorescentes duales que constan de un grupo electrodonador y uno electroatractor unidos mediante un grupo espaciador que rota libremente y que es capaz de extinguir la fluorescencia en ambientes de baja viscosidad y de mejorarla en medios viscosos.²

Además, debido a que los núcleos de cumarina y bodipy presentan excelentes propiedades fotofísicas, tales como grandes desplazamientos de Stokes y amplios coeficientes de absorción y de emisión fluorescentes que se pueden modular hace que este tipo de compuestos tengan aplicaciones como materiales optoelectrónicos.³

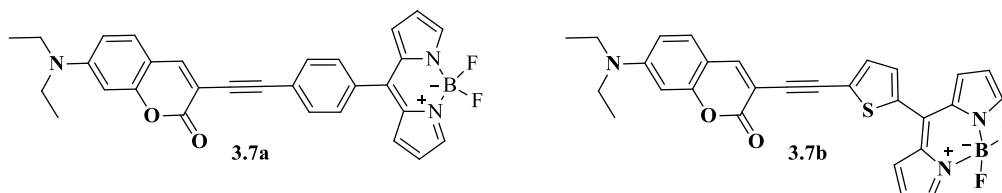
3.2. Objetivos

Sintetizar y caracterizar mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas los compuestos derivados de cumarina-bodipy que contienen como grupos espaciadores, un enlace triple y un grupo fenileno (**3.7a**) y un grupo tiofenileno (**3.7b**).

Evaluar las propiedades fotofísicas de los cromóforos **3.7a** y **3.7b**, mediante espectroscopia de absorción y de emisión fluorescente en diferentes disolventes, para determinar si la fluorescencia depende de la polaridad del medio y de si estos compuestos son sensibles a la viscosidad del medio, tal y como lo son los análogos **2.5a** y **2.5b**.

Estudiar las propiedades espectroscópicas de transferencia de carga intramolecular de los compuestos **3.7a** y **3.7b** mediante cálculos cuánticos de la excitación electrónica por medio de los orbitales naturales de transición (NTO).

Estudiar las propiedades fotofísicas de **3.7a** y **3.7b** en estado sólido mediante espectroscopia de absorción.



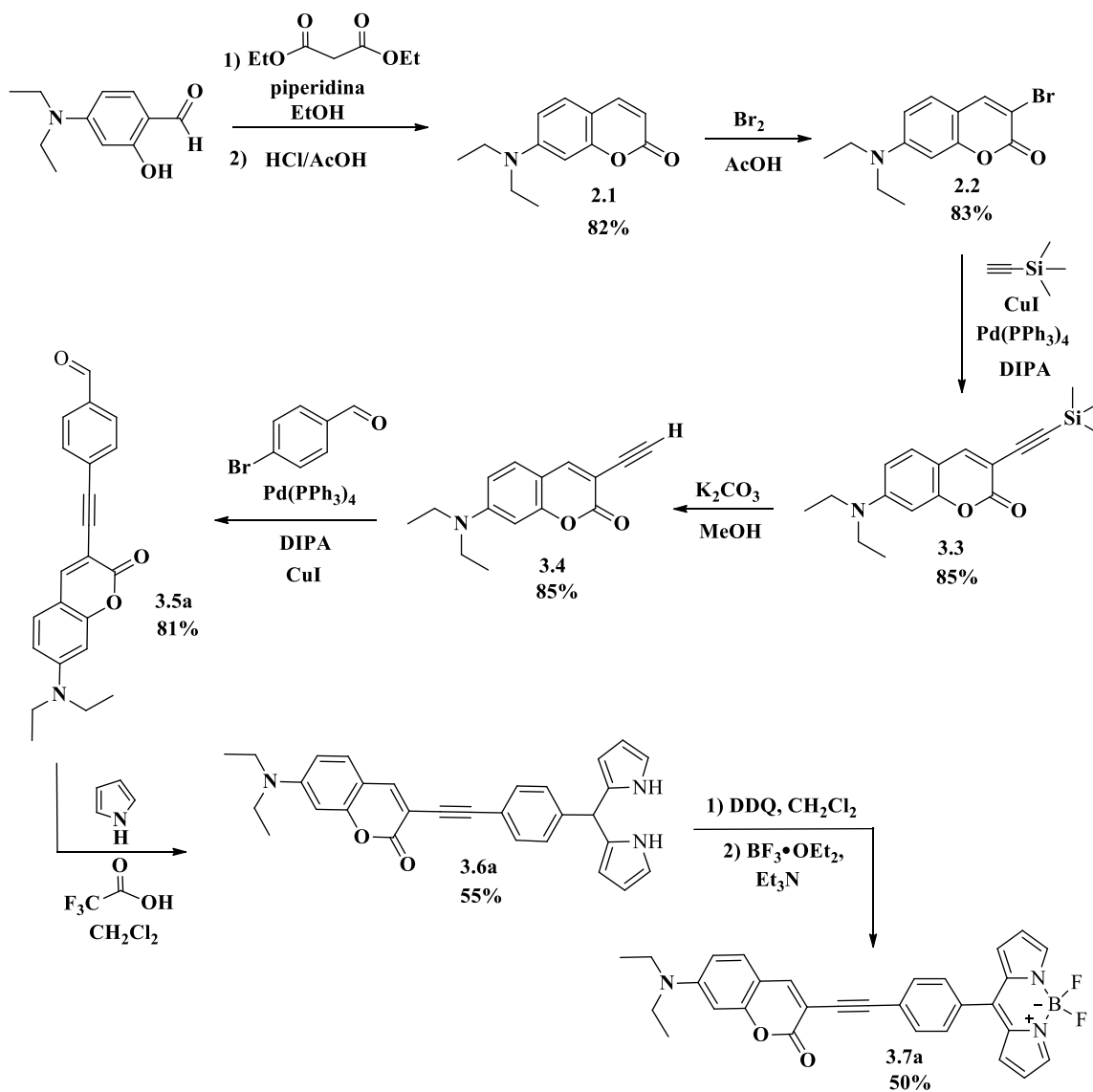
3.3. Resultados y análisis.

3.3.1. Síntesis

Se lograron sintetizar dos compuestos derivados de cumarina-bodipy **3.7a** y **3.7b** que contienen un enlace triple como espaciador y un grupo fenileno en el compuesto **3.7a** y de tiofenileno en el compuesto **3.7b**. La ruta de síntesis se muestra en los esquemas 3.1 y 3.2.

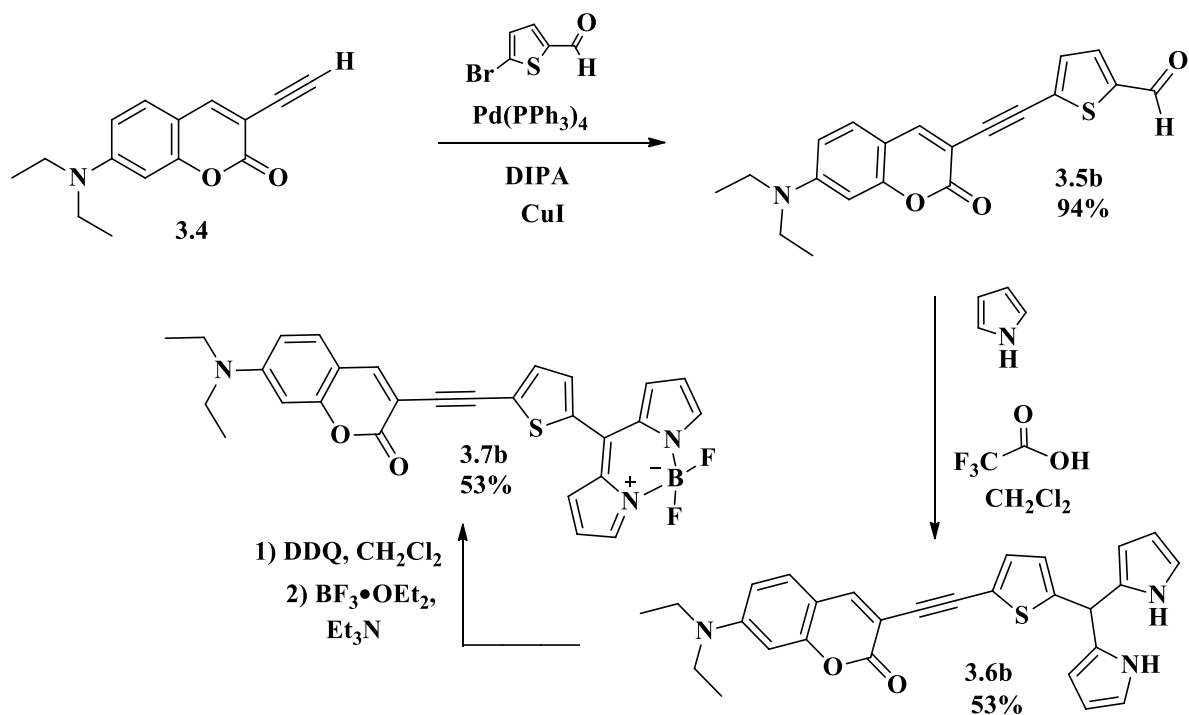
La molécula objetivo **3.7a** se sintetizó como se muestra en el esquema 3.1. Los compuestos **2.1** y **2.2** se obtuvieron como se describió en la sección 2.3.1. El compuesto **2.2** se sometió a una reacción de acoplamiento de Sonogashira empleando etiniltrimetilsilano. La desprotección del alquino en el compuesto **3.3** con K_2CO_3 en metanol condujo al compuesto **3.4**, que se acopló al 5-bromotiofeno-2-carboxaldehído mediante una reacción de acoplamiento de Sonogashira obteniéndose el aldehído **3.5a**, la reacción de condensación entre el compuesto **3.5a** y exceso de pirrol conduce a la formación del derivado de dipirrometano **3.6a**, que por reacción de oxidación con DDQ y una reacción de complejación con $BF_3 \cdot OEt_2$ empleando como base trietilamina conduce a la formación de la molécula objetivo **3.7a**.

El compuesto **3.7b** se sintetizó de manera análoga al compuesto **3.7a** como se muestra en el esquema 3.2.



Esquema 3.1. Ruta sintética para obtener el compuesto **3.7a**.

El compuesto **3.7b** se sintetizó de manera análoga al compuesto **3.7a** como se muestra en el esquema 3.2.



Esquema 3.2. Ruta sintética para obtener el compuesto **3.7b**.

3.3.2. Caracterización mediante espectroscopía de RMN de los compuestos **3.7a** y **3.7b**.

A continuación, se analizan los espectros de RMN de ^1H , ^{19}F , ^{11}B , así como los espectros bidimensionales HMBC de los compuestos **3.7a** y **3.7b** con la finalidad de explicar los desplazamientos químicos comunes, así como los desplazamientos particulares, dependiendo del grupo espaciador unido a la posición 3 del núcleo de la cumarina.

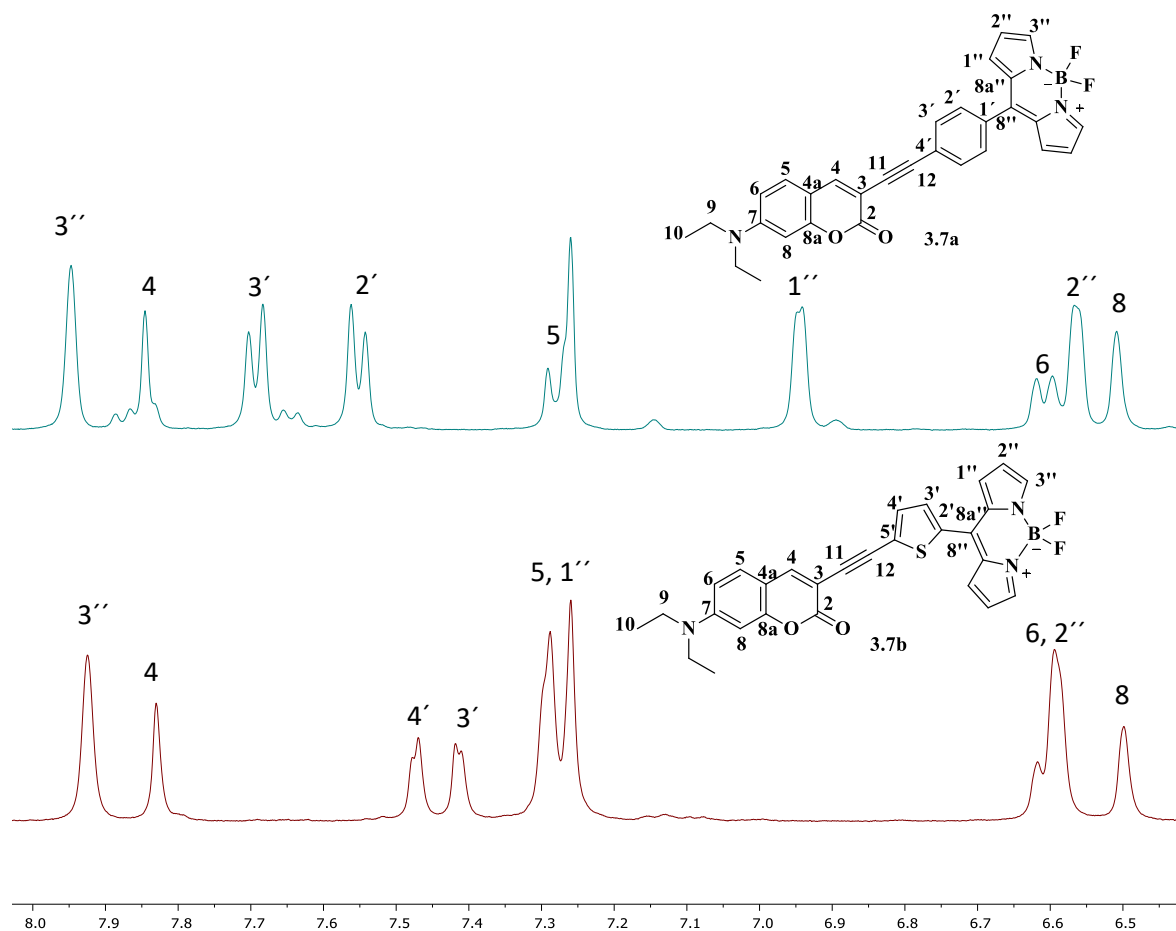


Figura 3.1. Espectros de RMN ^1H de los compuestos **3.7a** (300 MHz) y **3.7b** (400 MHz) en CDCl_3 .

En la figura 3.1, se muestran los espectros de RMN ^1H para los compuestos **3.7a** y **3.7b**, donde se pueden observar las señales del núcleo del bodipy (hidrógenos H-1'', H-2'' y H-3''), en donde a campo bajo aparece el hidrógeno H-3 como una señal ancha a 7.95 ppm para el compuesto **3.7a** y a 7.90 ppm para **3.7b**. En el caso del compuesto **3.7a**, las señales del sistema AA'BB' (hidrógenos H-2' y H-3') aparecen como señales dobles a 7.69 y 7.55 ppm con una constante de acoplamiento de $J = 7.9$ Hz; mientras que para el compuesto **3.7b**, las señales del sistema AB (hidrógenos H-3' y H-4') aparecen a 7.44 y 7.38 ppm con una multiplicidad doble y con una constante de acoplamiento de $J = 3.2$ Hz. La señal del hidrógeno vinílico H-4 del núcleo de la cumarina aparece como una señal simple a 7.85 ppm para **3.7a** y a 7.80 ppm para **3.7b**. También se pueden apreciar el resto de las señales de los hidrógenos H-5, H-6 y H-7 del núcleo de la cumarina.

Para confirmar la presencia de boro y flúor en las estructuras, se obtuvieron los espectros de RMN de ^{11}B y ^{19}F (Figura 3.2).

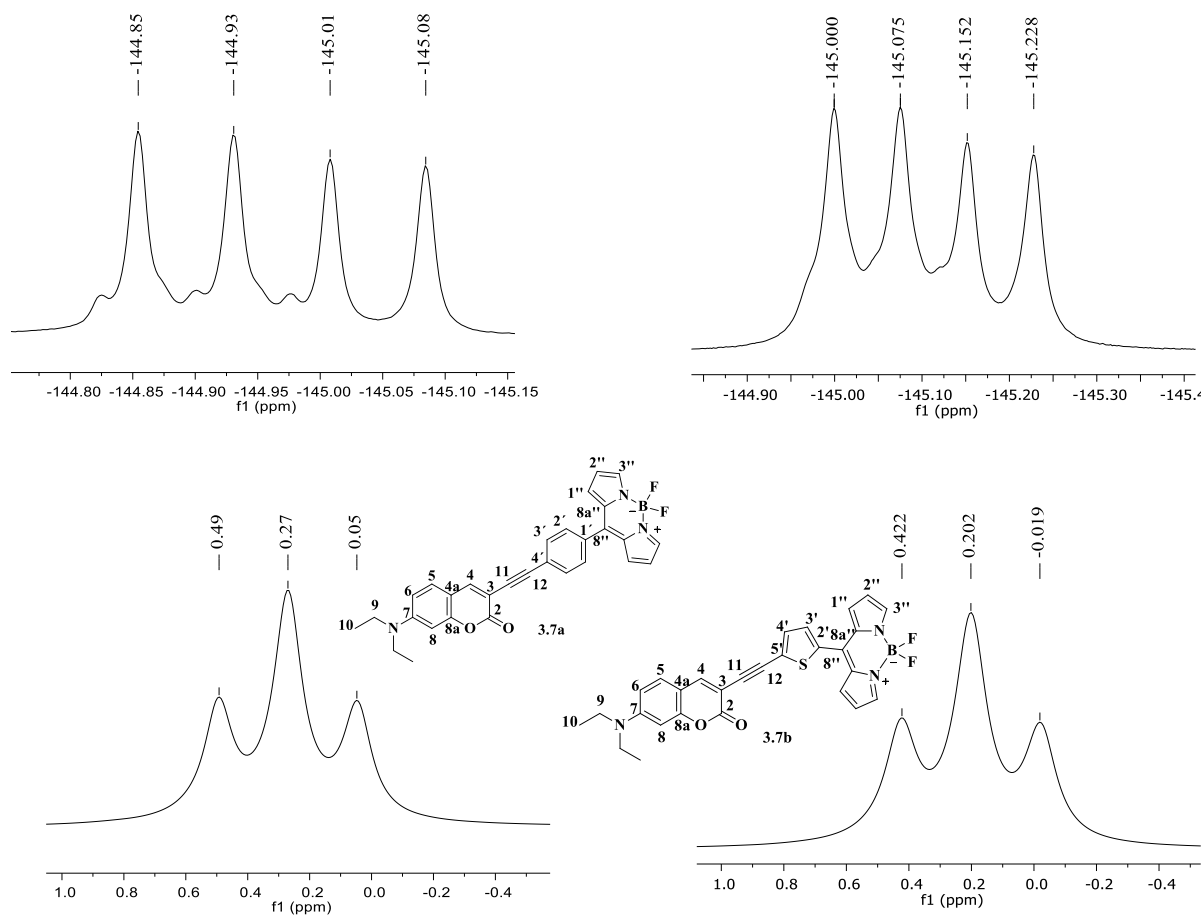


Figura 3.2. Espectros de RMN ^{19}F (376 MHz) (arriba) y ^{11}B (128 MHz) (abajo) de los compuestos **3.7a** y **3.7b**.

En la figura 3.2 se pueden apreciar los espectros de RMN de ^{19}F y ^{11}B para los compuestos **3.7a** y **3.7b**. En el caso de los espectros de ^{19}F , se observan dos señales cuádruples a -145.0 ppm para **3.7a** y a -145.1 ppm para **3.7b** con una constante de acoplamiento de $J_{\text{B-F}} = 28.3$ Hz para **3.7a** y de $J = 28.4$ Hz para **3.7b**, la multiplicidad de las señales como ya se había mencionado anteriormente para los compuestos **2.5a-2.5c** es debido a que los dos átomos de flúor son equivalentes y a que se encuentran acoplados con el átomo de ^{11}B . En el caso de los espectros de ^{11}B se pueden observar señales triples a 0.27 ppm para **3.7a** y a 0.20

ppm para **3.7b** con una constante de acoplamiento de $J_{B-F} = 28.3$ Hz para **3.7a** y de $J_{B-F} = 28.4$ Hz para **3.7b**., esto confirma la presencia del grupo BF_2 en el bodypy.

Con la finalidad de identificar inequívocamente los hidrógenos y carbonos de los grupos espaciadores, fenileno y enlace triple C-C en el caso del compuesto **3.7a** y del tiofenileno y el enlace triple C-C para **3.7b** se utilizó el espectro de dos dimensiones HMBC (Heteronucler Muple Bond Correlation) (Figuras 3.3-3.4).

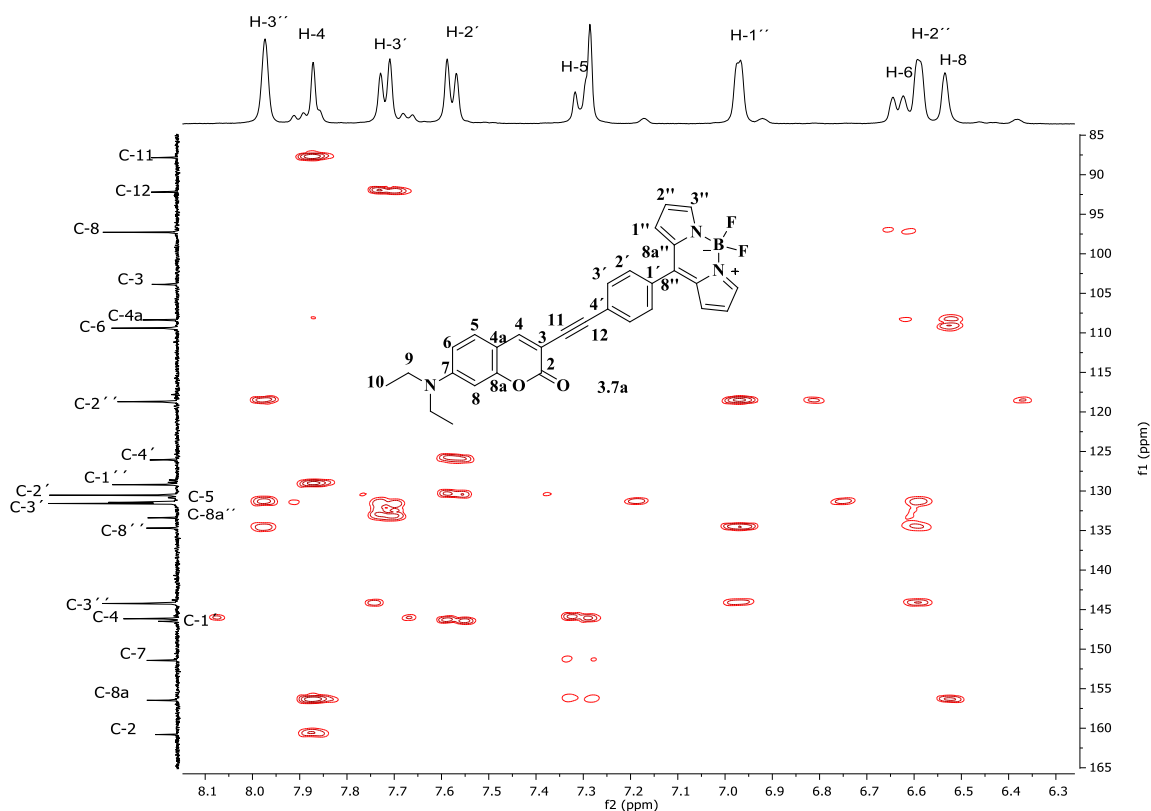


Figura 3.3. Espectro HMBC del compuesto **3.7a** en $CDCl_3$.

En la figura 3.3 se muestra el espectro HMBC del compuesto **3.7a**. En el espectro se puede observar que los hidrógenos del sistema AA'BB' H-2' y H-3' se encuentran acoplados con sus correspondientes carbonos C-2' y C-3' a un enlace. Además, el hidrógeno H-4 se acopla con el carbono C-11 a tres enlaces; el hidrógeno H-2' se acopla con el carbono C-4' a tres enlaces y con el carbono C-1' a dos enlaces; el hidrógeno H-3' se acopla con el carbono C-12 a tres enlace; el hidrógeno H-1'' se acopla con los carbonos C-2'' y C-3'' a dos y tres enlaces respectivamente.

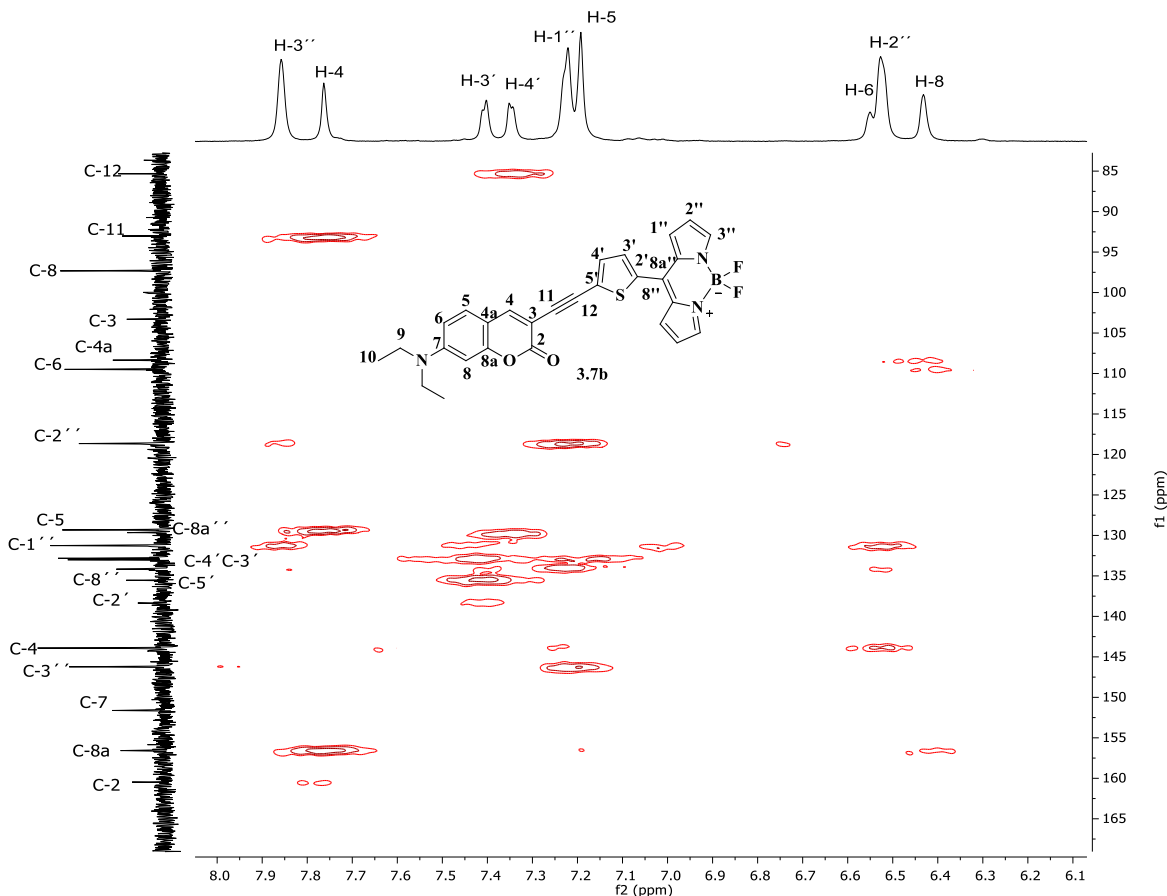


Figura 3.4. Espectro HMBC del compuesto **3.7b** en CDCl_3 .

En la figura 3.4 se muestra el espectro HMBC del compuesto **3.7b**, donde se puede observar que los hidrógenos del sistema AB, H-3' y H-4' se encuentran acoplados con sus correspondientes carbonos C-3' y C-4' a un enlace. El hidrógeno H-4 se encuentra acoplado con el carbono C-11 a tres enlaces, mientras que el hidrógeno H-4' se acopla con los átomos de carbono C-8a y C-11 a tres enlaces, de esta manera se logró asignar inequívocamente los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C para los compuestos **3.7a** y **3.7b**.

3.3.3. Análisis solvatocrómico.

Con la finalidad de estudiar la dependencia de la emisión fluorescente de los compuestos **3.7a** y **3.7b** con respecto a la polaridad del disolvente se llevó a cabo un estudio

solvatocrómico en 9 disolventes orgánicos de diferente polaridad, como se puede observar en la figura 3.5.

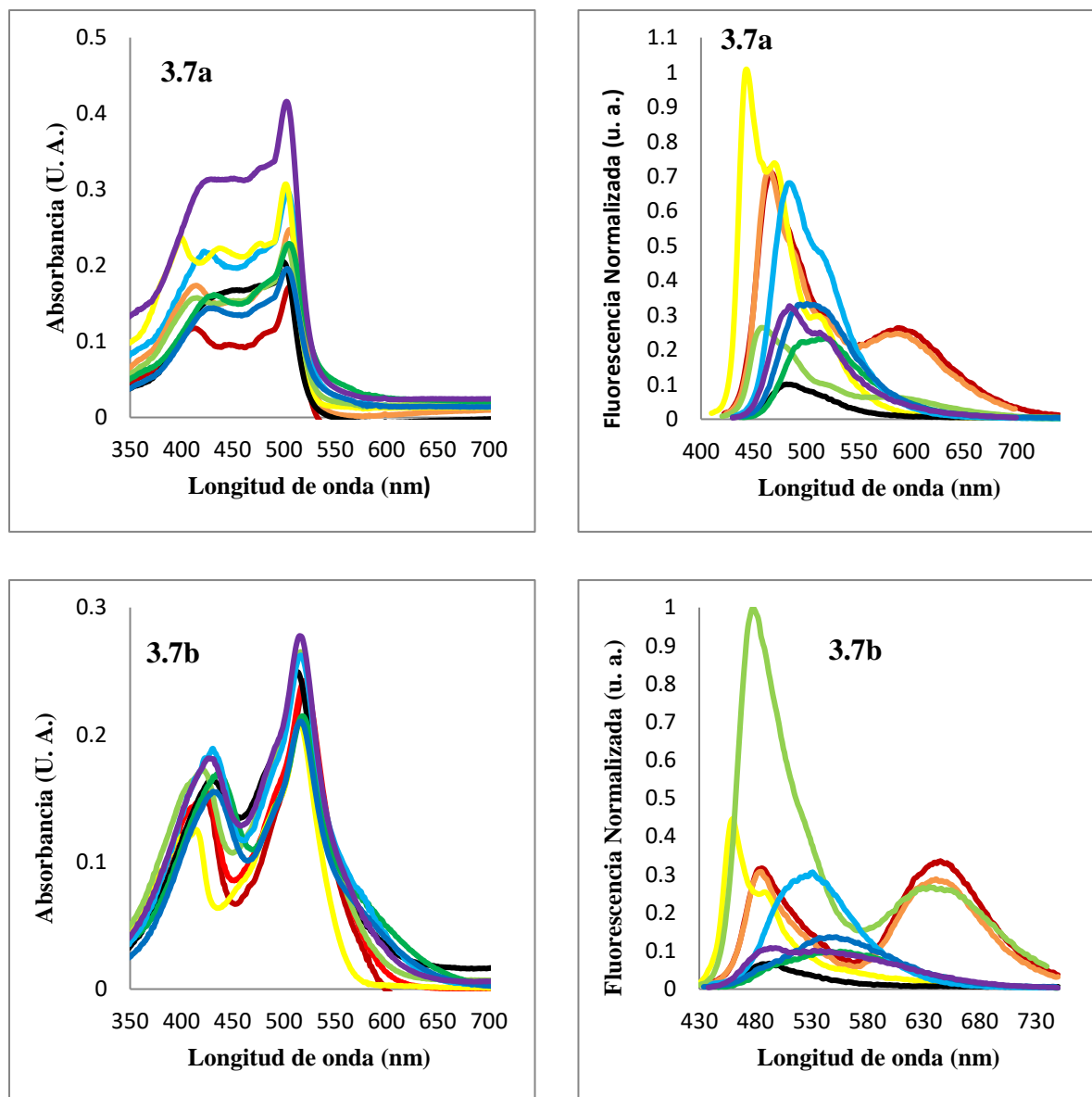


Figura 3.5. Espectros de absorción y de emisión fluorescente para los compuestos **3.7a** y **3.7b** a una concentración 4 μM . El código de colores es el siguiente: Diclorometano (Azul claro), xileno (Rojo oscuro), tolueno (Anaranjado), hexano (Amarillo), metanol (Negro), dioxano (Verde Claro), DMSO (Verde), DMF (Azul), butanol (Púrpura).

Con respecto a los espectros de absorción se puede decir que las bandas de emisión no muestran desplazamientos significativos debidos a la variación en la polaridad del disolvente. Sin embargo, los espectros de emisión fluorescente muestran respuesta hacia la polaridad del disolvente, en los disolventes de mediana y baja polaridad tales como hexano, xileno, tolueno, dioxano y diclorometano hay una mayor respuesta fluorescente, incluso en el caso del espectro de **3.7b** en dioxano parece que la banda ancha es un indicativo de la formación de agregados, además de que en estos disolventes se observan dos bandas de emisión definidas, a diferencia de los disolventes polares. En el caso de disolventes polares próticos como el metanol y el butanol puede ser que haya interacciones tipo puente de hidrógeno con los compuestos **3.7a** y **3.7b** y esto hace que se vean modificadas las propiedades fluorescentes de emisión.

3.3.4. Dependencia de la fluorescencia hacia los cambios de viscosidad.

Con el objetivo de probar si los compuestos **3.7a** y **3.7b** mostraban respuesta fluorescentes a los cambios de viscosidad, se llevó a cabo un estudio de viscosidad utilizando mezclas metanol:glicerol y se obtuvieron los espectros de emisión que se muestran en la figura 3.6. Como se aprecia, ambos compuestos presentan dos bandas de emisión, debidas principalmente a los núcleos de cumarina y bodipy, sin embargo no ofrecen una respuesta hacia cambios de viscosidad, esto implica que la introducción de un segundo grupo espaciador de enlace triple C-C entre la cumarina y el fenileno en **3.7a** y entre la cumarina y el tiofenileno en **3.7b** hace que el sistema tenga mayor libertad de movimiento y que los grupos espaciadores no inhiban la rotación intramolecular de manera homogénea con el aumento de la viscosidad.

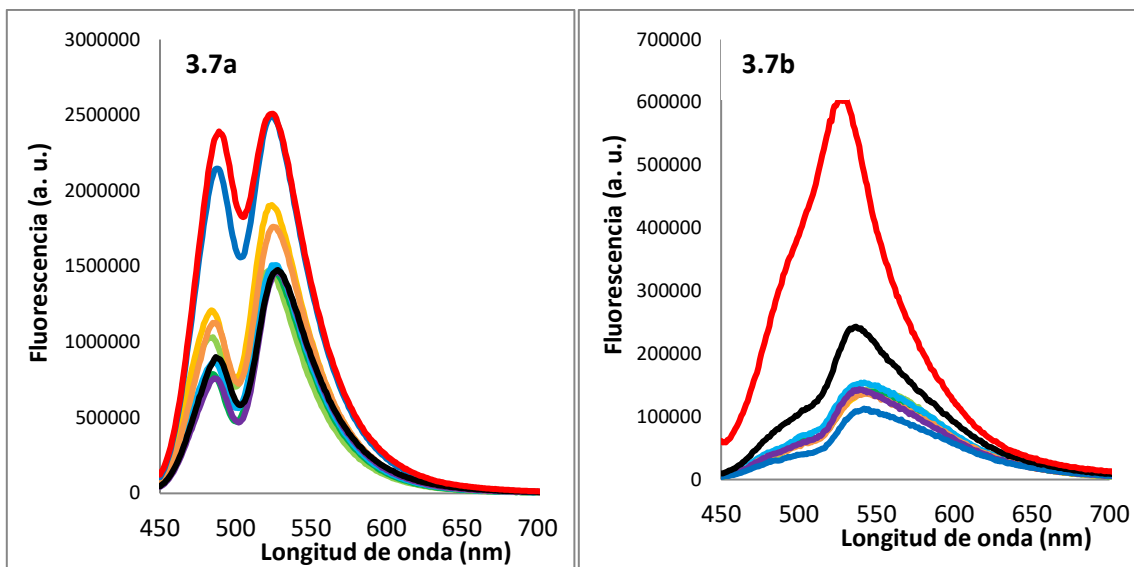


Figura 3.6. Espectros de fluorescencia de **3.7a** y **3.7b** ($40 \mu\text{M}$) en diferentes proporciones metanol:glicerol. El código de colores para cada espectro a diferentes valores de viscosidad en cP es: 0.59 (Verde claro), 1.28 (Amarillo), 2.8 (Verde), 6.09 (Azul claro), 13.25 (Anaranjado), 28.84 (Púrpura), 62.79 (Azul), 136.68 (Negro), 297.54 (Rojo).

3.3.5. Optimización de geometría y estudios NTO.

Los estudios de optimización geométrica (Figura 3.7) revelan que ambas moléculas **3.7a** y **3.7b** tienen un factor en común: la planaridad que se rompe de forma importante al llegar al fragmento de bodipy. El compuesto **3.7a** que contiene la unidad de etinil-fenileno como espaciador entre el sistema cumarina-bodipy presenta una torsión de 54° respecto al plano que genera el sistema cumarina-etinil-fenileno con el bodipy. Por otro lado, analizando la geometría del análogo con etinil-tiofenileno (**3.7b**), se puede observar una torsión menor, con un valor de 44° . Esto, en primera instancia podría llevarnos a pensar que, debido a la torsión en estos sistemas, la comunicación electrónica se pierde disminuyendo la conjugación y la deslocalización.

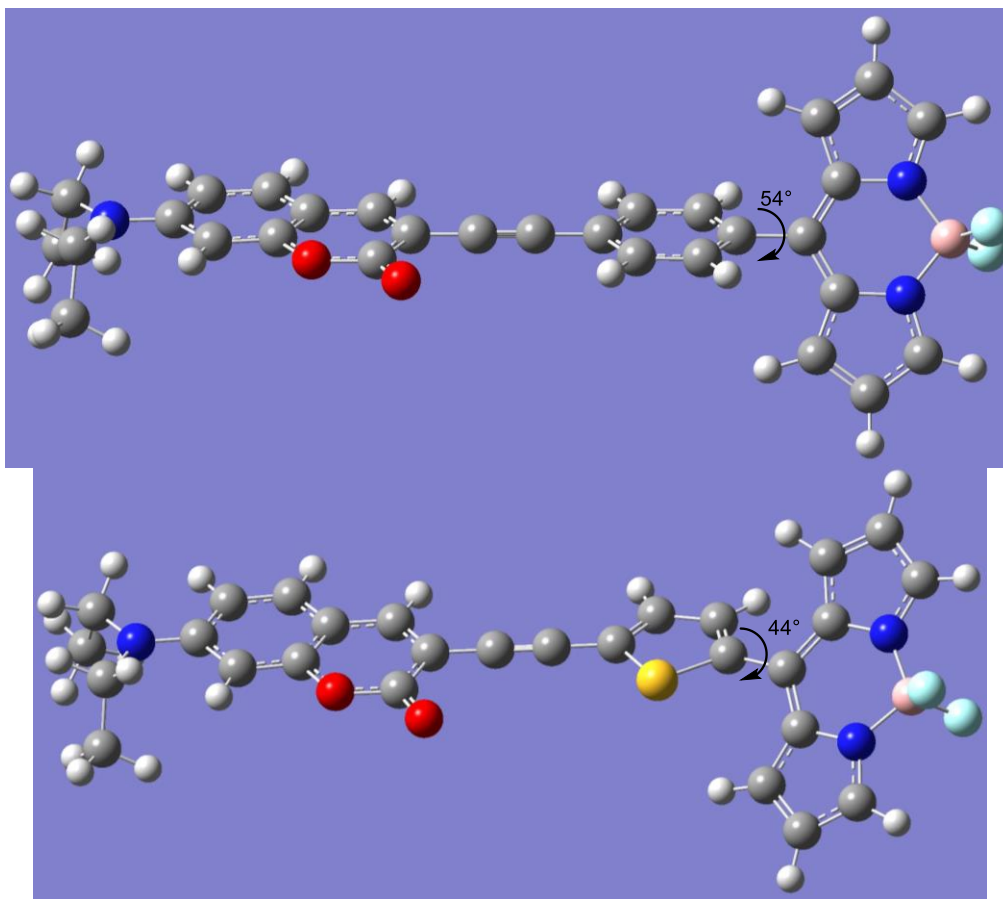


Figura 3.7. Optimizaciones geométricas para **3.7a** y **3.7b**. usando el nivel de teoría B3LYP y la base gaussiana 6-311g+

Los estudios de TD-DFT ayudaron a determinar las principales transiciones electrónicas de cada especie.

Para el caso del compuesto **3.7a** con el espaciador de etinil-fenileno se determinó que la transición correspondiente a la absorción del fragmento de cumarina, que es la de mayor interés debido a su posterior estudio de emisión, se calculó en 428.2 nm que concuerda de manera aceptable para el método, respecto al valor experimental de 422 nm. Esta transición corresponde a la transición $S_0 \rightarrow S_3$ y posee una fuerza de oscilador de $f = 1.349$. Se calcula que dicha excitación está descrita por dos componentes: [HOMO-2 \rightarrow LUMO] y [HOMO \rightarrow LUMO+1], es decir, una transición un tanto compleja y conformada por niveles muy cercanos a los orbitales frontera, pero sin ser de tipo HOMO-LUMO formalmente.

Para el compuesto **3.7b** con el espaciador de etinil-tiofenileno se determinó que la transición para la absorción del fragmento de cumarina estaba en 444.4 nm en concordancia

aceptable para el método y se determinó que es del tipo $S_0 \rightarrow S_2$ con una fuerza de oscilador de $f = 0.679$. Para este compuesto, dicha transición tiene 3 componentes: [HOMO-2 \rightarrow LUMO], [HOMO-1 \rightarrow LUMO] y [HOMO \rightarrow LUMO+1]. En este caso se tiene una transición más compleja involucrando un estado más profundo en energía, sin tratarse ninguna componente que involucre directamente al par de orbitales frontera.

Como se puede observar, la composición de las transiciones electrónicas que corresponden a la absorción del fragmento de cumarina no es sencilla de describir debido a que posee varias componentes. Es en casos como éste que se requiere reducir las transiciones a su representación de origen. Es aquí donde entran en función los cálculos de Orbitales Naturales de Transición (NTO). De esta manera todas esas componentes se reducirán a la representación orbital hueco-partícula.

El análisis NTO, como se muestra en la figura 3.8, arroja como resultado la forma en que se desplaza la densidad electrónica en los compuestos **3.7a** y **3.7b**. En el caso del compuesto **3.7a**, se puede observar que en la transición hueco-partícula la densidad electrónica se deforma muy poco. Pasando de una forma hiperconjugada en las cadenas de etilo de la porción unida a la cumarina, deslocalizándose de manera efectiva hasta el anillo de fenilo, mientras que, al llevar a cabo la transición, sólo alcanza a transferirse un poco de carga a la posición *meso* del fragmento de bodipy, lo cual no es significativo.

En un ligero contraste, la representación hueco-partícula para **3.7b**, muestra que la molécula pasa de un estado en que se tiene una deslocalización desde la porción hiperconjugada de dietilamino hasta las posiciones α y β de uno de los anillos de pirrol que conforman el fragmento de bodipy. Al llevar a cabo la transición, la densidad electrónica se aloja en la zona desde el puente π de etinilo hasta el fragmento de bodipy, por lo que podemos decir que existe transferencia de carga en esta excitación, pero no es del todo efectiva. Si bien este sistema está mucho menos tensionado espacialmente, permitiendo una mejor deslocalización en el estado basal, la presencia del puente π del etinilo aunado al tiofenileno, no mejora sustancialmente la transferencia de carga cuando se le compara con su análogo que contiene únicamente al tiofenileno. Por lo tanto, al no haber una cantidad sustancial de transferencia de carga en el estado excitado podría explicar por qué los

compuestos **3.7a** y **3.7b** son ligeramente sensibles a los cambios de polaridad del disolvente.

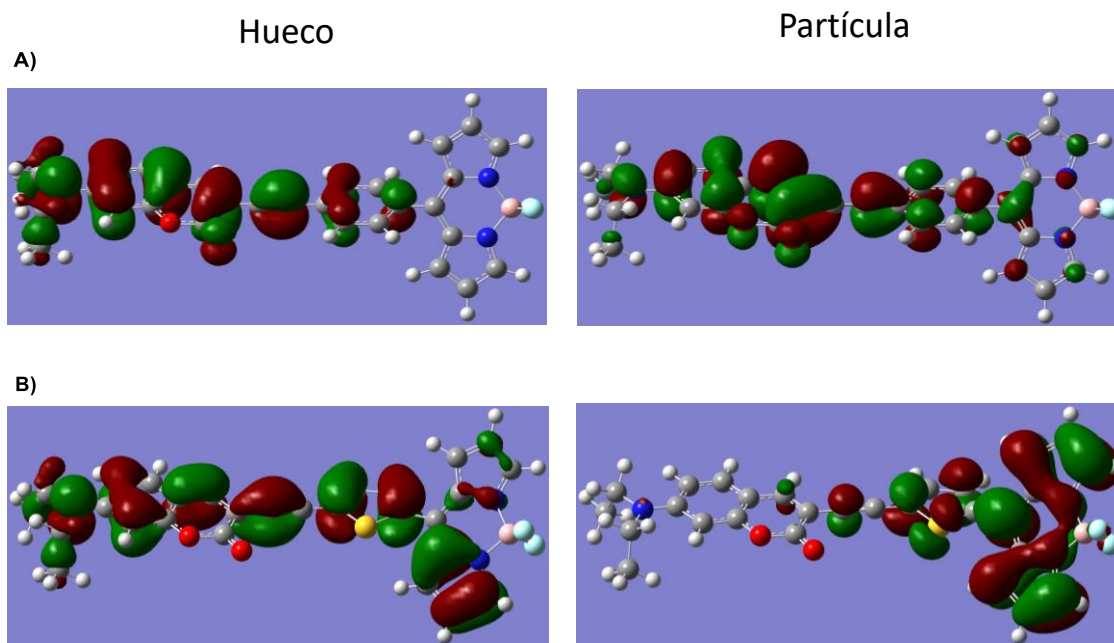


Figura 3.8. Representaciones orbitales hueco-partícula para los sistemas estudiados. A) Representa lo calculado para **3.7a**. B) representa lo calculado para **3.7b**. usando el nivel de teoría B3LYP y la base gaussiana 6-311g+

3.3.6. Espectros de absorción en estado sólido.

También se exploraron las propiedades de absorción de los compuestos **3.7a** y **3.7b** en estado sólido, como se muestra en la figura 3.9. En ambos espectros se observan bandas de absorción cercanas al infrarrojo; como se sabe el sol emite radiación en gran parte en el infrarrojo cercano, lo cual resulta interesante ya que estos compuestos podrían ser candidatos para probarse como materiales en celdas solares orgánicas. Además, a partir de los espectros de absorción en estado sólido, empleando el método de Tauc, se calculó el valor de la brecha óptica HOMO-LUMO. Los valores calculados son de 1.40 eV para **3.7a** y de 1.36 eV para **3.7b**, estos valores son parecidos a los de la brecha valencia-conducción del rubreno cristalino (1.20 eV) que es un material orgánico utilizado como material semiconductor, esto implica que estos compuestos podrían tener aplicaciones como semiconductores.

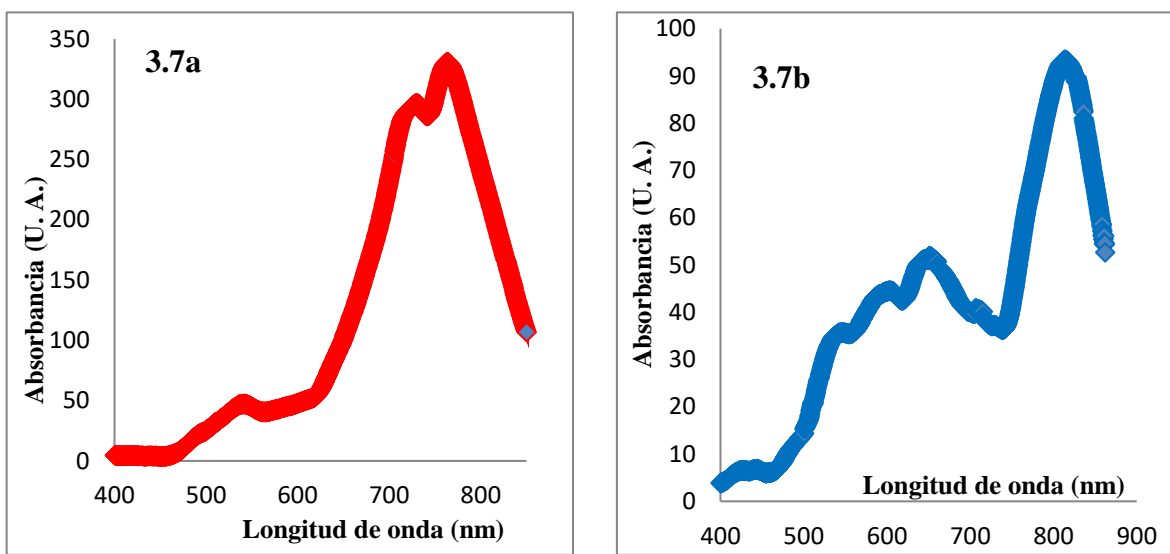


Figura 3.9. Espectros de absorción en estado sólido de los compuestos **3.7a** y **3.7b**.

3.4. Conclusiones

Se lograron sintetizar los compuestos derivados de cumarina-bodipy **3.7a** y **3.7b** y se estudiaron sus propiedades fotofísicas tanto en disolución como en estado sólido. Los compuestos se probaron como sondas fluorescentes de viscosidad, sin embargo, no existe respuesta hacia los cambios de viscosidad. A partir de los espectros de absorción en estado sólido se calculó la brecha óptica HOMO-LUMO empleando el método de Tauc, el compuesto **3.7a** tiene un valor de 1.40 eV y **3.7b** de 1.36 eV, estos valores son cercanos a la brecha de banda conducción-valencia del rubreno cristalino (1.20 eV) por lo que estos compuestos podrían tener aplicaciones como semiconductores, además debido a que las bandas de absorción de dichos compuestos se encuentran cercanas al IR podrían tener aplicaciones como materiales en celdas solares.

3.5 Referencias

1. J. Ordóñez-Hernández, A. Jiménez-Sánchez, H. García-Ortega, N. Sánchez-Puig, M. Flores-Álamo, R. Santillan, N. Farfán, A series of dual-responsive Coumarin-Bodipy probes for local microviscosity monitoring, *Dyes Pigm.*, 157 (2018) 305-313.
2. (a) M. A. Haidekker, T. P. Brady, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis, A ratiometric fluorescent viscosity sensor, *J. Am. Chem. Soc.*, 128(2) (2006) 398–399. (b) K. Luby-Phelps, S. Mujumdar, R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, W. Galbraith, A. S. Waggoner, A novel fluorescence ratiometric method confirms the low solvent viscosity of the cytoplasm, *Biophys. J.*, **1993**, 65(1), 236–242.
3. C. Y. Lee, J. T. Hupp, Dye sensitized solar cells: TiO₂ sensitization with a bodipy-porphyrin antenna system, *Langmuir*, 26 (2010) 3760-3765.
4. A. C. Benniston, G. Copley, Lighting the way ahead with boron dipyrromethene (Bodipy) dyes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 4124-4131.
5. N. Boens, V. Leen, N. Dehaen, Fluorescent indicators based on BODIPY, *Chem. Soc. Rev.*, 41 (2012) 1130-1172.
6. R. Ziessel, G. Ulrich, A. Harriman, The chemistry of Bodipy: A new “El Dorado” for fluorescence tools, *New J. Chem.*, 31 (2007) 496-501.
7. B. C. Popere, A. M. Della Pelle, S. Thayumanavan, BODIPY-based donor-acceptor π conjugated alternating copolymers, *Macromolecules*, 44 (2011) 4767-4776.
8. H. Zhang, D. M. Rudkevich, A FRET approach to phosgene detection, *Chem. Commun.*, (2007) 1238-1239.
9. M. C. DeRosa, D. J. Hodgson, G. D. Enright, B. Dawson, C. E. B. Evans, R. J. Crutchley, Iridium luminophore complexes for unimolecular oxygen sensors, *J. Am. Chem. Soc.*, 126(24) (2004) 7619-7626.
10. L.J. Zhang, B.-Z. Yin, 7-Diethylamino-2-oxo-2H-chromene-3-carbohydrazide, *Acta Cryst.*, E67 (2011) o1107.

CAPÍTULO 4

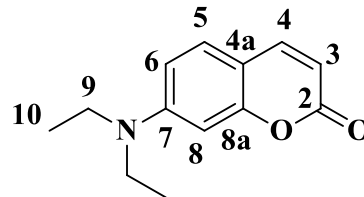
PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reactivos e instrumentación.

Todas las materias primas fueron obtenidas de proveedores comerciales y usadas sin una previa purificación. Los disolventes fueron secados mediante métodos estandarizados o destilados dependiendo de la finalidad del uso. Las reacciones fueron monitoreadas por CCF en placas de gel de sílica (ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄) y reveladas bajo la exposición de una lámpara de luz UV₂₅₄. Los puntos de fusión fueron determinados usando el aparato Electrothermal Mel-Temp® y no se corrigieron. Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos usando el espectrofotómetro Perkin-Elmer 400 FT-IR/FT-FIR, el número de onda está descrito en cm⁻¹. Los espectros de UV-Vis fueron obtenidos utilizando los espectrofotómetros: Thermo Scientific Evolution y el HORIBA Scientific. 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 ¹H, ¹³C, ¹¹B y ¹⁹F fueron obtenidos empleando los espectrofotómetros Varian Unity Inova 300 MHz, JEOL ECA 500 MHz y Bruker 500 MHz, se muestran los desplazamientos químicos relativos con respecto a Si(CH₃)₄, CDCl₃, BF₃OEt₂, CFCl₃. Los espectros de masas de alta resolución fueron adquiridos con el espectrómetro Agilent Technologies ESI TOF. Los cristales adecuados para los compuestos **2.5a**, **2.5b**, **2.5c** se montaron en una fibra de vidrio y se recogieron los datos cristalográficos con un difractor Oxford Diffraction Gemini “A” con un detector de área CCD con $\lambda_{\text{MoK}\alpha} = 0,71073 \text{ \AA}$ y un monocromador de grafito. Para la recopilación e integración de datos se usaron los paquetes de software CrysAlisPro y CrysAlis RED. Para los cálculos NTO de los compuestos **2.5a-2.5c** se utilizó el equipo de super cómputo *Miztli* y el programa Gaussian 09, mientras que para la optimización de la geometría y los estudios NTO de los compuestos **3.7a** y **3.7b** se utilizó el equipo de cómputo Workstation Móvil Dell precisión M6700 y el programa Gaussian 09.

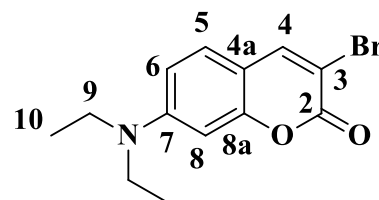
4.2. Síntesis y caracterización.

7-(dietilamino)-2H-cromen-2-ona (2.1). 4-dietilaminosalicilaldehído (11.40 g, 59.0 mmol), malonato de dietilo (18 mL, 118.0 mmol) y piperidina (6 mL) fueron disueltos en etanol absoluto (150 mL) y la disolución resultante fue calentada a reflujo por 24 h. El etanol fue evaporado a presión reducida, y se adicionaron HCl concentrado (100 mL) y ácido acético glacial (100 mL) bajo



condiciones de reflujo por 18 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y después se colocó en un baño de hielo. Se añadieron lentejas de NaOH hasta pH = 5.0, se observó la formación de un precipitado inmediatamente. El sólido se filtró, se lavó con agua, se secó y se purificó por cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y diclorometano como eluyente. Se obtuvieron 10.34 g de un sólido color amarillo pálido correspondiente al compuesto **2.1** con un rendimiento del 81%. $R_f = 0.35$ (hexano/acetato de etilo, 8:2). Punto de fusión: 86-88 °C. **IR** (ATR, ν , cm^{-1}): 3112, 2970, 2927, 1713, 1616, 1582, 1541, 1408, 1385, 1347, 1257, 1203, 1071. **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7.54 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-4), 7.26 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-5), 6.58 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H, H-6), 6.51 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-8), 6.05 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-3), 3.43 (c, $J = 7.1$ Hz, 4H, H-9), 1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, H-10). **RMN ^{13}C** (75.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 162.2 (C-2), 156.6 (C-8a), 150.6 (C-7), 143.6 (C-4), 128.7 (C-5), 109.0 (C-3), 108.6 (C-6), 108.2 (C-4a), 97.4 (C-8), 44.4 (C-9), 12.3 (C-10). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2 + \text{H}^+$ 218.1176, encontrado 218.1175.

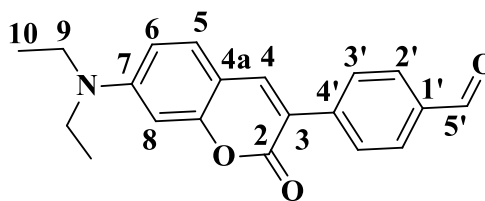
3-bromo-7-(dietilamino)-2H-cromen-2-ona (2.2). Este compuesto fue sintetizado siguiendo el procedimiento descrito en la literatura¹ usando 7-(dietilamino)cumarina (6.13 g, 28.2 mmol) en ácido acético (100 mL) y Br_2 (1.73 mL, 33.8 mmol). La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 50 min, el sólido color anaranjado fue filtrado, lavado con agua y secado. El compuesto se purificó mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel como fase estacionaria y como eluyente una mezcla de diclorometano/metanol



(95:5). Se obtuvieron 8.35 g de un sólido amarillo correspondiente al compuesto **2.2** con un rendimiento del 82%. Punto de fusión: 130-132 °C. **IR** (ATR, ν , cm^{-1}): 3057, 2979, 2970, 2932, 2904, 2871, 2046, 1917, 1864, 1719, 1691, 1611, 1581, 1508, 1349, 1235, 1129. **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7.88 (s, 1H, H-4), 7.21 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-5), 6.59 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H, H-6), 6.48 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-8), 3.41 (c, $J = 7.1$ Hz, 4H, H-9), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, H-10). **RMN ^{13}C** (75.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 158.3 (C-2), 156.0 (C-8a), 150.8 (C-7), 144.7 (C-4), 128.3 (C-5), 109.3 (C-6), 108.9 (C-4a), 102.9 (C-3), 97.2 (C-8), 44.9 (C-9), 12.4 (C-10). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{BrNO}_2 + \text{H}^+$ 296.0286, encontrado 296.0270

4-(7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)benzaldehído (2.3a). El compuesto **2.3a** fue sintetizado siguiendo el procedimiento descrito en

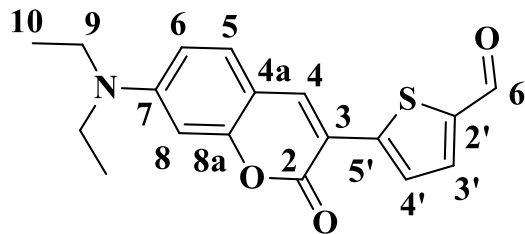
la literatura² usando el compuesto **2.2** (0.98 g, 3.33 mmol), ácido 4-formilfenilborónico (1.00 g, 6.67 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.19 g, 1.67 mmol, 5% mol), K_2CO_3 (1.38 g, 10 mmol) y una mezcla de



etanol (25 mL)/agua (50 mL)/tolueno (25 mL) bajo atmósfera de N_2 . Se obtuvieron 0.91 g de un sólido amarillo correspondiente al compuesto **2.3a** con un rendimiento del 85%. $R_f = 0.29$ (hexano/acetato de etilo, 8:2). Punto de fusión: 126-128 °C. **IR** (ATR, ν , cm^{-1}): 3072, 2974, 2925, 2724, 1697, 1616, 1585, 1560, 1516, 1502, 1466, 1345, 1211, 1169, 1133. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 10.01 (s, 1H, H-5'), 7.89 (s, 4H, H-2', H-3'), 7.79 (s, 1H, H-4), 7.33 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-5), 6.62 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.53 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-8), 4.43 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, H-9), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, H-10). **RMN ^{13}C** (100.6 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 191.8 (C-5'), 161.1 (C-2), 156.5 (C-8a), 151.0 (C-7), 142.0 (C-4'), 141.7 (C-4), 135.2 (C-1'), 129.7 (C-2'), 129.4 (C-5), 128.6 (C-3'), 119.1 (C-3), 109.4 (C-6), 109.0 (C-4a), 97.2 (C-8), 45.0 (C-9), 12.4 (C-10). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_3 + \text{H}^+$ 322.1438, encontrado 322.1441.

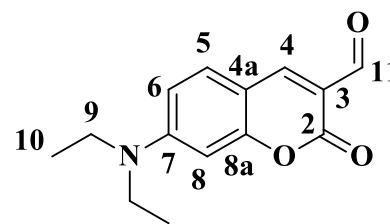
5-(7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofen-2-carbaldehído (2.3b). El compuesto **2.2** (1.00 g, 3.33 mmol), ácido 5-formiltiofen-2-ilborónico (1.00 g, 6.67 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.19 g, 1.67 mmol, 5% mol) y K_2CO_3 (1.38 g, 10 mmol) fueron disueltos en etanol (60

mL) bajo atmósfera de nitrógeno. Después el matraz fue desoxigenado y purgado con N₂, la mezcla de reacción se puso a reflujo durante 2 h. El sólido resultante color naranja se filtró, se lavó y se secó. Se obtuvieron 0.85 g de un sólido amarillo correspondiente al compuesto **2.3b** con un rendimiento del 79%. $R_f = 0.19$ (hexano/acetato de etilo, 8:2). Punto de fusión: 216-218 °C. **IR** (ATR, ν , cm⁻¹): 3074, 2969,



2695, 1916, 1683, 1653, 1617, 1587, 1510, 1411, 1351, 1260, 1232, 1134. **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 9.90 (s, 1H, H-6'), 8.02 (s, 1H, H-4), 7.76 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, H-4'), 7.72 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.36 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-5), 6.64 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H, H-6), 6.53 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-8), 3.46 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, H-9), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, H-10). **RMN** ¹³C (100.6 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 182.8 (C-6'), 159.9 (C-2), 156.3 (C-8a), 151.5 (C-7), 147.7 (C-5'), 142.0 (C-2'), 139.2 (C-4), 136.4 (C-3'), 129.7 (C-5), 125.3 (C-4'), 112.9 (C-3), 109.7 (C-6), 108.4 (C-4a), 97.0 (C-8), 45.0 (C-9), 12.5 (C-10). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z C₁₈H₁₇NO₃+H⁺ 328.1002, encontrado 328.1004.

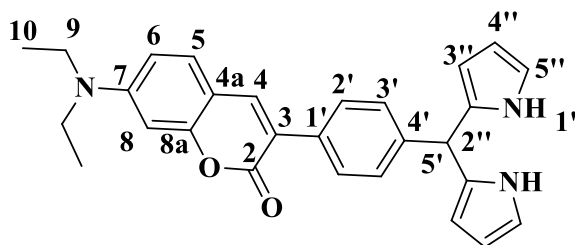
7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromeno-2-carbaldehído (2.3c). Este compuesto fue sintetizado siguiendo el procedimiento descrito en la literatura³ usando POCl₃ (2.4 mL, 25.82 mmol), el compuesto **2.1** (1.80 g, 8.29 mmol) y DMF (15 mL) con atmósfera de N₂. Se obtuvieron 1.40 g de un sólido color naranja correspondiente al compuesto **2.3c** con un rendimiento del 69%. $R_f = 0.19$ (hexano/acetato de etilo, 8:2). Punto de fusión: 164-165



°C. **IR** (ATR, ν , cm⁻¹): 3112, 2969, 2930, 2872, 1715, 1676, 1611, 1572, 1507, 1446, 1421, 1393, 1353, 1260, 1133. **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 10.06 (s, 1H, H-11), 8.19 (s, 1H, H-4), 7.35 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-5), 6.57 (dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H, H-6), 6.42 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-8), 3.41 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, H-9), 1.19 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, H-10). **RMN** ¹³C (75.4 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 187.9 (C-11), 161.8 (C-2), 158.9 (C-8a), 153.4 (C-7), 145.3 (C-4), 132.5 (C-5), 114.3 (C-3), 110.3 (C-6), 108.2 (C-4a), 97.1 (C-8), 45.3 (C-9), 12.4 (C-10). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z C₁₄H₁₅NO₃+H⁺ 246.1125, encontrado 246.1128.

3-(4-(di(1*H*-pirrol-2-il)metil)fenil)-7-(dietilamino)-2*H*-cromen-2-ona (2.4a). El

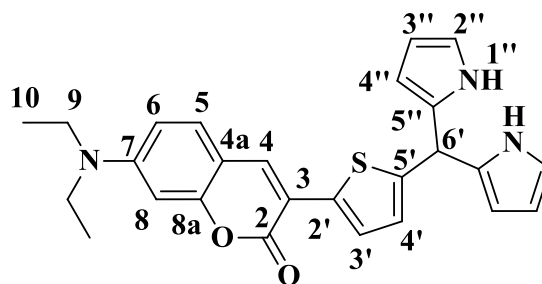
compuesto **2.3a** (0.99 g, 3.08 mmol) y pirrol (4.3 mL, 61.6 mmol) fueron disueltos en diclorometano anhidro (50 mL) bajo atmósfera de N₂, seguido de la adición de ácido trifluoroacético (0.24 mL, 3.08 mmol). La mezcla de reacción fue agitada durante 10 minutos a temperatura ambiente, después se llevó a cabo una extracción utilizando una



disolución de NaOH (0.1 M) y se lavó con agua. La fase orgánica se evaporó bajo presión reducida y, para eliminar el exceso de pirrol se formó una mezcla azeotrópica con etanol. El producto crudo fue soportado sobre celita y purificado mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel como fase estacionaria y como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo (85:15). Se obtuvieron 0.45 g de un sólido color café correspondiente al compuesto **2.4a** con un rendimiento del 34%. $R_f = 0.19$ (hexano/acetato de etilo, 8:2). Punto de fusión: 110 °C (descomposición). **IR** (ATR, ν , cm^{-1}): 3356, 3097, 3029, 2971, 2928, 1704, 1615, 1591, 1519, 1406, 1351, 1270, 1132. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 7.96 (s, 2H, H-1''), 7.65 (s, 1H, H-4), 7.62 (dt, $J = 8.3, 1.9$ Hz, 2H, H-2'), 7.29 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-5), 7.24 (dt, $J = 8.3, 1.9$ Hz, 2H, H-3'), 6.69-6.67 (m, 2H, H-5'), 6.59 (dd, $J = 8.8, 2.1$ Hz, 1H, H-6), 6.52 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-8), 6.15 (dd, $J = 6.0, 2.7$ Hz, 2H, H-4''), 5.96-5.92 (m, 2H, H-3''), 5.49 (s, 1H, H-5'), 3.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, H-9), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, H-10). **RMN ¹³C** (75.4 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 156.2 (C-2), 154.8 (C-8a), 150.6 (C-7), 141.5 (C-1'), 140.5 (C-4), 134.6 (C-4'), 132.3 (C-2''), 128.9 (C-5), 128.5 (C-2'), 128.4 (C-3'), 120.4 (C-3), 117.2 (C-5''), 109.1 (C-4a), 109.0 (C-6), 108.5 (C-4''), 107.1 (C-3''), 97.1 (C-8), 44.9 (C-9), 43.8 (C-5'), 12.5 (C-12). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z C₂₈H₂₇N₃O₂+H⁺ 438.2176, encontrado 438.2176.

3-(5-(di(1*H*-pirrol-2-il)metil)tiofen-2-il)-7-(dietilamino)-2*H*-cromen-2-ona (2.4b). El

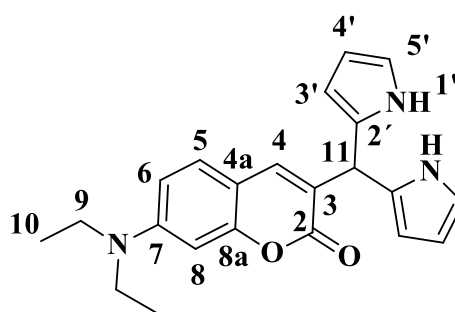
compuesto **2.4b** se sintetizó de manera análoga al compuesto **2.4a**, usando el compuesto **2.3b** (0.90 g, 2.75 mmol), pirrol (3.8 mL, 55.0 mmol), ácido trifluoroacético (0.21 mL, 2.7 mmol) y diclorometano anhidro (50 mL). Se obtuvieron 0.44 g de un sólido



color café correspondiente al compuesto **2.4b** con un rendimiento del 36%. $R_f = 0.19$ (hexano/acetato de etilo, 8:2). Punto de fusión: 148-150 °C. **IR** (ATR, ν , cm^{-1}): 3373, 3215, 3093, 2962, 2922, 2854, 2339, 1699, 1616, 1591, 1190, 1078, 964, 814, 706. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 8.09 (s, 2H, H-1''), 7.78 (s, 1H, H-4), 7.53 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-3'), 7.27 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-5), 6.87 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, H-4'), 6.72 (dd, $J = 4.1, 2.7$ Hz, 2H, H-5''), 6.59 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.51 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-8), 6.17 (dd, $J = 5.8, 2.7$ Hz, 2H, H-4''), 6.10-6.06 (m, 2H, H-3''), 5.74 (s, 1H, H-6'), 3.42 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, H-9), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, H-10). **RMN ^{13}C** (100.6 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 160.6 (C-2), 155.5 (C-8a), 150.5 (C-7), 145.7 (C-5'), 136.8 (C-2'), 136.7 (C-4), 131.9 (C-2''), 128.9 (C-5), 126.1 (C-4'), 125.0 (C-3'), 117.6 (C-5''), 114.6 (C-3), 109.4 (C-6), 108.8 (C-4a), 108.5 (C-4''), 107.1 (C-3''), 97.1 (C-8), 45.0 (C-9), 39.4 (C-6'), 12.6 (C-10). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2\text{S} + \text{H}^+$ 445.1740, encontrado 445.1740.

3-(di(1*H*-pirrol-2-il)metil)-7-(dietilamino)-2*H*-cromen-2-ona (2.4c). El compuesto **2.4c**

se sintetizó de manera análoga al compuesto **2.4a**, usando el compuesto **2.3c** (0.89 g, 3.6 mmol), pirrol (3.8 mL, 55.0 mmol), ácido trifluoroacético (0.21 mL, 3.6 mmol) y diclorometano anhidro (50 mL). Se obtuvieron 0.52 g de un sólido color café correspondiente al compuesto **2.4c** con un rendimiento del 36%. $R_f = 0.19$ (hexano/acetato de etilo, 8:2). Punto de fusión: 142-143 °C. **IR** (ATR, ν , cm^{-1}): 3352, 3219, 2972, 1689,

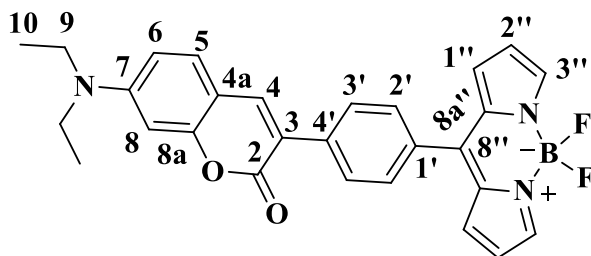


1594, 1514, 1412, 1350, 1238, 1194, 1132, 1105, 800, 713, 704. **RMN ^1H** (400 MHz,

CDCl₃, δ, ppm): 8.66 (s, 2H, H-1'), 7.43 (s, 1H, H-4), 7.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-5), 6.69-6.67 (m, 2H, H-5'), 6.53 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.44 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.13 (dd, *J* = 5.9, 2.9 Hz, 2H, H-4'), 6.00-5.97 (m, 2H, H-3'), 5.42 (s, 1H, H-11), 3.37 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, H-9), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, H-10). **RMN** ¹³C (100.6 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 163.3 (C-2), 155.8 (C-8a), 150.3 (C-7), 141.2 (C-4), 130.9 (C-2'), 128.7 (C-5), 122.1 (C-3), 117.3 (C-5'), 108.8 (C-6), 108.4 (C-4a), 108.1 (C-4'), 106.5 (C-3'), 96.9 (C-8), 44.7 (C-9), 40.0 (C-11), 12.4 (C-10). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para *m/z* C₂₂H₂₃N₃O₂+H⁺ 362.1863, encontrado 362.1865.

Meso-(4-7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)fen-1-il)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-

diaza-s-indaceno (2.5a). El compuesto **2.4a** (0.41 g, 0.9 mmol) y DDQ (2,3-diciano-5,6-diclorobenzoquinona) (0.28 g, 1.2 mmol) fueron disueltos en diclorometano anhidro (50 mL). La mezcla de reacción se purgó con N₂ y se agitó durante 1.5 h. Después se adicionó BF₃•OEt₂ (2.60 mL, 20.7 mmol) gota a gota, seguido de la adición de Et₃N (2.90 mL, 20.7 mmol). La reacción se agitó durante dos horas y después se lavó con H₂O, los disolventes orgánicos se eliminaron bajo presión reducida con

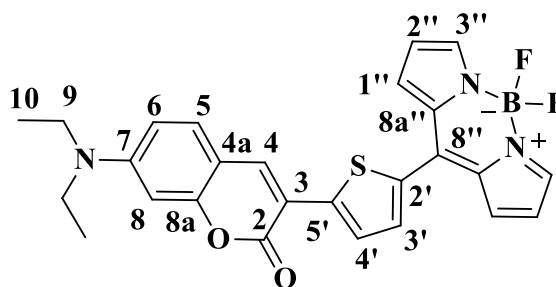


ayuda de un rotaevaporador. El producto crudo se soportó sobre celita y se purificó por medio de cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil un sistema de elución hexano:acetato de etilo (85:15). Se obtuvieron 0.14 g de un sólido color verde correspondiente al compuesto **2.5a** con un rendimiento del 31%. *R_f* = 0.19 (hexano/acetato de etilo, 8:2). Punto de fusión: 214-216 °C. **IR** (ATR, ν, cm⁻¹): 3185, 3113, 2970, 1710, 1619, 1591, 1558, 1539, 1521, 1412, 1385, 1356, 1108, 1069, 984, 771. **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 7.95 (s, 2H, H-3''), 7.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3'), 7.84 (s, 1H, H-4), 7.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2'), 7.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-5), 7.02 (d, *J* = 3.8 Hz, 2H, H-1''), 6.64 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H, H-6), 6.58-6.55 (m, 3H, H-8, H-2''), 3.46 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, H-9), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, H-10). **RMN** ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 161.4 (C-2), 156.4 (C-8a), 151.0 (C-7), 147.0 (C-1''), 143.9 (C-3''), 141.4 (C-4), 138.7 (C-4'), 134.8 (C-8''), 132.8 (C-8a''), 131.5 (C-1'), 130.6 (C-2'), 129.3 (C-5), 128.2

(C-3'), 118.9 (C-3), 118.5 (C-2''), 109.2 (C-6), 108.9 (C-4a), 97.0 (C-8), 44.9 (C-9), 12.4 (C-10). **RMN ¹¹B** (160.4 MHz, CDCl₃, δ, ppm): -0.25 (t, J_{B-F} = 28.8 Hz). **RMN ¹⁹F** (282.4 MHz, CDCl₃, δ, ppm): -145.12 (c, J_{B-F} = 28.8 Hz). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z C₂₈H₂₄BN₃O₂F₂+H⁺ 484.2002, encontrado 484.2000.

Meso-(5-(7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)tiofenil-2-il)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (2.5b). El compuesto **2.5b** se sintetizó de manera análoga al compuesto

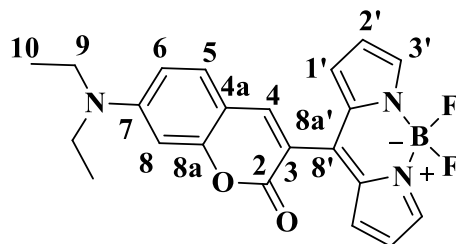
2.5a, usando el compuesto **2.4b** (0.43 g, 1.0 mmol), DDQ (0.29 g, 1.3 mmol), diclorometano anhidro (50 mL), BF₃•OEt₂ (2.70 mL, 21.0 mmol) y Et₃N (2.90 mL, 21.0 mmol). Se obtuvieron 0.12 g de un sólido color negro correspondiente al compuesto



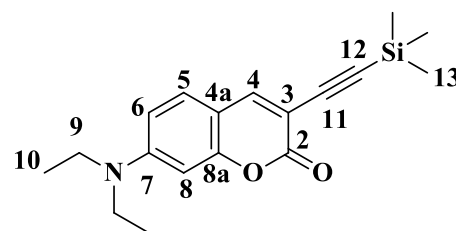
2.5b con un rendimiento del 26%. R_f = 0.12 (hexano/acetato de etilo, 8:2). Punto de fusión: 188-190 °C. **IR** (ATR, ν , cm⁻¹): 3142, 3123, 3097, 3026, 2964, 2925, 1696, 1618, 1590, 1533, 1385, 1258, 1114, 955, 769. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 8.05 (s, 1H, H-4), 7.91 (s, 2H, H-3''), 7.76 (d, J = 4.1 Hz, 1H, H-4'), 7.59 (d, J = 4.1 Hz, 1H, H-3'), 7.41-7.37 (m, 3H, H-1'', H-5), 6.66 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H, H-6), 6.58 (dd, J = 4.2, 1.9 Hz, 2H, H-2''), 6.56 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-8), 3.47 (q, J = 7.1 Hz, 4H, H-9), 1.25 (t, J = 7.1 Hz, 6H, H-10). **RMN ¹³C** (125.7 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 160.3 (C-2), 156.0 (C-8a), 151.4 (C-7), 145.0 (C-5'), 142.8 (C-3''), 139.7 (C-2'), 138.0 (C-4), 134.6 (C-8''), 133.9 (C-3'), 133.8 (C-8a''), 131.2 (C-1''), 129.6 (C-5), 124.7 (C-4'), 118.1 (C-2''), 112.8 (C-3), 109.8 (C-6), 108.5 (C-4a), 97.0 (C-8), 45.0 (C-9), 12.4 (C-10). **RMN ¹¹B** (160.4 MHz, CDCl₃, δ, ppm): -0.31 (t, J_{B-F} = 28.8 Hz). **RMN ¹⁹F** (282.4 MHz, CDCl₃, δ, ppm): -145.38 (c, J_{B-F} = 28.8 Hz). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z C₂₆H₂₂BN₃O₂F₂S+H⁺ 490.1567, encontrado 490.1569.

Meso-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4b-diaza-s-indaceno (2.5c). El compuesto **2.5c** se sintetizó de manera análoga al compuesto **2.5a**, usando el compuesto **2.4c** (0.24 g, 0.7 mmol), DDQ (0.19 g, 0.9 mmol), diclorometano anhidro (50 mL), BF₃•OEt₂ (1.70 mL, 13.2 mmol) y Et₃N (1.40 mL, 10.0 mmol). Se

obtuvieron 0.08 g de un sólido color verde correspondiente al compuesto **2.5c** con un rendimiento del 30%. $R_f = 0.12$ (hexano/acetato de etilo, 8:2). Punto de fusión: 83 °C (descomposición). **IR** (ATR, ν , cm^{-1}): 3106, 2971, 2927, 1713, 1616, 1582, 1541, 1509, 1408, 1385, 1347, 1257, 1071, 1033, 955, 762. **RMN ^1H** (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7.89 (s, 2H, H-3'), 7.81 (s, 1H, H-4), 7.35 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-5), 7.10 (d, $J = 4.2$ Hz, 2H, H-1'), 6.65 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H, H-6), 6.56 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-8), 6.52 (dd, $J = 4.2, 1.4$ Hz, 2H, H-2'), 3.48 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, H-9), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, H-10). **RMN ^{13}C** (125.7 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 160.1 (C-2), 157.4 (C-8a), 152.2 (C-7), 146.1 (C-4), 144.2 (C-3'), 141.2 (C-8'), 135.1 (C-8a'), 130.3 (C-5), 130.2 (C-1'), 118.3 (C-2'), 113.1 (C-3), 109.6 (C-6), 107.6 (C-4a), 97.0 (C-8), 45.08 (C-9), 12.4 (C-10). **RMN ^{11}B** (160.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -0.36 (t, $J_{\text{B-F}} = 28.8$ Hz). **RMN ^{19}F** (282.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -147.87 (c, $J = 28.8$ Hz), -142.77 (q, $J = 28.8$ Hz). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{BN}_3\text{O}_2\text{F}_2 + \text{H}^+$ 408.1689, encontrado 408.1691.

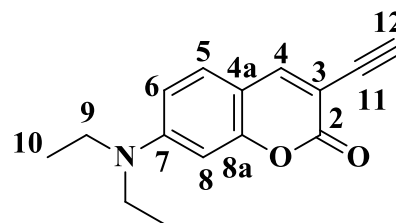


7-(diethylamino)-3-((trimetilsilil)etnil)-2H-cromen-2-ona (3.3). El compuesto **3.3** se sintetizó por medio una reacción de acoplamiento de Sonogashira a partir de 0.5 g (3.4 mmol) del compuesto **2.1** y 1.4 mL (10 mmol) de etiniltrimetilsilano. En un matraz bola y bajo atmósfera de N_2 se disolvió el compuesto **2.1** en 10 mL de DIPA (diisopropilamina), se adicionaron 0.1 g (0.5 mmol) de CuI y 0.2 g de tetrakis(trifenilfosfin)paladio (0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) (0.34 mmol). En otro matraz bola, también en atmósfera de N_2 , se disolvieron los 1.4 mL de etiniltrimetilsilano en 5 mL de cloroformo. Al matraz que contenía el compuesto **2.2** y los catalizadores, se le adicionó gota a gota la disolución de etiniltrimetilsilano. La reacción se calentó a 60 °C durante 1 hora y media. Se monitoreó 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, utilizando sílica gel



como fase estacionaria y como fase móvil un sistema de elución hexano/acetato de etilo 9:1. Se obtuvieron 0.9 g de un sólido amarillo con un rendimiento del 85%. Punto de fusión: 148-150 °C. **IR** (ATR, ν , cm^{-1}): 3039, 3064, 2908, 2149, 1708, 838, 637. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3 , δ , 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), 3.41 (4H, c, $J = 7.1$ Hz, H-9), 1.21 (6H, t, $J = 7.1$ Hz, H-10), 0.25 (9H, s, H-13). **RMN ^{13}C** (100.6 MHz, CDCl_3 , δ , 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).

7-(dietilamino)-3-etinil-2H-cromen-2-ona (3.4). El compuesto **3.4** se obtuvo a partir de 0.7 g (2.2 mmol) del compuesto **3.3** se disolvió en 100 mL de metanol y se adicionaron 0.9 g (6.7 mmol) de K_2CO_3 , la mezcla de reacción se dejó en agitación y a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se hizo una extracción utilizando 50 mL de diclorometano como fase orgánica y 50 mL de H_2O .

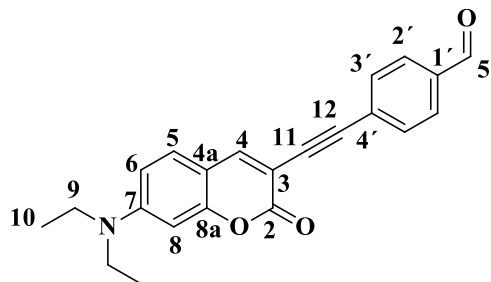


El producto crudo se purificó por cromatografía en columna usando como fase estacionaria alúmina y como fase móvil un sistema de elución hexano/acetato de etilo 9:1. Se obtuvieron 0.46 g un sólido color amarillo con un rendimiento del 85%. Punto de fusión: 136-138 °C. **IR** (ATR, ν , cm^{-1}): 3406, 3238, 3023, 1705, 1590, 1204. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3 , δ , 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, c, $J = 7.1$ Hz, H-9), 3.25 (1H, s, H-12), 1.21 (6H, t, $J = 7.1$ Hz, H-10). **RMN ^{13}C** (100.6 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 161.1 (C-2), 156.4 (C-8a), 151.3 (C-7), 146.9 (C-4), 129.0 (C-5), 109.2 (C-6), 107.9 (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).

4-((7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)etnil)benzaldehído (3.5a). El compuesto **3.5a** se sintetizó a partir de 0.42 g (1.74 mmol) del compuesto **3.4** y 0.29 g (1.56 mmol) de *p*-bromobenzaldehído. En un matraz bola se disolvió el *p*-bromobenzaldehído en 10 mL de DIPA (diisopropilamina), se adicionaron 0.06 g (0.09 mmol) de CuI y 0.09 g (0.08 mmol) de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ bajo atmósfera inerte de nitrógeno. En otro matraz bola se disolvió el

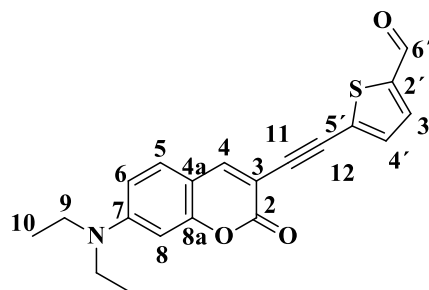
compuesto **3.4** en 5 mL de cloroformo. Al matraz que contenía el *p*-bromobenzaldehído y los catalizadores se le adicionó gota a gota la disolución del compuesto **3.4**. La reacción se llevó a cabo en atmósfera inerte de N₂ durante 1.5

h 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 0.44 g correspondientes a un rendimiento del 81%. Punto de fusión: 126-128 °C. **IR** (ATR, ν , cm⁻¹): 3053, 2970, 2206, 1724, 1712, 1614, 1584. **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 10.01 (1H, s, H-5'), 7.84 (1H, s, H-4,), 7.84 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H-2'), 7.68 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H-3'), 7.27 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5), 6.61 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, H-6), 6.51 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-8), 3.44 (6H, c, *J* = 7.1 Hz, H-9), 1,23 (4H, t, *J* = 7.0 Hz, H-10). **RMN** ¹³C (100.6 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 191.3 (C-5'), 160.6 (C-2), 156.4 (C-8a), 151.4 (C-7), 146.3 (C-4), 135.2 (C-1'), 132.0 (C-3'), 129.4 (C-2'), 129.3 (C-4'), 129.2 (C-5), 109.3 (C-6), 108.3 (C-4a), 103.6 (C-3), 97.2 (C-8), 92.3 (C-12), 89.0 (C-11), 44.9 (C-9), 12.4 (C-10). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para *m/z* C₂₂H₁₉NO₃+H⁺ 346.1400, encontrado 346.1438.



5-((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)etynil)tiófeno-2-carbaldehído (**3.5b**). El

compuesto **3.5b** se sintetizó de manera análoga al compuesto **3.5a**, a partir de 0.5 g (2.1 mmol) del compuesto **3.4b** y 0.35 g (1.85 mmol) de 5-bromotiofeno-2-carbaldehído, 5 mL de DIPA (diisopropilamina), 0.02 g (0.1 mmol) de CuI y 0.11 g (0.09 mmol) de Pd(PPh₃)₄ y 5 mL de cloroformo. Se obtuvieron 0.62 g de un sólido color rojo

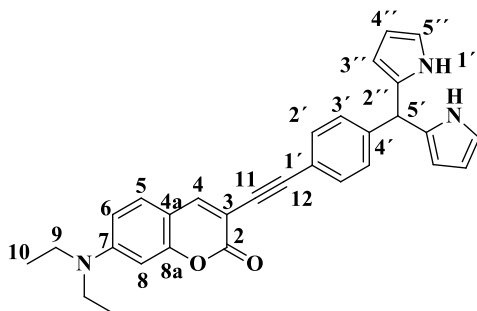


correspondiente a un rendimiento del 94%. Punto de fusión: 160-162 °C. **IR** (ATR, ν , cm⁻¹): 3196, 3068, 3044, 2185, 1718, 1589, 1524. **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 9.86 (1H, s, H-6'), 7.84 (1H, s, H-4), 7.65 (1H, d, *J* = 4.0 Hz, H-3'), 7.33 (1H, d, *J* = 4.0 Hz H-4'), 7.27 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5), 6.61 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, H-6), 6.49 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 3.44 (4H, q, *J* = 7.0 Hz, H-9), 1.23 (6H, t, *J* = 7.0 Hz, H-10). **RMN** ¹³C (100.6 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 182.4 (C-6'), 160.4 (C-2), 156.7 (C-8a), 151.7 (C-7), 146.7 (C-4),

143.9 (C-2'), 136.2 (C-5'), 132.8 (C-3'), 129.5 (C-5), 109.6 (C-6), 108.4 (C-4a), 103.1 (C-3), 97.3 (C-8), 93.6 (C-12), 85.8 (C-11), 45.2 (C-9), 12.5 (C-10). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z $C_{20}H_{17}NO_3S+H^+$ 352.1002, encontrado 352.1001.

3((4-(di(1*H*-pirrol-2-il)metil)fenil)etinil)-7-(dietilamino)2*H*-cromen-2-ona (3.6a). El

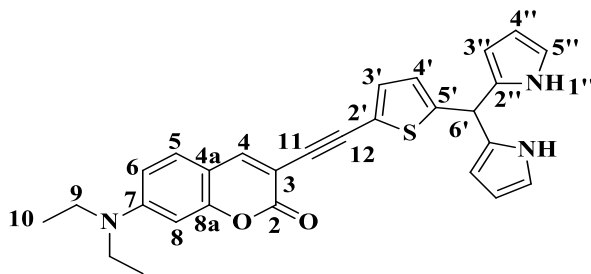
compuesto **3.6a** se sintetizó a partir de 0.5 g (1.4 mmol) del compuesto **3.5a** al hacerlo reaccionar con 40 equivalentes de pirrol (4.0 mL, 57 mmol) y 0.11 mL (1.4 mmol) de ácido trifluoroacético. La reacción se llevó a cabo utilizando 5 mL de diclorometano como disolvente bajo atmósfera de N_2 a temperatura ambiente. La reacción se completó después de 15 minutos, la mezcla de reacción se extrajo, utilizando 10 mL de



una disolución saturada de Na_2CO_3 ; se recolectó la fase orgánica. 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 utilizando como fase estacionaria alúmina con un sistema de elución hexano/acetato de etilo 9:1. Se obtuvieron 0.32 g de un sólido café correspondiente al compuesto **6e** con un rendimiento del 55 %. Punto de fusión: 140-142 °C. **IR** (ATR, ν , cm^{-1}): 3330, 3096, 2971, 1611, 1688, 1131, 721. **RMN 1H** (300 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 7.96 (1H, sa, H-1'), 7.78 (1H, s, H-4), 7.48 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-2'), 7.25 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 7.17 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-3'), 6.73-6.71 (2H, m, H-5'), 6.59 (1H, dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, H-6), 6.49 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.16 (2H, dd, $J = 5.5, 2.7$ Hz, H-4'), 5.93-5.91 (2H, m, H-3'), 5.49 (1H, s, H-5'), 3.43 (6H, c, $J = 7.0$ Hz, H-9), 1.22 (4H, t, $J = 7.0$ Hz, H-10). **RMN ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$, δ , ppm): 160.6 (C-2), 155.7 (C-8a), 150.6 (C-7), 145.1 (C-4), 142.1 (C-4'), 131.6 (C-5), 131.4 (C-2'), 128.5 (C-2''), 127.9 (C-3'), 121.1 (C-1'), 116.9 (C-5''), 108.8 (C-6), 108.0 (C-4a), 107.9 (C-4''), 106.9 (C-3''), 104.1 (C-3), 96.8 (C-8), 92.7 (C-12), 84.2 (C-11), 44.5 (C-9), 43.4 (C-5'), 12.0 (C-10). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z $C_{30}H_{28}N_3O_2+H^+$ 462.5500, encontrado 462.2176.

3-((5-(di(1*H*-pirrol-2-il)metil)tiofen-2-il)etnil)-7-(dietilamino)2*H*-cromen-2-ona (3.6b)

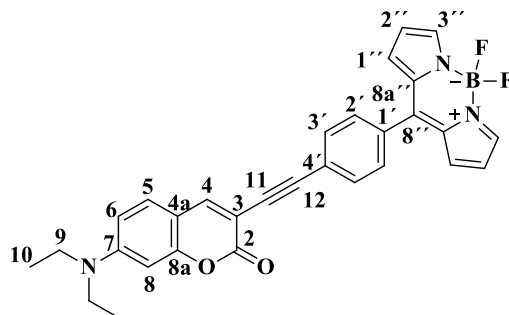
El compuesto **3.6b** se sintetizó siguiendo la misma metodología que en la obtención del compuesto **3.6a** a partir de 0.5 g (1.42 mmol) del compuesto **3.5b** al hacerlo reaccionar con 40 equivalentes de pirrol (4.0 mL, 57 mmol) y 0.11 mL (1.42 mmol) de ácido trifluoroacético. Se obtuvieron 0.35 g un sólido café correspondiente al



compuesto **3.6b** con un rendimiento del 53%. Punto de fusión: 152-154 °C. **IR** (ATR, ν , cm^{-1}): 3351, 3098, 2198, 1708, 1614, 1585, 1511, 718. **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 8.07 (2H, sa, H-1''), 7.72 (1H, s, H-4), 7.23 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-5), 7.13 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-3'), 6.76 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-4'), 6.72-6.71 (2H, m, H-5''), 6.57 (1H, dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, H-6), 6.48 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.17 (2H, dd, $J = 5.7, 2.6$ Hz, H-4''), 6.06-6.05 (2H, d, $J = 1.4$ Hz, H-3''), 5.71 (1H, s, H-6'), 3.42 (4H, q, $J = 7.1$ Hz, H-9), 1.23 (6H, t, $J = 7.1$ Hz, H-10). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}+\text{H}^+$ 468.1740, encontrado 468.1743.

4-(((7-(dietilamino)-2-oxo-2*H*-cromen-3-il)etnil)fenil)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazas-indaceno (3.7a)

El compuesto **3.7a** se sintetizó a partir de 0.05 g (0.1 mmol) del compuesto **3.6a**, se llevó a cabo una reacción de oxidación del compuesto **3.6a** con 0.03 g (0.13 mmol) de DDQ (2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona) empleando 5 mL de diclorometano, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 h.

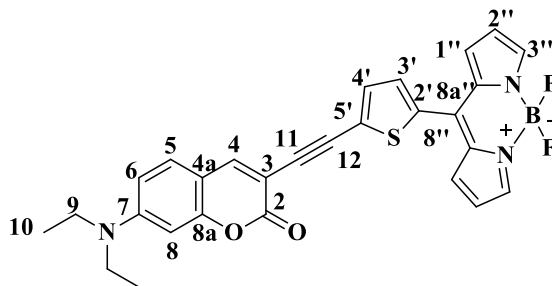


Después se colocó el sistema en hielo y se adicionaron 0.22 mL (1.62 mmol) de trietilamina anhidra y 0.27 mL (2.2 mmol) de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, la reacción se dejó a reflujo durante 2 h. La reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina, se realizó una extracción con agua y diclorometano, se evaporó la fase orgánica y se purificó el crudo por cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria alúmina y como fase móvil un sistema de elución 8:2 hexano:acetato de etilo. Se obtuvieron 0.027 g de un sólido color negro con un

rendimiento del 50%. Punto de fusión: 146-148 °C. **IR** (ATR, ν , cm^{-1}): 3129, 2967, 2923, 2203, 1719, 1561, 1520, 1388, 1075. **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7.95 (2H, sa, H-3'), 7.85 (1H, s, H-4), 7.69 (2H, d, $J = 7.9$ Hz, H-3'), 7.55 (2H, d, $J = 7.9$ Hz, H-2'), 7.28 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 6.95 (2H, sa, H-1'), 6.61 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 6.57 (2H, sa, H-2'), 6.51 (1H, sa, H-8), 3.47 (4H, c, $J = 7.1$ Hz, H-9), 1.26 (6H, t, $J = 7.1$ Hz, H-10). **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 160.7 (C-2), 156.4 (C-8a), 151.4 (C-7), 146.4 (C-1'), 146.1 (C-4), 144.1 (C-3'), 134.6 (C-8'), 133.3 (C-8a'), 131.5 (C-3'), 131.4 (C-5), 130.5 (C-2'), 129.1 (C-1'), 126.0 (C-4'), 118.6 (C-2'), 109.3 (C-6), 108.3 (C-4a), 103.8 (C-3), 97.2 (C-8), 92.1 (C-12), 87.8 (C-11), 44.9 (C-9), 12.4 (C-10) **RMN ^{11}B** (128 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 0.27 (t, $J_{\text{B-F}} = 28.3$ Hz). **RMN ^{19}F** (376 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -144.97 (q, $J_{\text{B-F}} = 28.3$ Hz). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{BF}_2\text{NO}_2 + \text{H}^+$ 508.1900, encontrado 508.2002.

5-(((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-cromen-3-il)etnil)tiofen-2-il)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (3.7b). El compuesto **3.7b** se sintetizó de manera análoga al compuesto **3.7a**, a partir de 0.2 g (0.42 mmol) del compuesto **3.6b**, 0.11 g (0.54 mmol) de DDQ (2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona)

empleando 5 mL de diclorometano, 1.1 mL (8.6 mmol) de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ y 0.9 mL (6.4 mmol) de trietilamina. Se obtuvieron 0.22 g de un sólido color negro-morado con un rendimiento del 53%. Punto de fusión: 114-



118 °C. **IR** (ATR, ν , 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 ^1H** (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7.90 (2H, s, H-3''), 7.80 (1H, s, H-4), 7.45 (1H, d, $J = 3.2$ Hz H-3'), 7.35 (1H, d, $J = 3.2$ Hz H-4'), 7.27-7.23 (3H, m, H-1'', H-5), 6.59-6.56 (3H, m, H-6, H-2''), 6.47 (1H, sa, H-8), 3.41 (4H, c, $J = 6.9$ Hz, H-9), 1.21 (6H, t, $J = 6.9$ Hz, H-10). **RMN ^{13}C** (100.6 MHz, CDCl_3 , δ , 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}B** (128 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 0.20 (t, $J_{\text{B-F}} = 28.4$ Hz). **RMN ^{19}F** (376

MHz, CDCl₃, δ , ppm): -145.15 (q, $J_{B-F} = 28.4$ Hz). **HRMS** (ESI-TOF): Calculado para m/z C₂₈H₂₂BF₂N₃O₂S+H⁺ 514.1567, encontrado 514.1568.

4.3. Referencias

1. H. Sun, H. Guo, W. Wu, X. Liu, J. Zhao, Coumarin phosphorescence observed with N[^]N Pt(II) bisacetylde complex and its applications for luminescent oxygen sensing and triplet-triplet-annihilation based upconversion, *Dalton Trans.*, 40 (2011) 7834–7841.
2. L. Liu, D. Huang, S.M. Draper, X. Yi, W. Wua, J. Zhao, Visible light-harvesting *trans* bis(alkylphosphine) platinum(II)-alkynyl complexes showing long-lived triplet excited states as triplet photosensitizers for triplet-triplet annihilation upconversion, *Dalton Trans.*, 42 (2013) 10694–10706.
3. S. Areti, J.K. Khedkar, S. Bandarua, R. Teotia, J. Bellare, Ch P. RAO, Coumarin-Imino-C2-Glucosyl conjugate as receptor for Cu (2+) in blood serum milieu, on silica gel sheet and in hep G2 cells and the characterization of the species of recognition, *Anal. Chim. Acta*, 873 (2015) 80–87.

CAPÍTULO 5

ANEXOS

5.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).

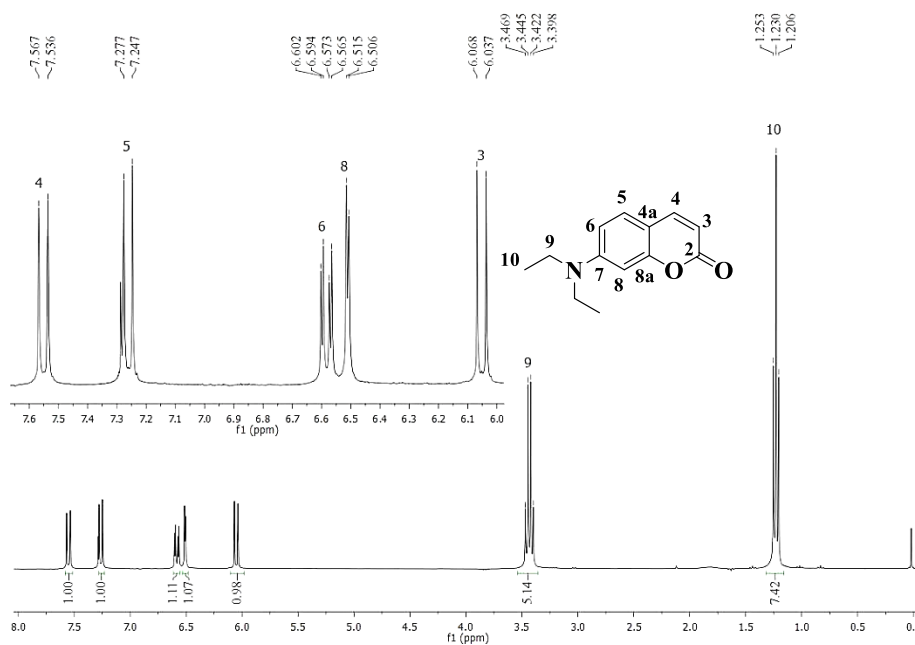


Figura 5.1. Espectro de RMN ^1H del compuesto **2.1** a 300 MHz en CDCl_3 .

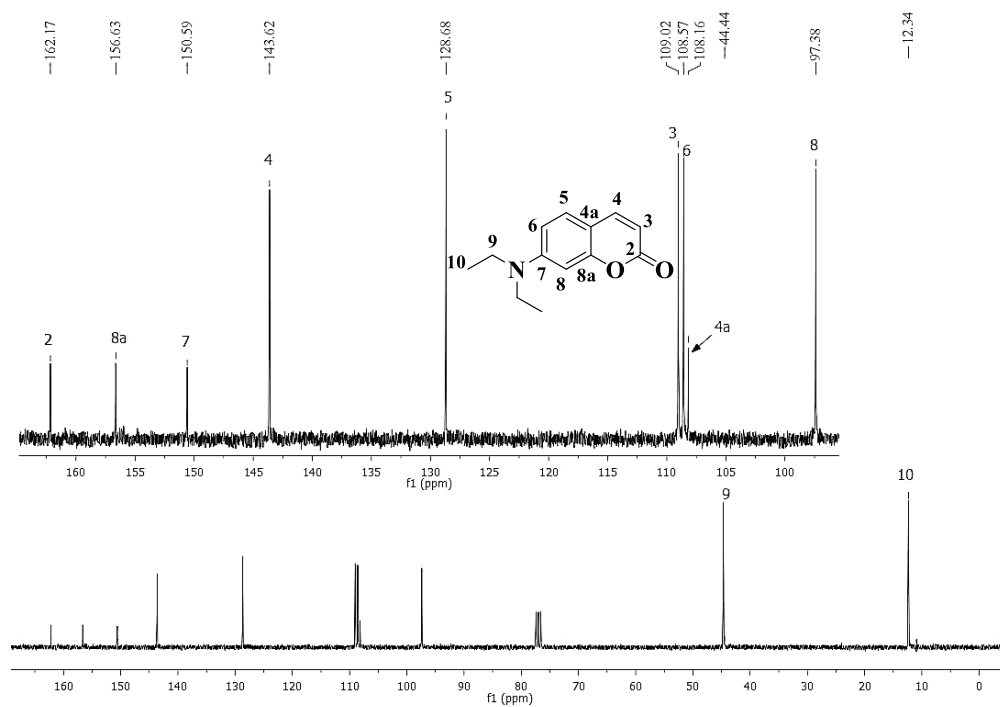


Figura 5.2. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **2.1** a 75.4 MHz en CDCl_3 .

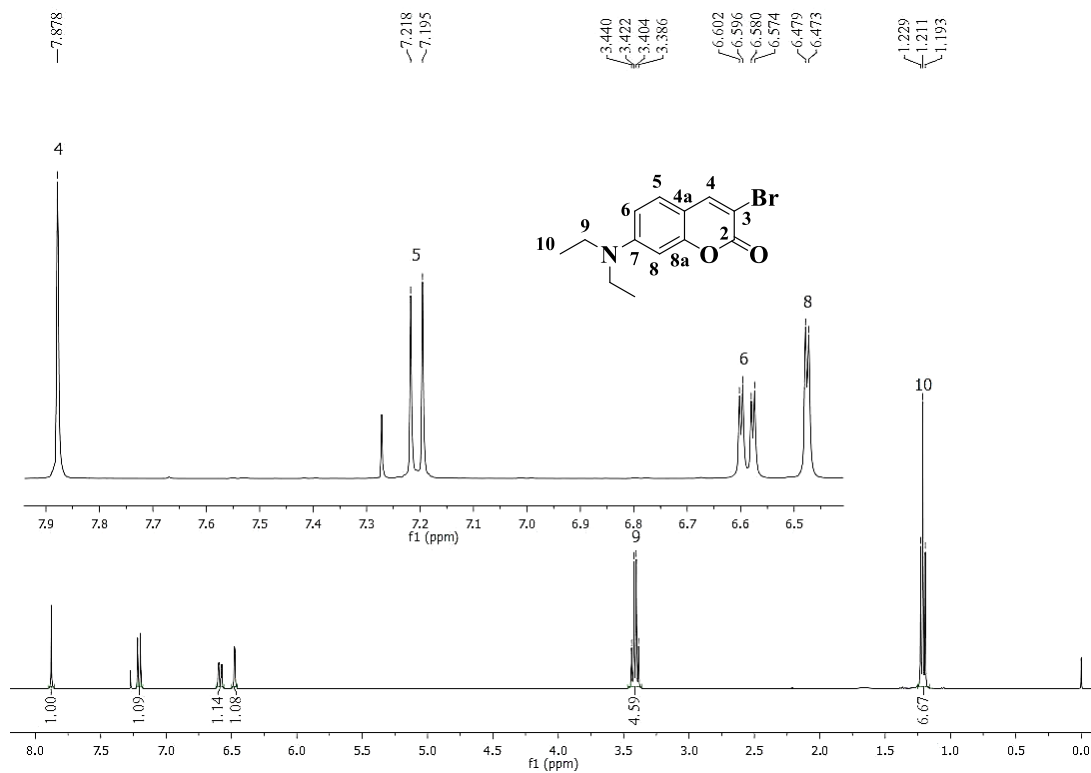


Figura 5.3. Espectro de RMN ^1H del compuesto **2.2** a 300 MHz en CDCl_3 .

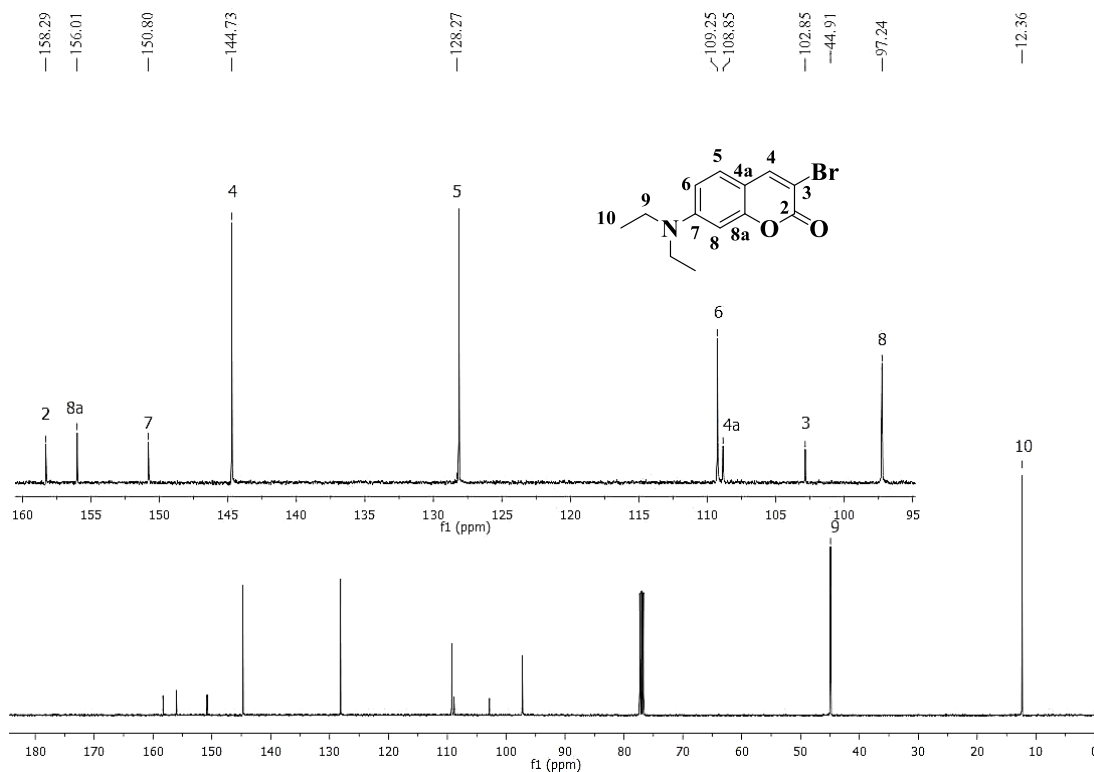


Figura 5.4. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **2.2** a 75.4 MHz en CDCl_3 .

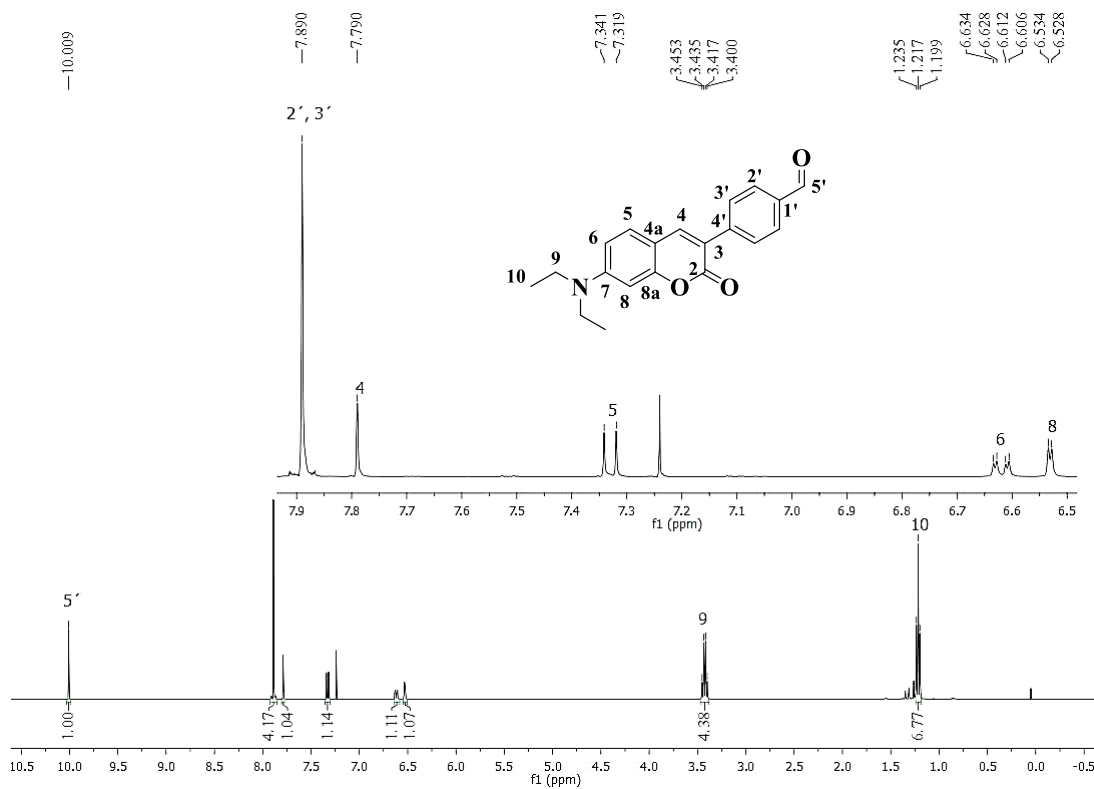


Figura 5.5. Espectro de RMN ^1H del compuesto **2.3a** a 400 MHz en CDCl_3 .

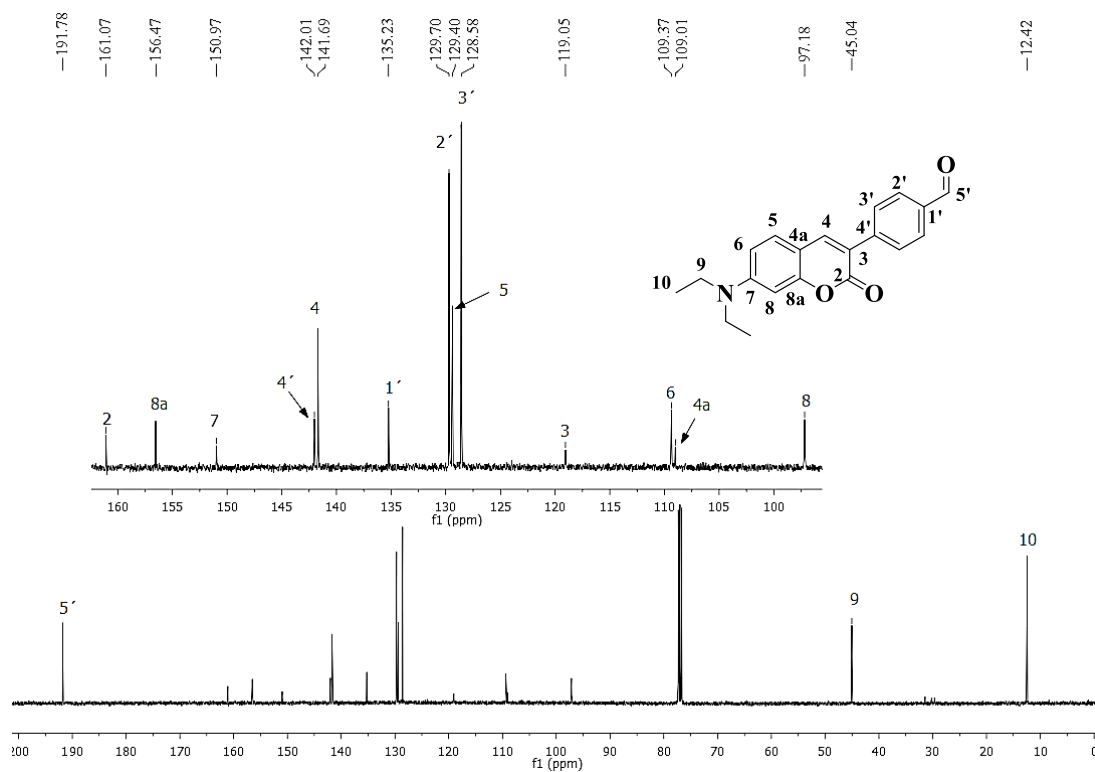


Figura 5.6. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **2.3a** a 100.6 MHz en CDCl_3 .

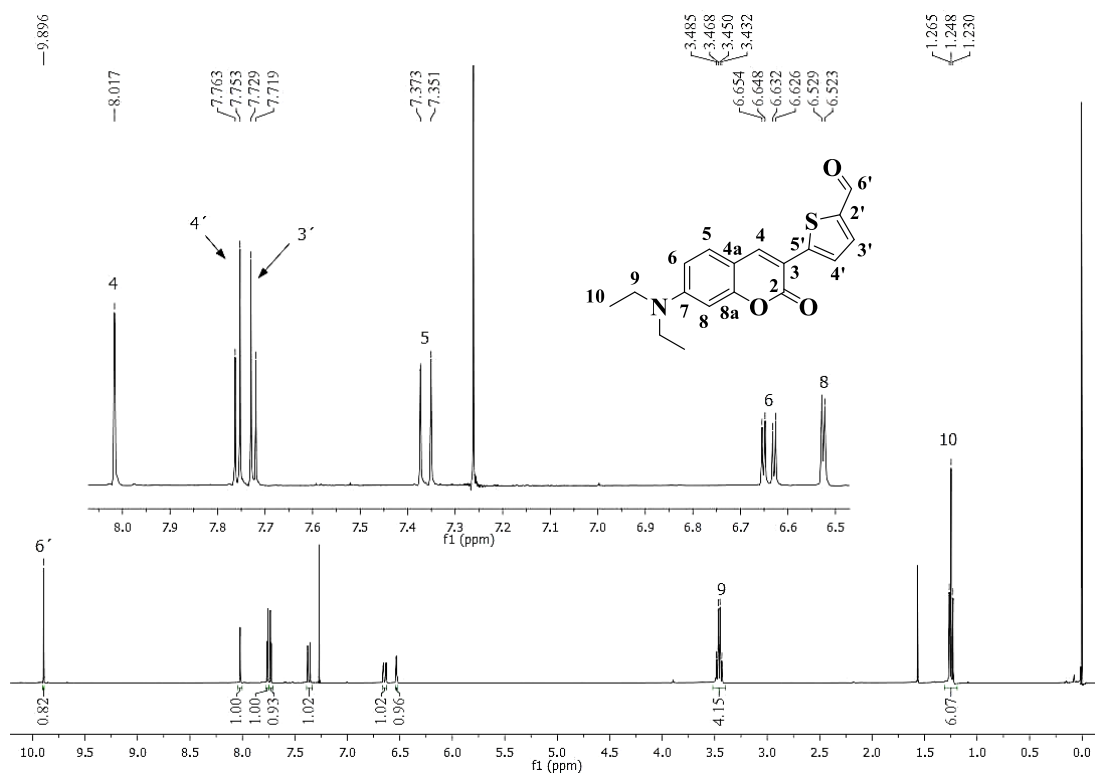


Figura 5.7. Espectro de RMN ^1H del compuesto **2.3b** a 400 MHz en CDCl_3 .

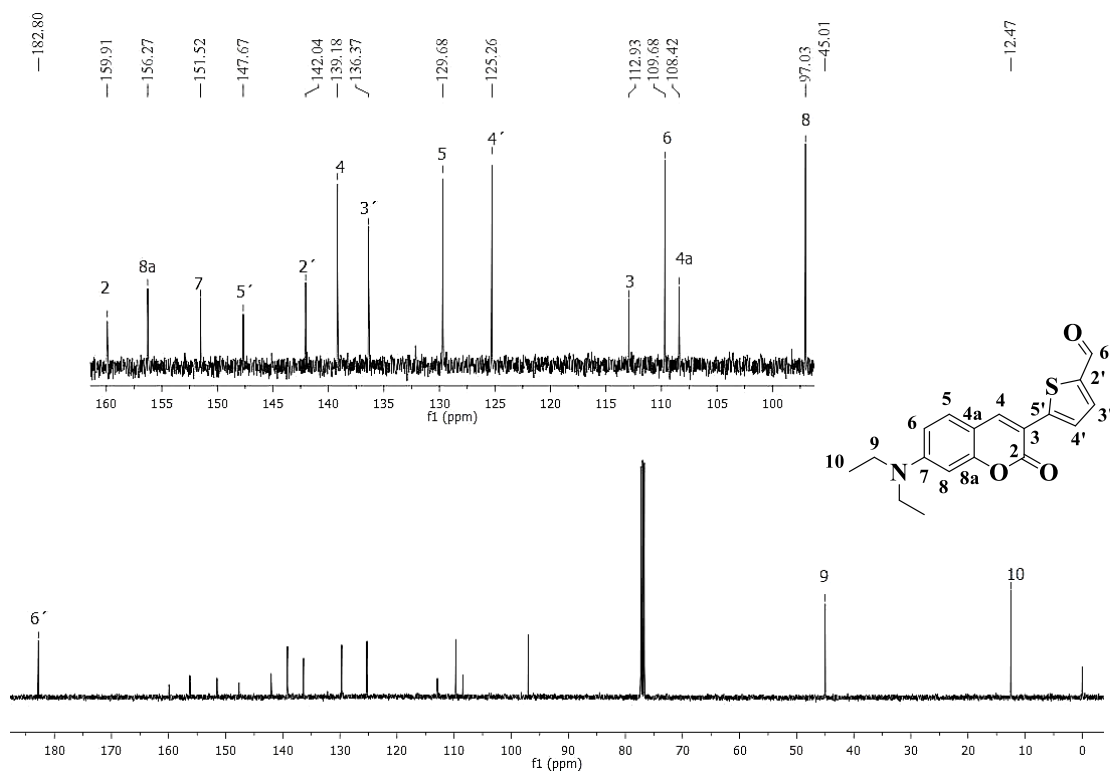


Figura 5.8. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **2.3b** a 100.6 MHz en CDCl_3 .

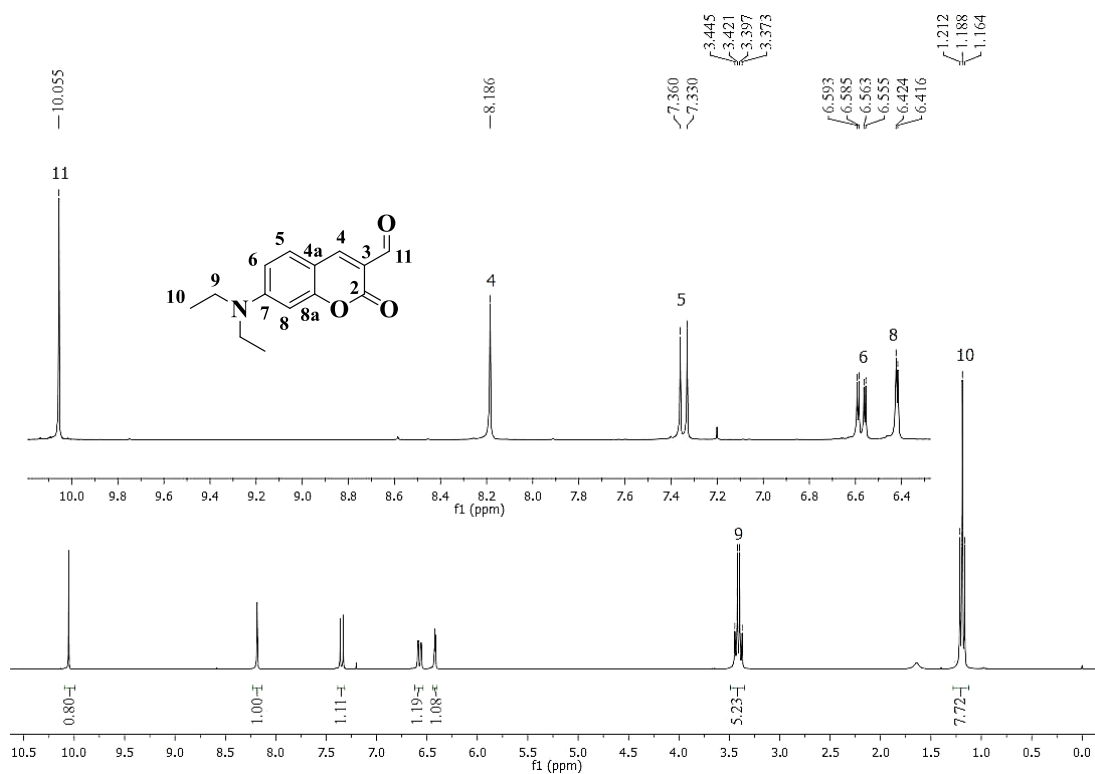


Figura 5.9. Espectro de RMN ^1H del compuesto **2.3c** a 300 MHz en CDCl_3 .

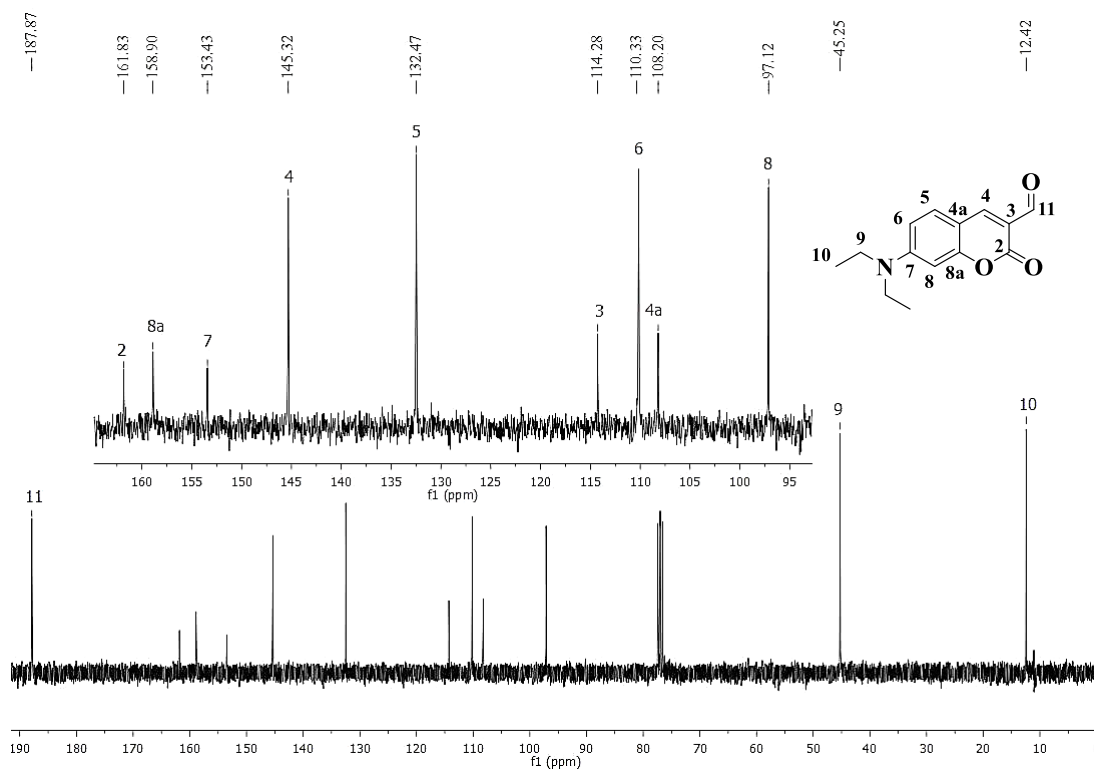


Figura 5.10. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **2.3c** a 75.4 MHz en CDCl_3 .

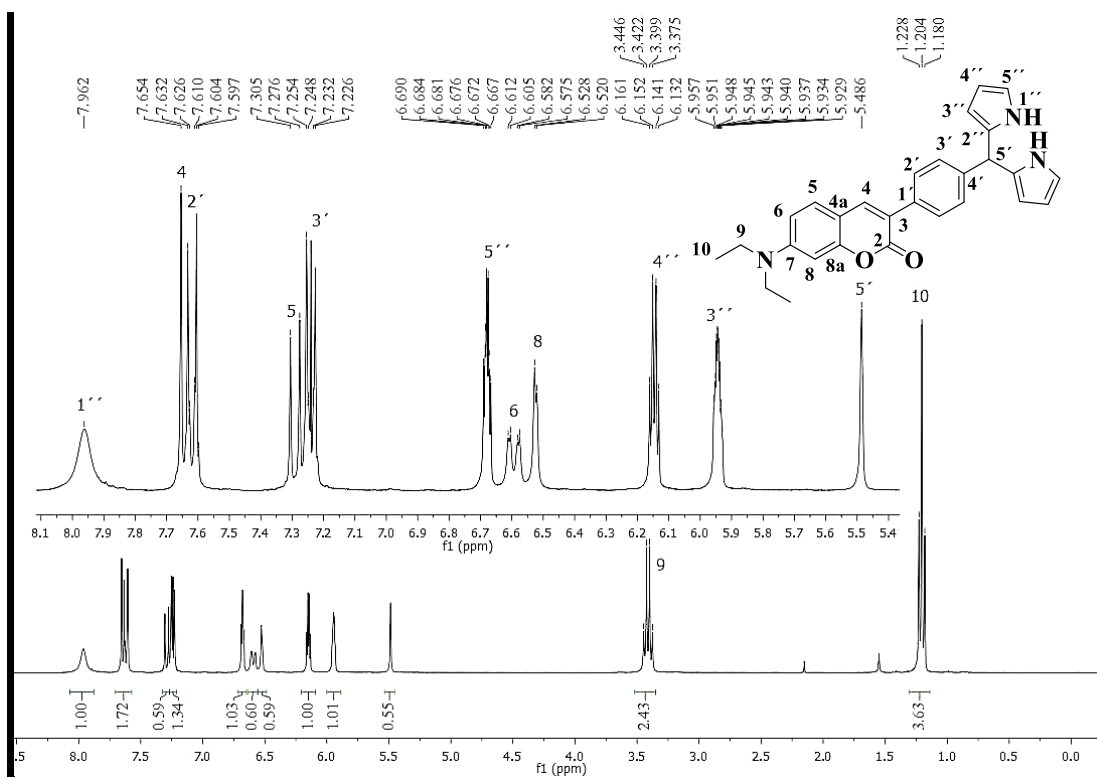


Figura 5.11. Espectro de RMN ^1H del compuesto **2.4a** a 300 MHz en CDCl_3 .

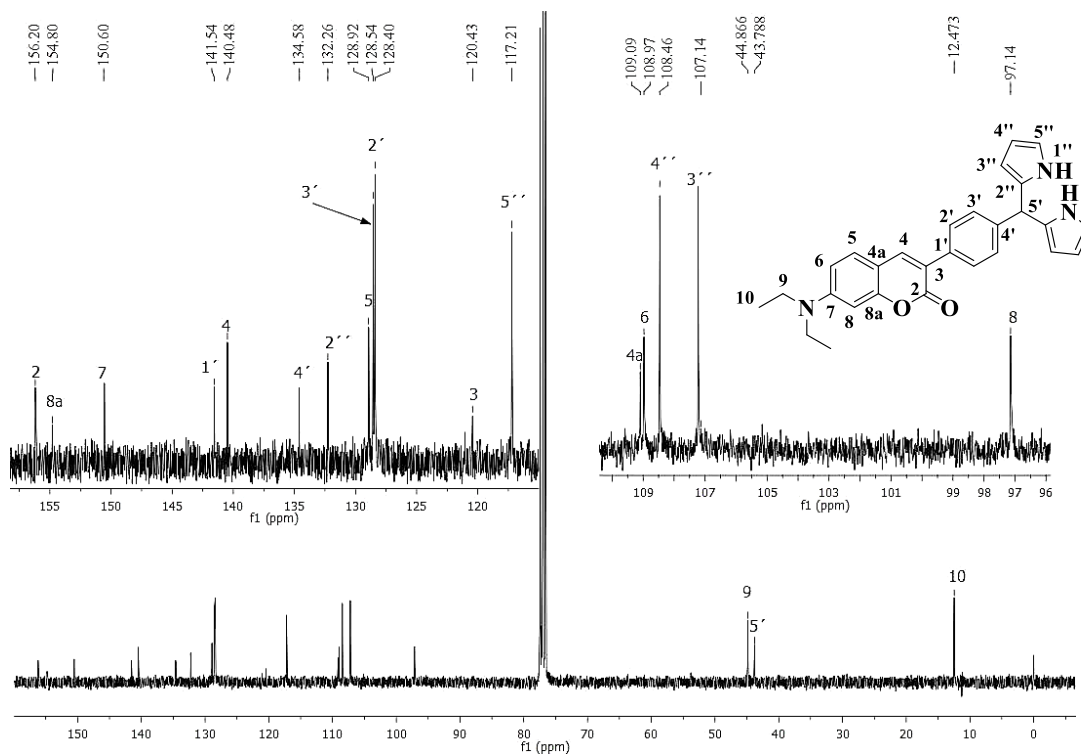


Figura 5.12. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **2.4a** a 75.4 MHz en CDCl_3 .

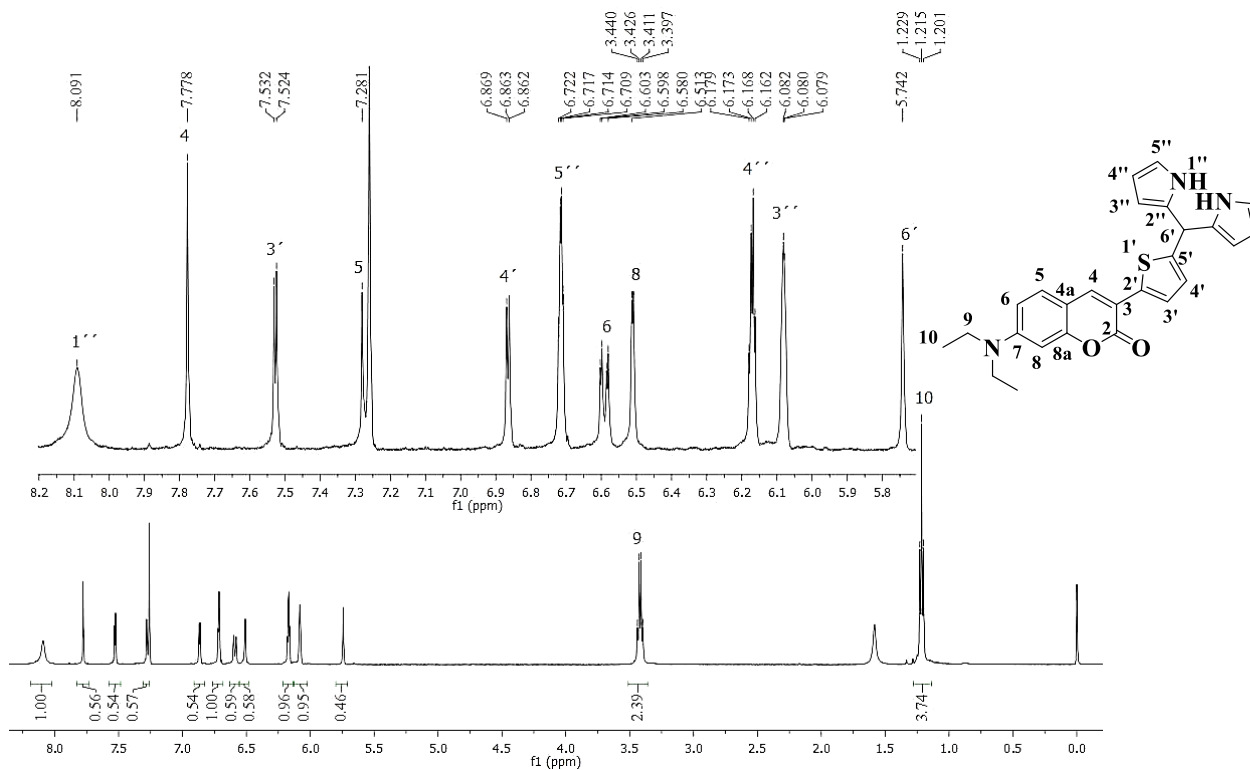


Figura 5.13. Espectro de RMN ^1H del compuesto **2.4b** a 500 MHz en CDCl_3 .

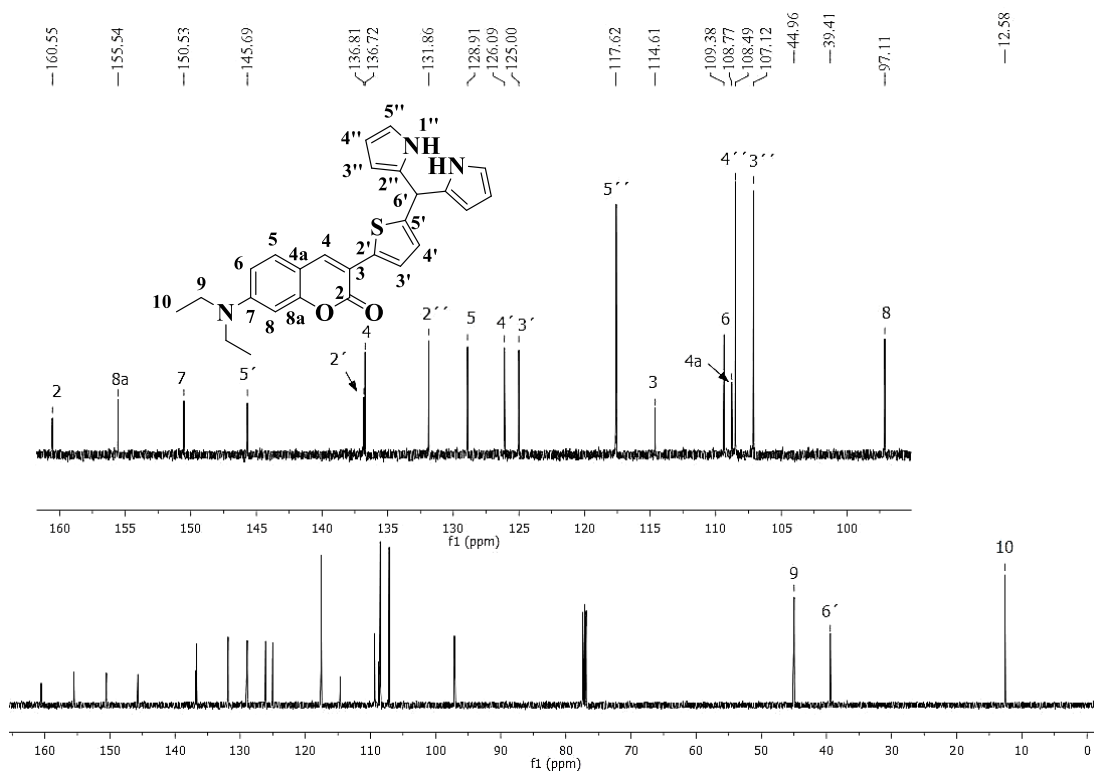


Figura 5.14. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **2.4b** a 125.7 MHz en CDCl_3 .

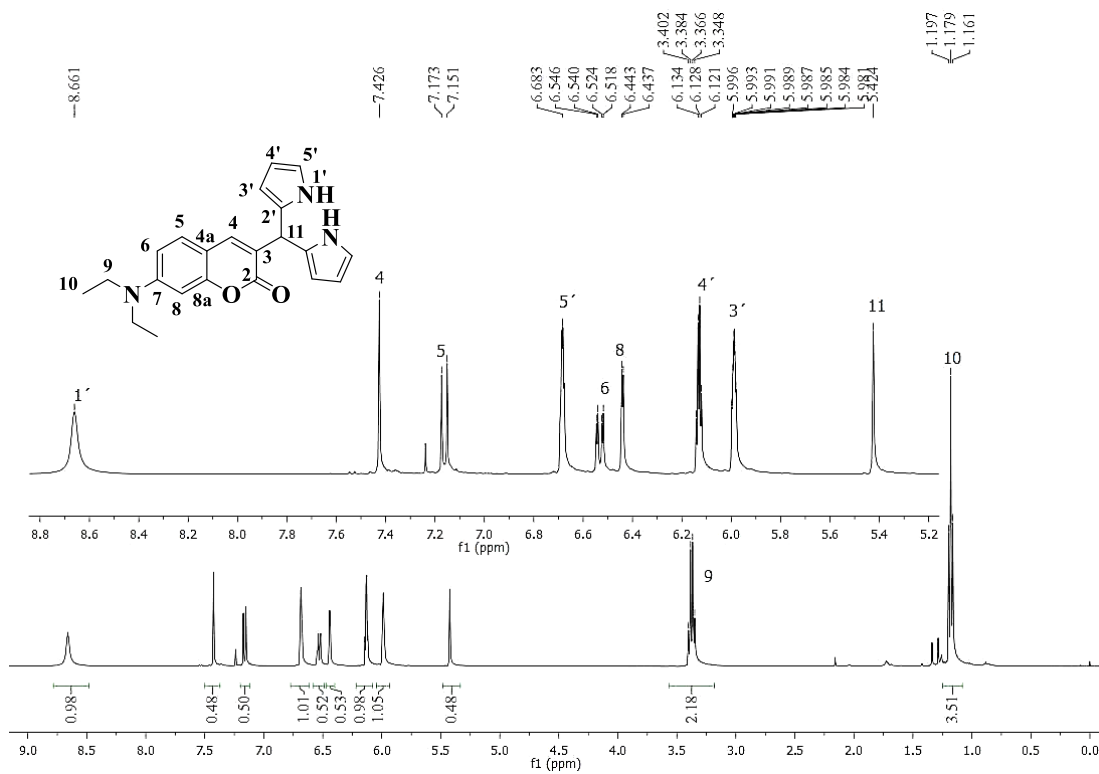


Figura 5.15. Espectro de RMN ^1H del compuesto **2.4c** a 400 MHz en CDCl_3 .

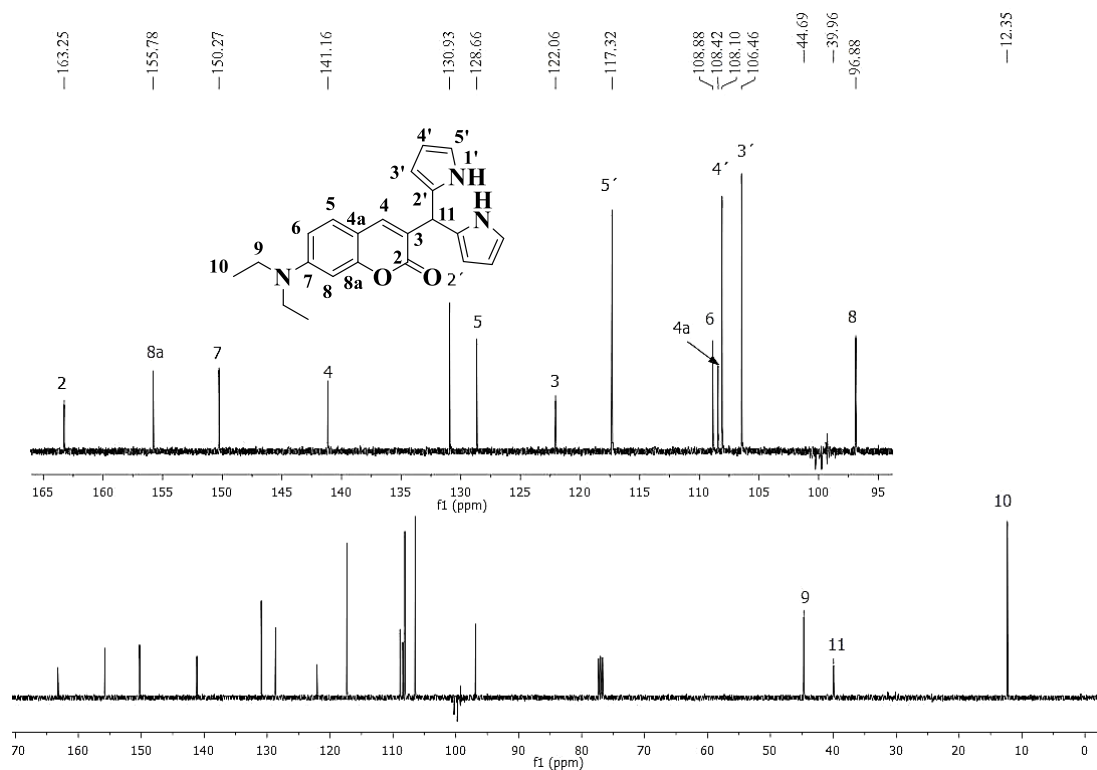


Figure 5.16. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **2.4c** a 100.6 MHz en CDCl_3 .

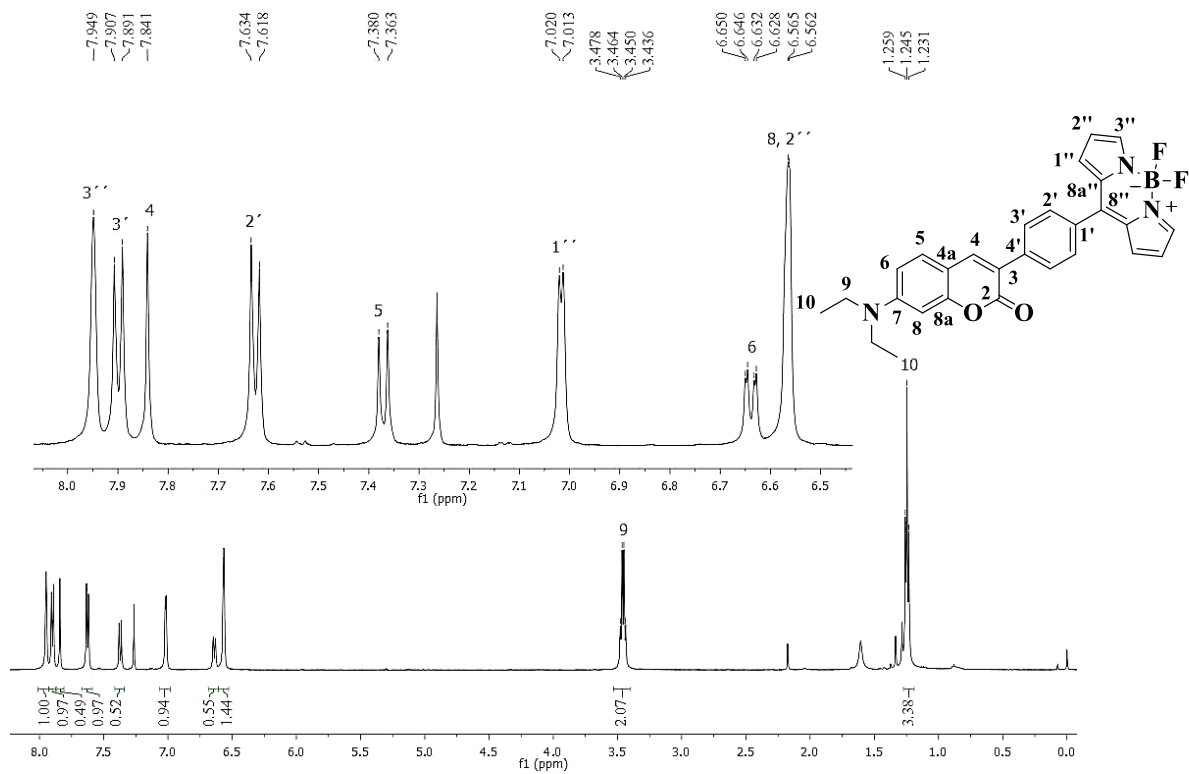


Figura 5.17. Espectro de RMN ^1H del compuesto **2.5a** a 500 MHz en CDCl_3 .

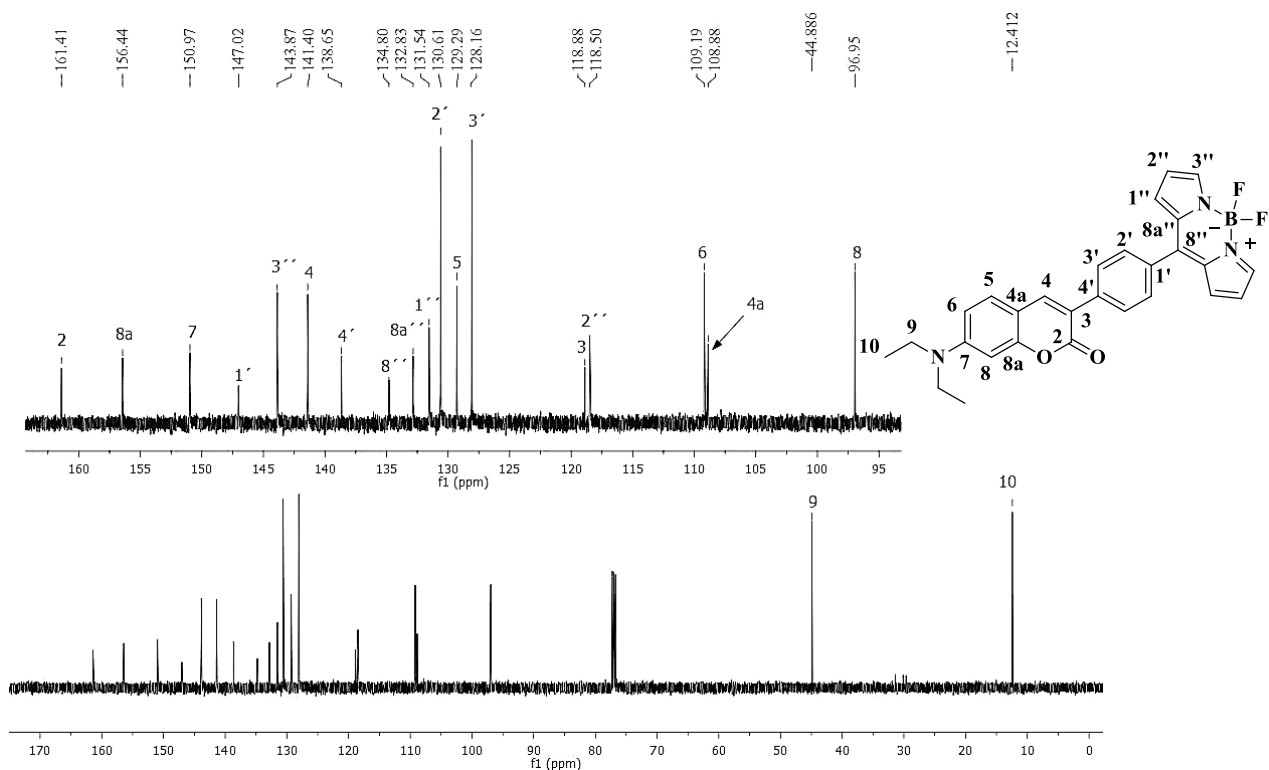


Figura 5.18. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **2.5a** a 125.7 MHz en CDCl_3 .

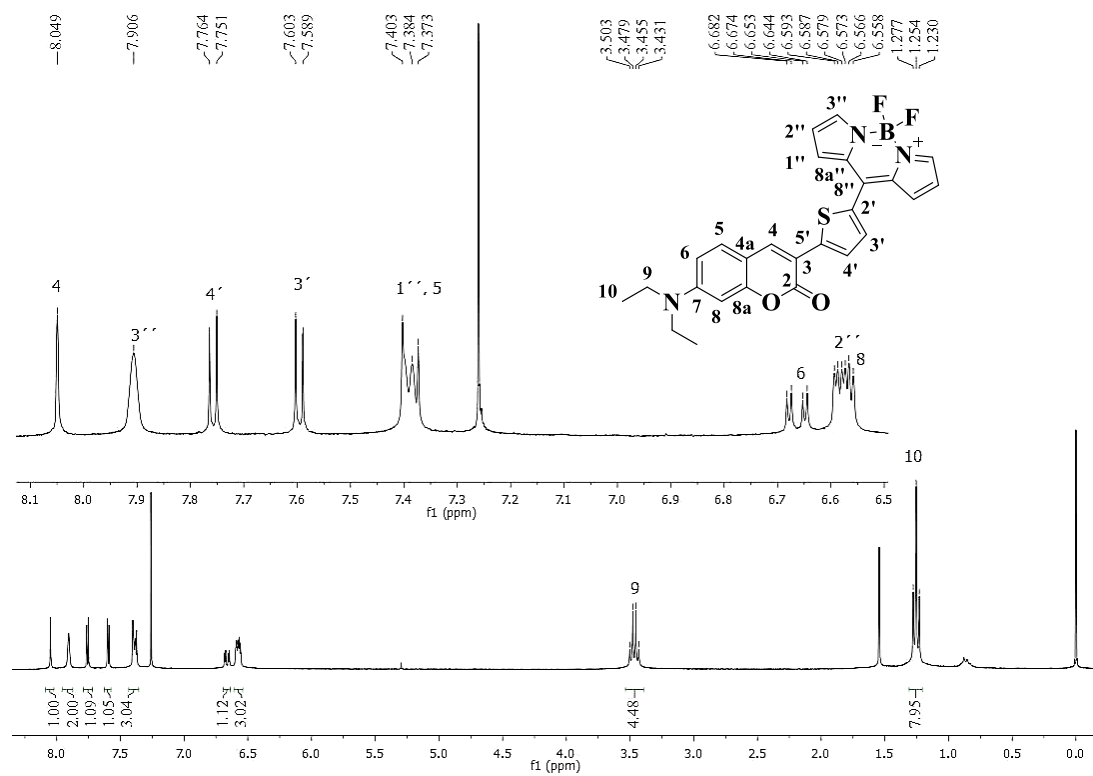


Figura 5.19. Espectro de RMN ^1H del compuesto **2.5b** a 300 MHz en CDCl_3 .

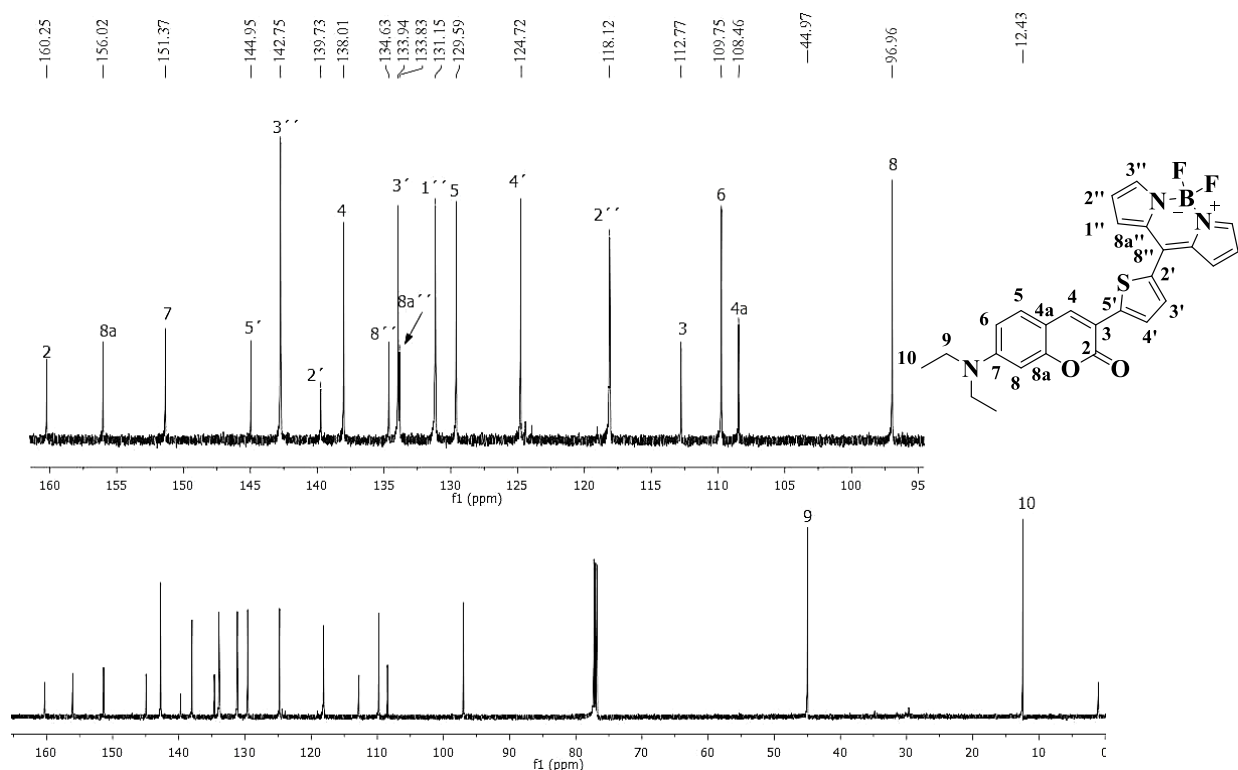


Figura 5.20. Espectro de RMN ^{13}C RMN del compuesto **2.5b** a 125.7 MHz en CDCl_3 .

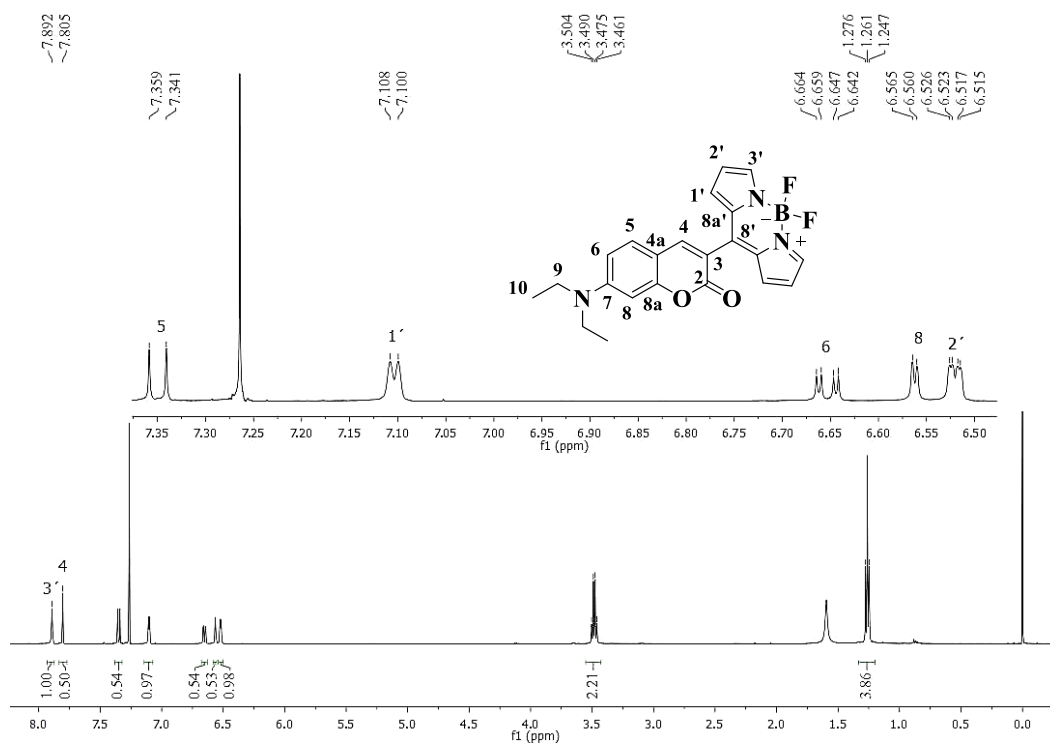


Figura 5.21. Espectro de RMN ^1H del compuesto **2.5c** a 500 MHz en CDCl_3 .

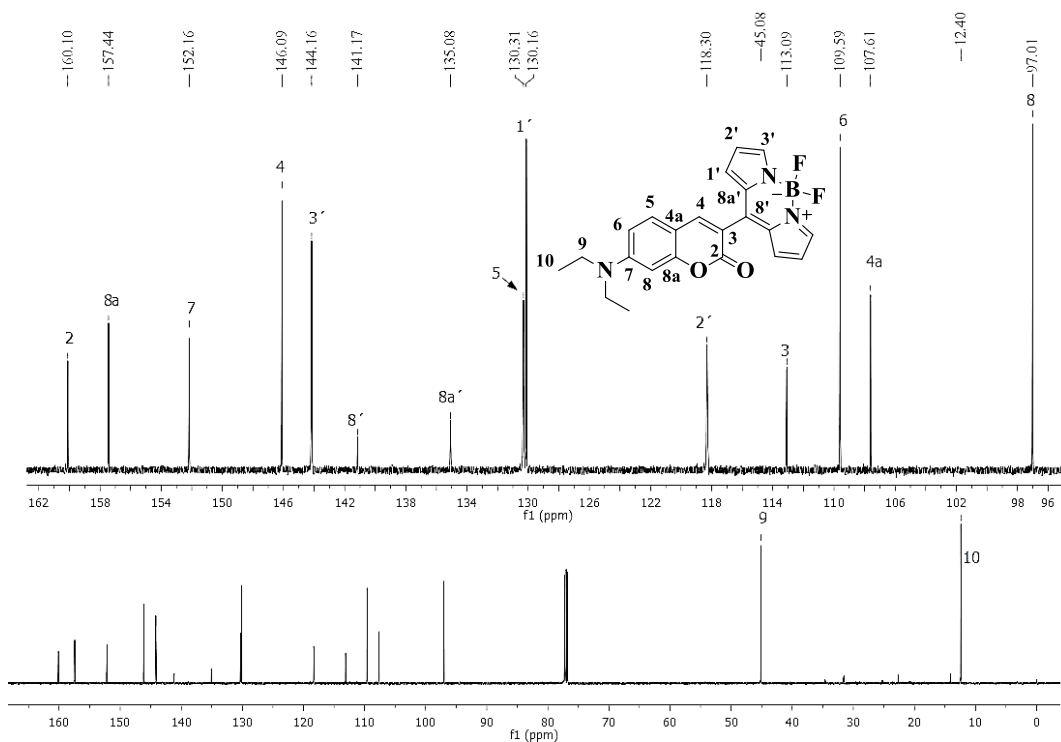


Figura 5.22. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 2.5c a 125.7 MHz en CDCl_3 .

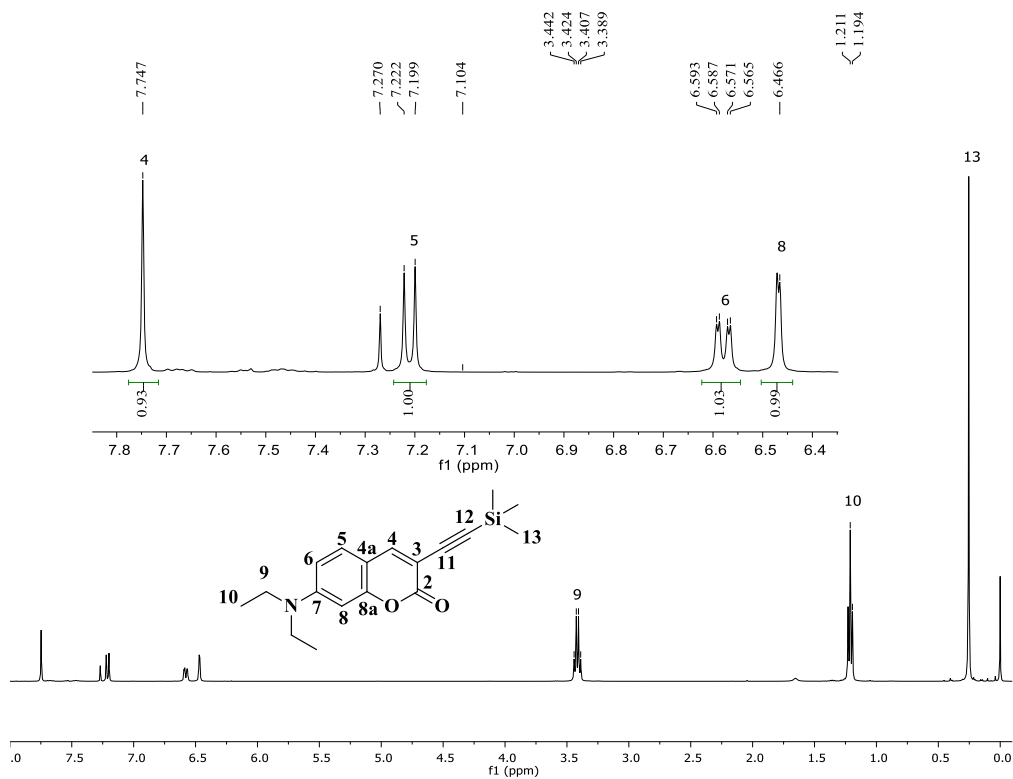


Figura 5.23. Espectro de RMN ^1H del compuesto 3.3 a 400 MHz en CDCl_3 .

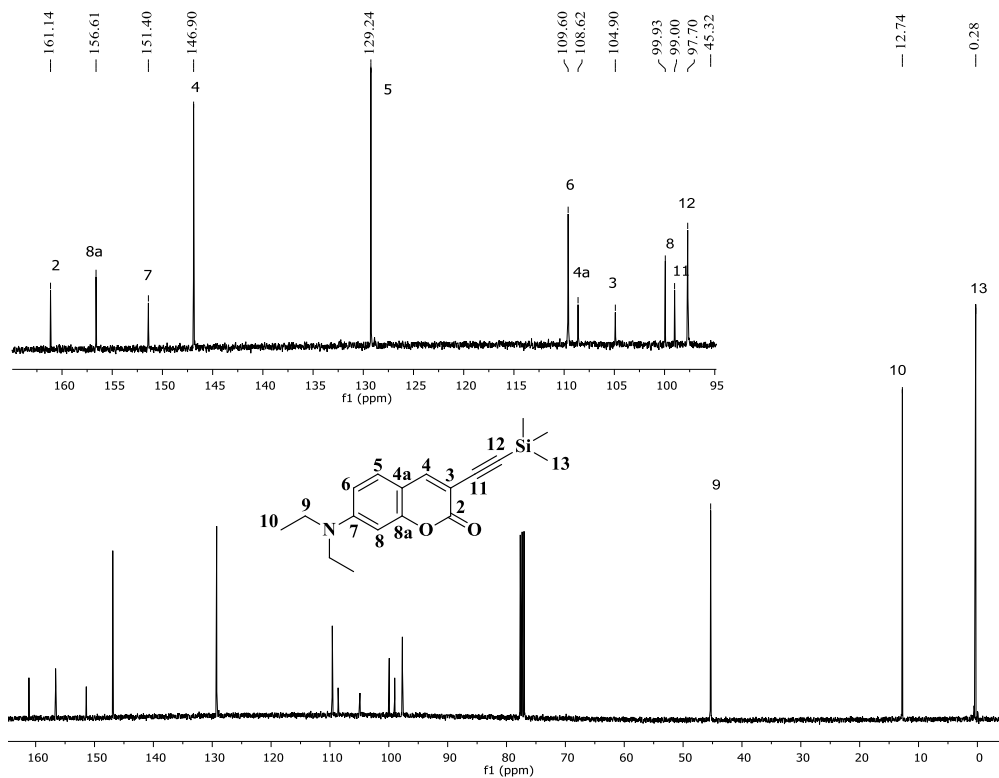


Figura 5.24. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **3.3** a 100.6 MHz en CDCl_3 .

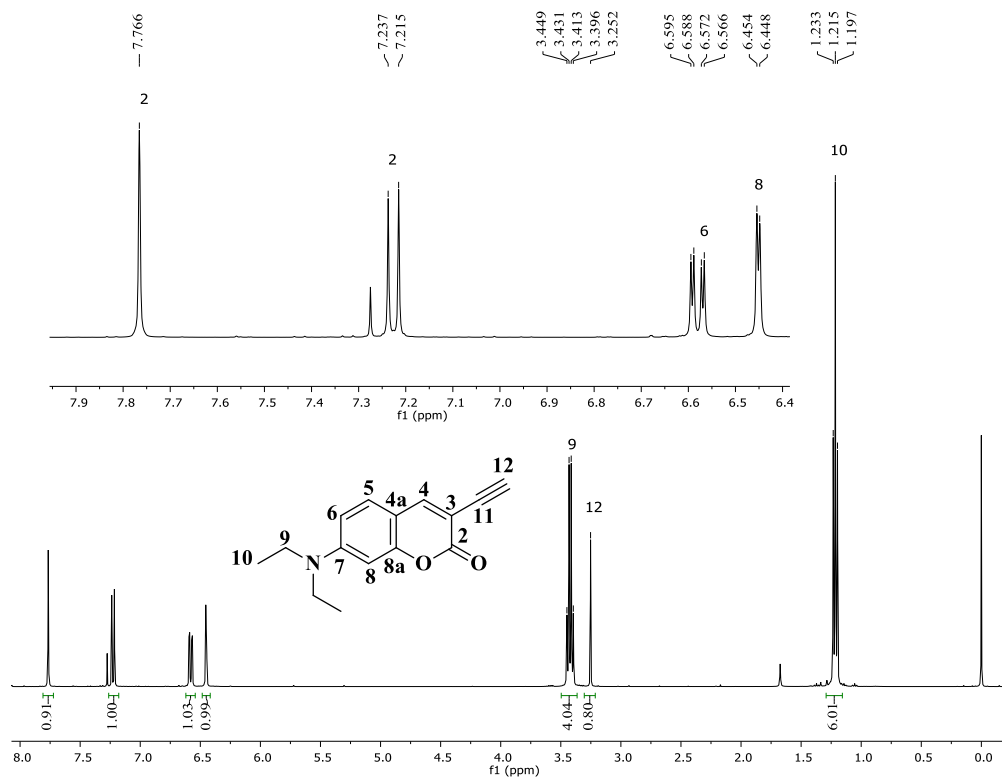


Figura 5.25. Espectro de RMN ^1H del compuesto **3.4** a 400 MHz en CDCl_3 .

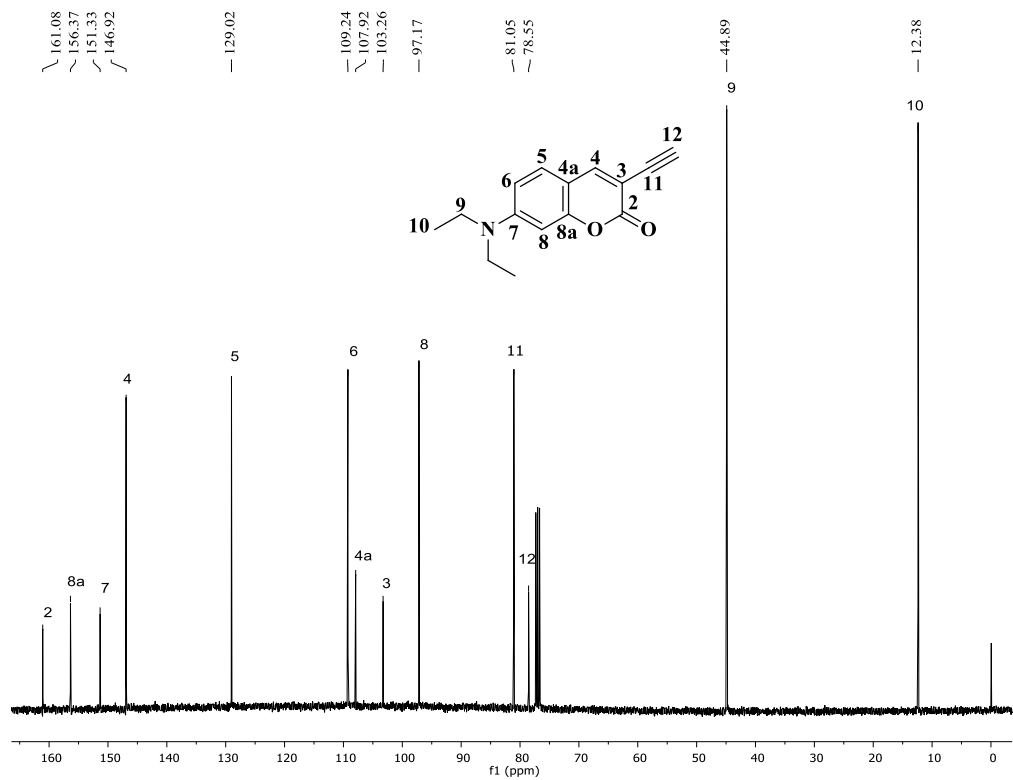


Figura 5.26. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **3.4** a 100.6 MHz en CDCl_3 .

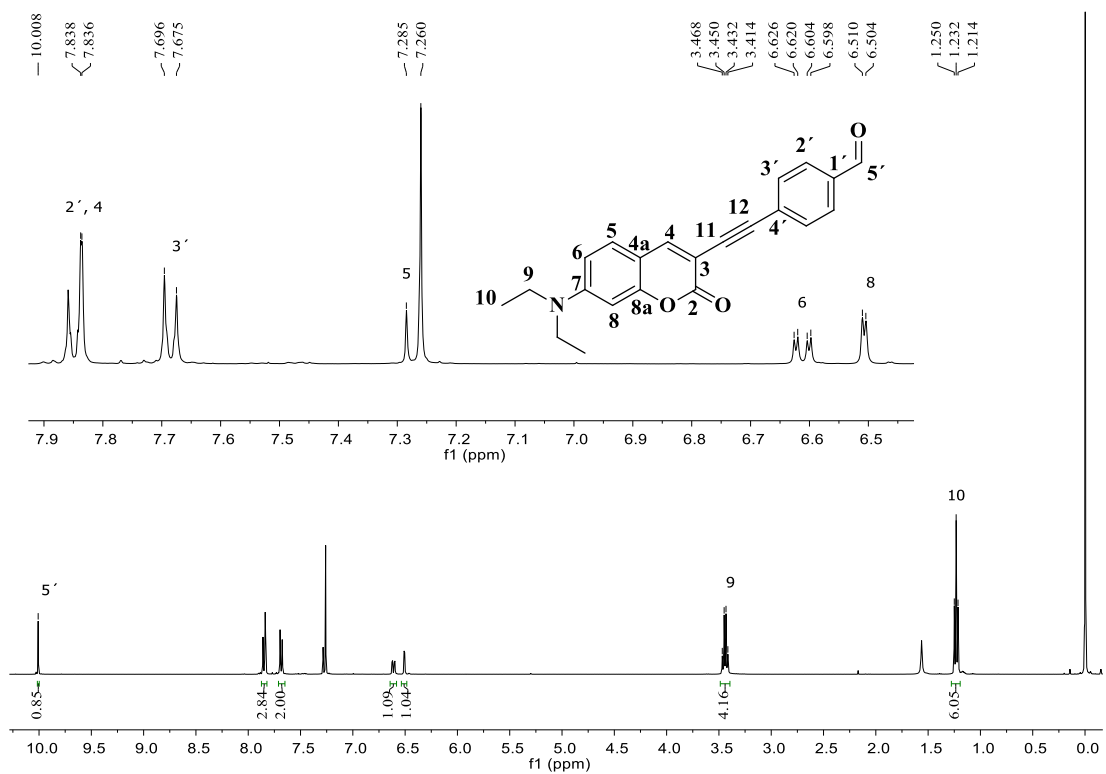


Figura 5.27. Espectro de RMN ^1H del compuesto **3.5a** a 400 MHz en CDCl_3 .

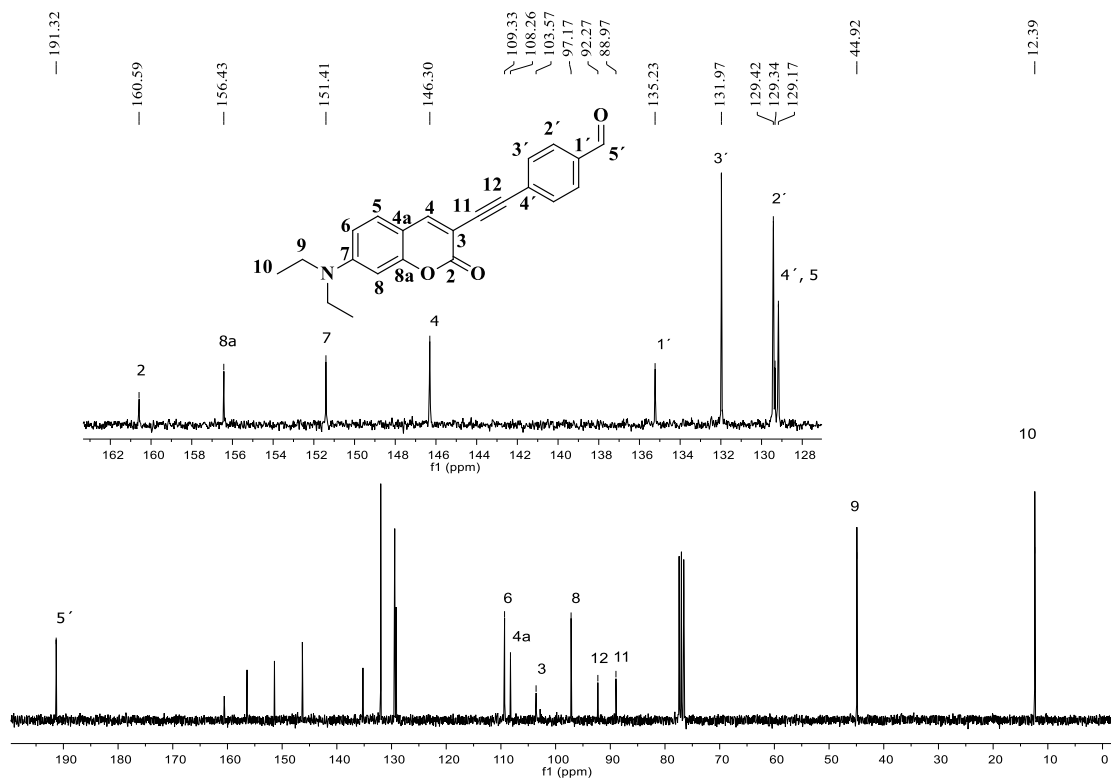


Figura 5.28. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 3.5a a 100.6 MHz en CDCl_3 .

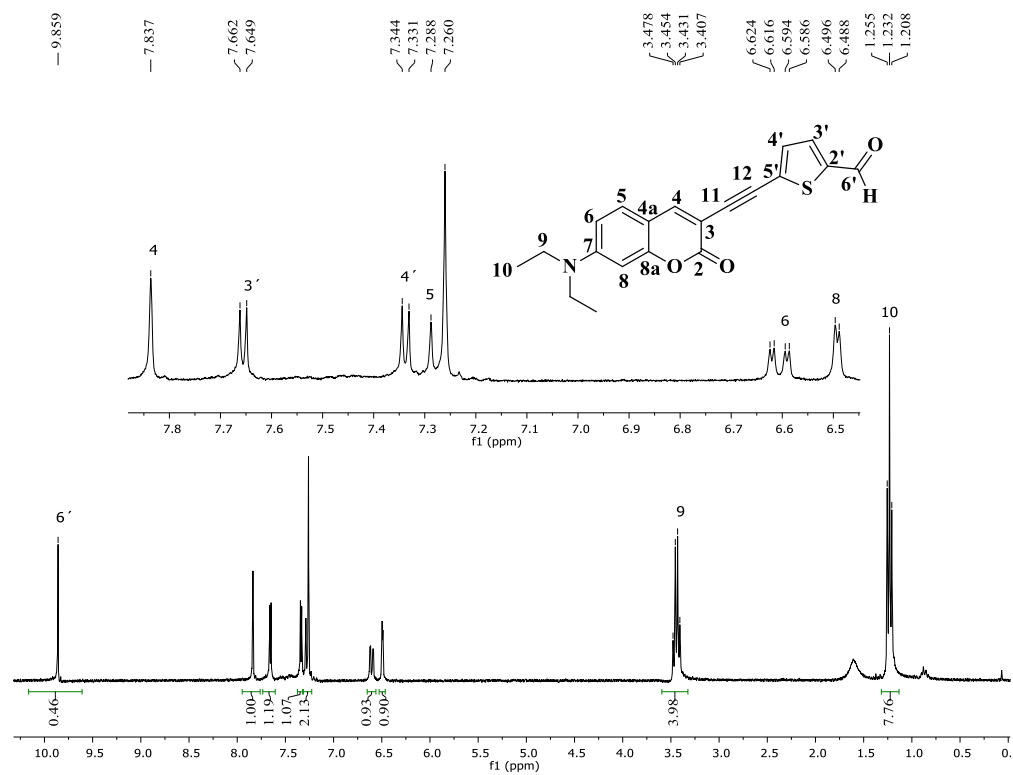


Figura 5.29. Espectro de RMN ^1H del compuesto 3.5b a 100.6 MHz en CDCl_3 .

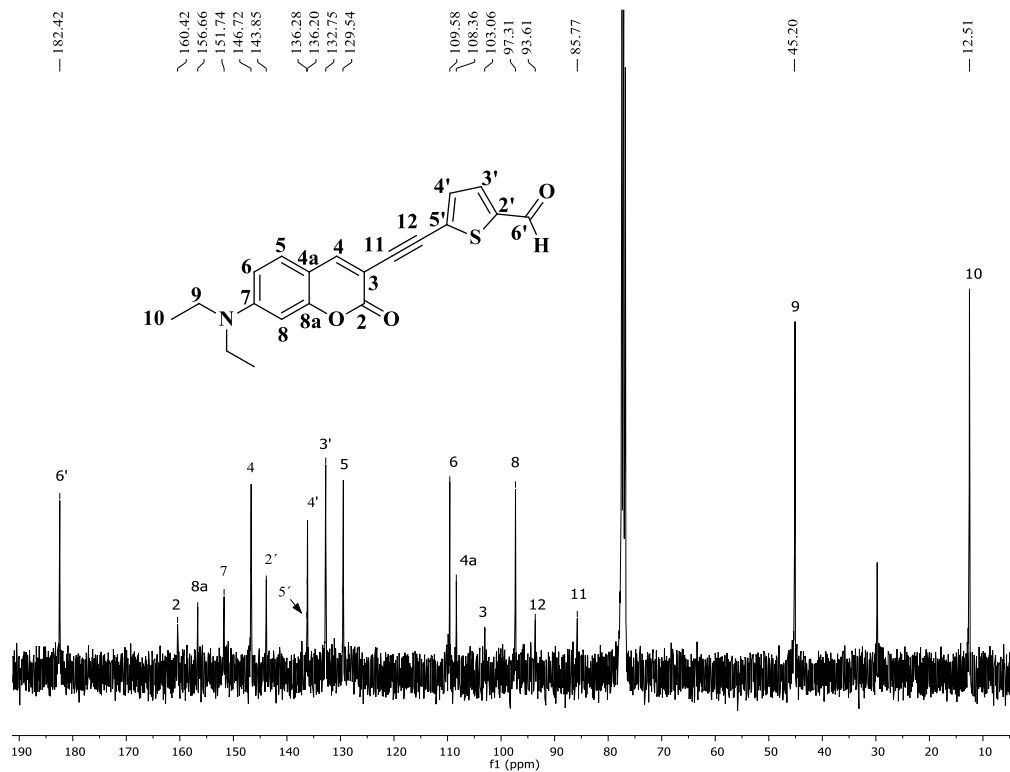


Figura 5.30. Espectro de RMN ¹³C del compuesto 3.5b a 100.6 MHz en CDCl₃.

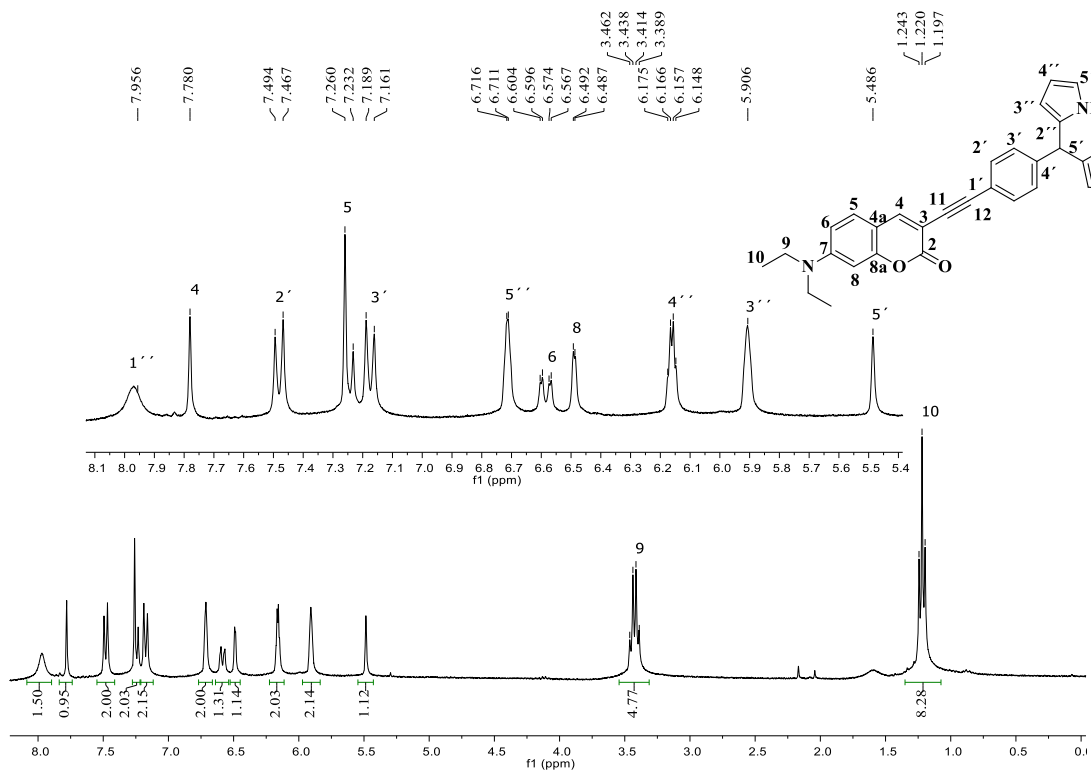


Figura 5.31. Espectro de RMN ¹H del compuesto 3.6a a 300 MHz en CDCl₃.

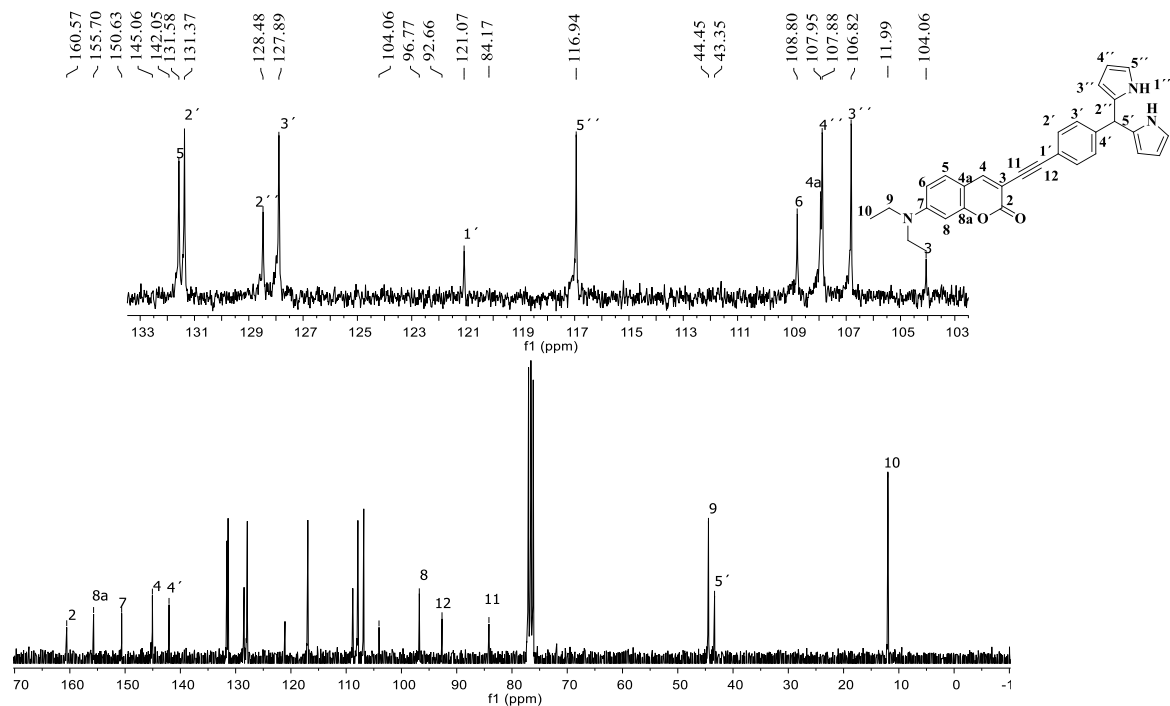


Figura 5.32. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **3.6a** a 75 MHz en CDCl_3 .

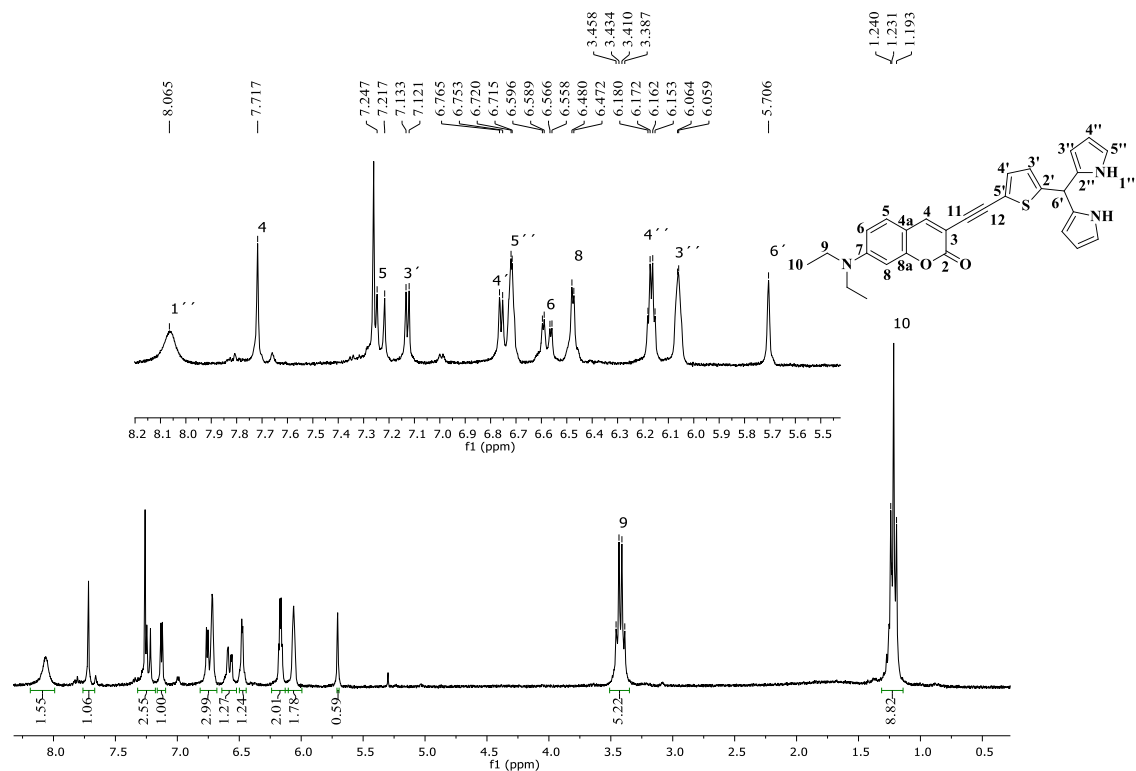


Figura 5.33. Espectro de RMN ^1H del compuesto **3.6b** a 300 MHz en CDCl_3 .

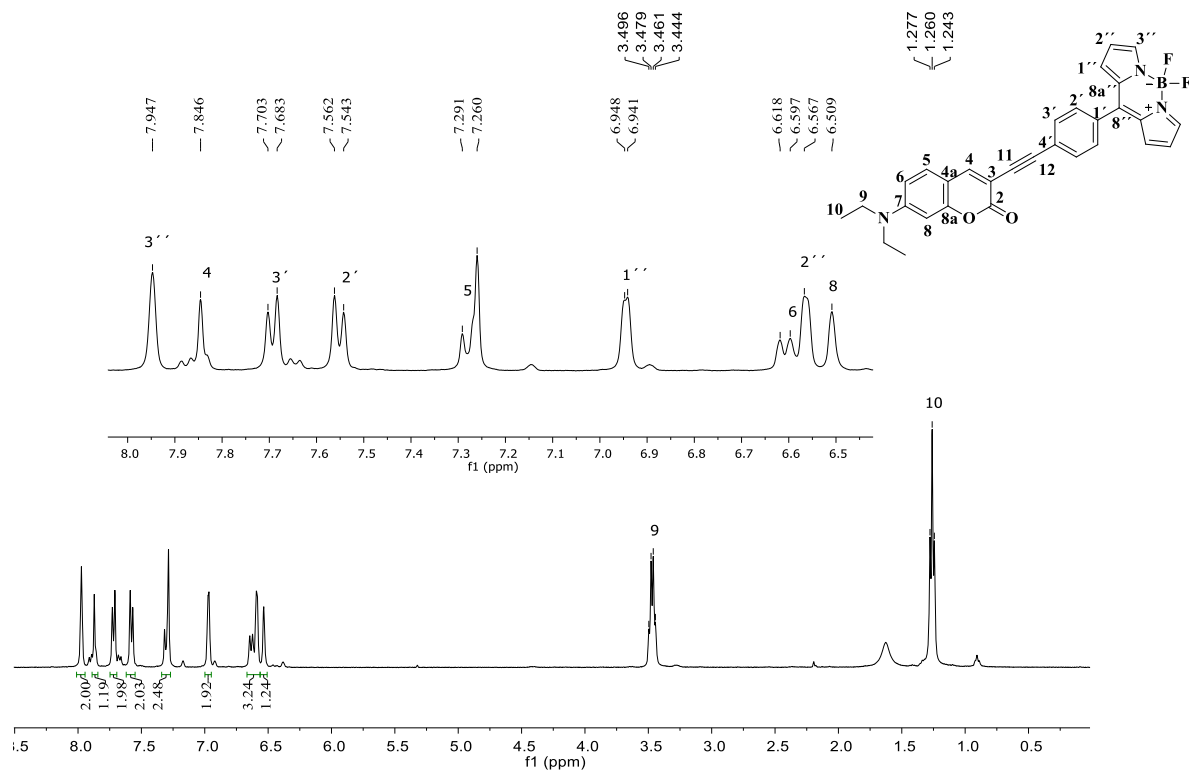


Figura 5.34. Espectro de RMN ^1H del compuesto **3.7a** a 300 MHz en CDCl_3 .

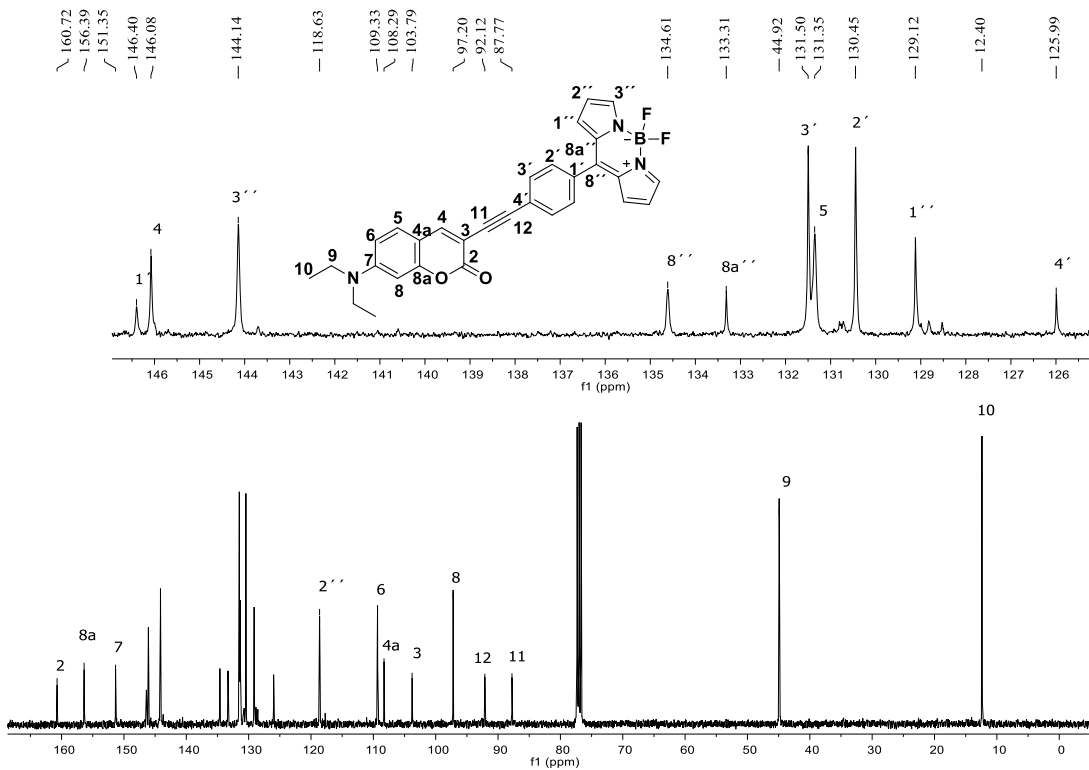


Figura 5.35. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **3.7a** a 75 MHz en CDCl_3 .

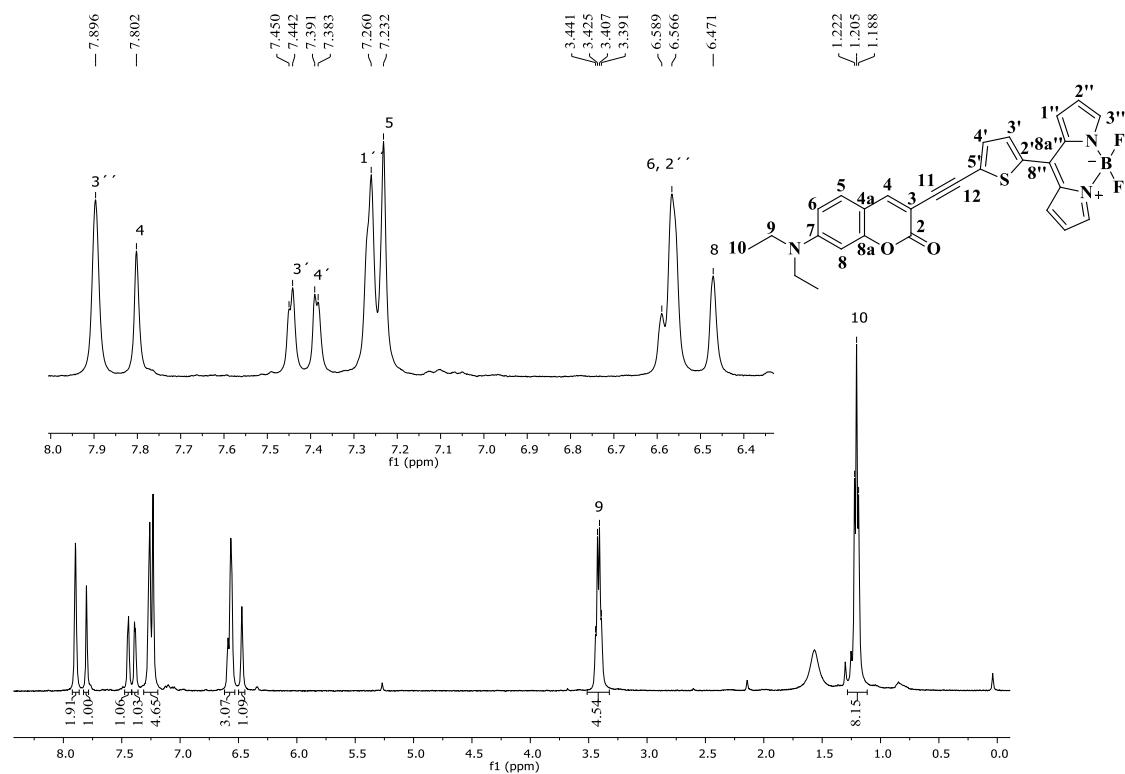


Figura 5.36. Espectro de RMN ^1H del compuesto **3.7b** a 400 MHz en CDCl_3 .

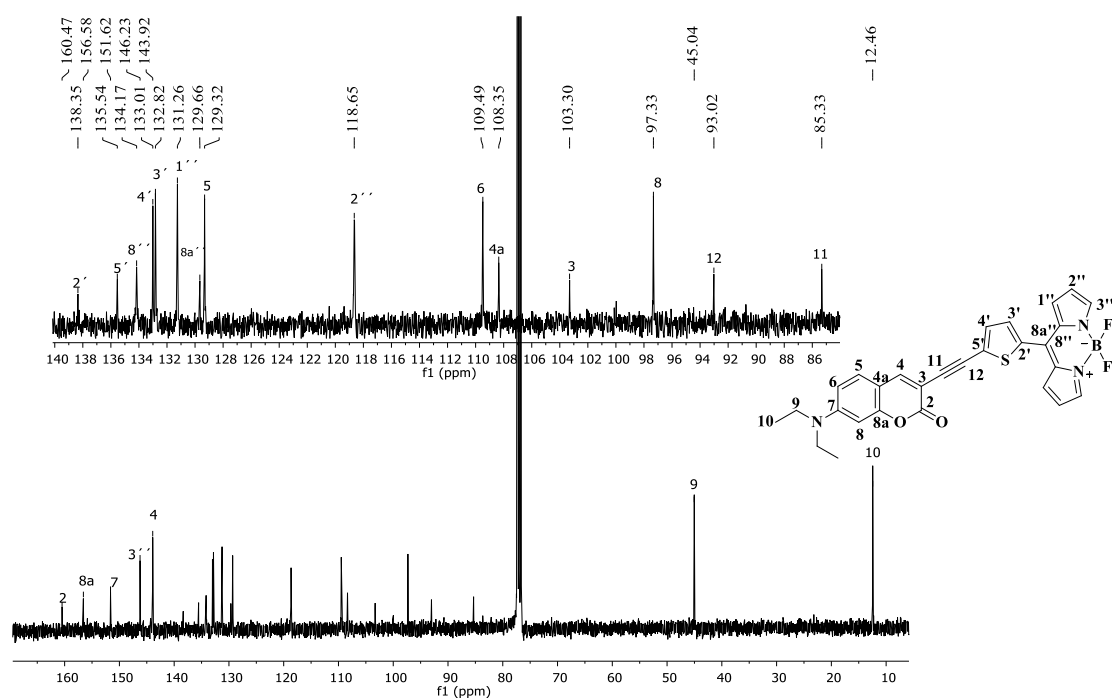


Figura 5.37. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **3.7b** a 100.6 MHz en CDCl_3 .

5.2. Propiedades fotofísicas.

Tabla 5.1. Propiedades fotofísicas del compuesto **2.5a** en diferentes disolventes.

<i>Disolvente</i>	ϵ	n	Δf	η (cP)	λ_a (nm)	$\bar{\nu}_a$ (cm^{-1})	λ_e (nm)	$\bar{\nu}_e$ (cm^{-1})	$\bar{\nu}_e - \bar{\nu}_e$ (cm^{-1})
Pentano	1.844	1.3575	1.6E-4	0.894	500	20000	517	19342	658
Dioxano	2.22	1.4224	0.0215	1.177	501	19960	628	15924	4037
Tolueno	2.38	1.4961	0.0135	0.560	504	19841	602	16611	3230
<i>p</i> -Xileno	2.562	1.5054	0.0262	0.603	503	19881	602	16611	3269
OEt ₂	4.27	1.3526	0.1647	0.224	500	20000	660	15152	4848
MTBE	4.50	1.3690	0.1161	0.360	498	20080	660	15152	4929
Cloroformo	4.81	1.4459	0.1483	0.537	504	19841	661	15129	4713
AcOEt	5.07	1.3940	0.1163	0.685	500	20000	524	19084	916
AcOBu	6.081	1.3723	0.2007	0.423	500	20000	523	19120	880
1,1,1-TCA	7.243	1.438	0.1952	0.793	500	20000	674	14837	5163
THF	7.52	1.4050	0.2096	0.456	502	19920	524	19084	836
DCM	8.93	1.4242	0.2171	0.413	503	19881	527	18975	905
<i>n</i> -Octanol	10.30	1.4295	0.2254	7.288	503	19881	529	18904	977
EDC	10.50	1.4448	0.2217	0.8385	506	19763	545	18349	1414
BnOH	11.916	1.5404	0.2006	5.474	507	19724	534	18727	997
Ciclohexanol	16.4	1.4648	0.2391	57.5	503	19881	528	18939	941
<i>i</i> -Butanol	16.68	1.3960	0.2626	3.102	500	20000	528	18939	1061
<i>n</i> -Butanol	17.5	1.3989	0.2636	2.544	500	20000	528	18939	1061
MEK	18.51	1.3788	0.2729	0.430	500	20000	525	19048	952
<i>i</i> -Propanol	20.18	1.3776	0.2765	2.038	500	20000	526	19011	989
EtOH	24.65	1.3611	0.2889	1.074	500	20000	524	19084	916
2-Cloroetanol	25.80	1.4419	0.2714	3.380	504	19841	528	18939	902
PEG	32.00	1.4310	0.2713	48.60b	504	19841	526	19011	830
MeOH	33.00	1.3288	0.3086	0.544	499	20040	526	19011	1029
ACN	36.64	1.3442	0.3049	0.369	500	20000	525	19048	952
DMF	36.70	1.4305	0.2744	0.794	502	19920	527	18975	945
EG	41.40	1.4320	0.2762	16.1	502	19920	525	19048	873
DMSO	46.68	1.4793	0.2631	1.987	504	19841	533	18762	1080
Agua	80.40	1.3325	0.3203	0.890	517	19342	733	13643	5700
NMF	189.00	1.4319	0.2901	1.678	504	19841	527	18975	866

Constante dieléctrica, (ϵ), Índice de refracción, (n) Polarizabilidad de orientación, (Δf); Longitud de onda de absorción, (λ_a); Número de onda de absorción, ($\bar{\nu}_a$); Longitud de onda de emisión, (λ_e); Número de onda de emisión, ($\bar{\nu}_e$). Notación de disolventes: OEt₂ (éter dietílico), MTBE (éter *t*-butil metílico), AcOBu (acetato de butilo), AcOEt (acetato de etilo), 1,1,1-TCA (tricloroetano), THF (tetrahidrofurano), DCM (diclorometano), EDC (1,2-dicloroetano), BnOH (alcohol bencílico), MEK (etil metil cetona), EtOH (etanol), PEG (polietilen glicol), MeOH (metanol), ACN (acetonitrilo), DMF (dimetilformamida), EG (etilenglicol), DMSO (dimetilsulfóxido), NMF (N-metil-2-pirrolidona). El valor de viscosidad del PEG se tomó a 25°C.

Tabla 5.2. Propiedades fotofísicas del compuesto **6.5b** en diferentes disolventes.

<i>Disolventes</i>	ϵ	n	Δf	η (cP)	λ_a (nm)	$\bar{\nu}_a$ (cm ⁻¹)	λ_e (nm)	$\bar{\nu}_e$ (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_e$ (cm ⁻¹)
Pentano	1.844	1.3575	1.6E-4	0.894	513	19493	603	16584	2909
Dioxano	2.22	1.4224	0.0215	1.177	515	19417	664	15060	4357
Tolueno	2.38	1.4961	0.0135	0.560	519	19268	654	15291	3977
<i>p</i> -Xileno	2.562	1.5054	0.0262	0.603	520	19231	650	15385	3846
OEt ₂	4.27	1.3526	0.1647	0.224	513	19493	680	14706	4787
MTBE	4.50	1.3690	0.1161	0.360	513	19493	677	14771	4722
Cloroformo	4.81	1.4459	0.1483	0.537	515	19417	682	14663	4755
AcOBu	5.07	1.3940	0.1163	0.685	513	19493	698	14327	5167
AcOEt	6.081	1.3723	0.2007	0.423	509	19646	531	18832	814
1,1,1-TCA	7.243	1.438	0.1952	0.793	512	19531	692	14451	5080
THF	7.52	1.4050	0.2096	0.456	513	19493	533	18762	731
DCM	8.93	1.4242	0.2171	0.413	513	19493	537	18622	871
<i>n</i> -Octanol	10.30	1.4295	0.2254	7.288	513	19493	675	14815	4678
EDC	10.50	1.4448	0.2217	0.8385	520	19231	557	17953	1277
BnOH	11.916	1.5404	0.2006	5.474	517	19342	554	18051	1292
Ciclohexanol	16.4	1.4648	0.2391	57.5	513	19493	687	14556	4937
<i>i</i> -Butanol	16.68	1.3960	0.2626	3.102	511	19569	545	18349	1221
<i>n</i> -Butanol	17.5	1.3989	0.2636	2.544	513	19493	545	18349	1145
MEK	18.51	1.3788	0.2729	0.430	510	19608	540	18519	1089
<i>i</i> -Propanol	20.18	1.3776	0.2765	2.038	510	19608	542	18450	1158
EtOH	24.65	1.3611	0.2889	1.074	509	19646	543	18416	1230
2-Cloroetanol	25.80	1.4419	0.2714	3.380	517	19342	555	18018	1324
PEG	32.00	1.4310	0.2713	48.60b	510	19608	553	18083	1525
MeOH	33.00	1.3288	0.3086	0.544	508	19685	555	18018	1667
ACN	36.64	1.3442	0.3049	0.369	506	19763	536	18657	1106
DMF	36.70	1.4305	0.2744	0.794	510	19608	537	18622	986
EG	41.40	1.4320	0.2762	16.1	510	19608	558	17921	1687
DMSO	46.68	1.4793	0.2631	1.987	513	19493	544	18382	1111
Agua	80.40	1.3325	0.3203	0.890	430	23256	506	19763	3493
NMF	189.00	1.4319	0.2901	1.678	510	19608	550	18182	1426

Constante dieléctrica, (ϵ), Índice de refracción, (n) Polarizabilidad de orientación, (Δf); Longitud de onda de absorción, (λ_a); Número de onda de absorción, ($\bar{\nu}_a$); Longitud de onda de emisión, (λ_e); Número de onda de emisión, ($\bar{\nu}_e$). Notación de disolventes: OEt₂ (éter dietílico), MTBE (éter *t*-butil metílico), AcOBu (acetato de butilo), AcOEt (acetato de etilo), 1,1,1-TCA (tricloroetano), THF (tetrahydrofurano), DCM (diclorometano), EDC (1,2-dicloroetano), BnOH (alcohol bencílico), MEK (etil metil cetona), EtOH (etanol), PEG (polietilen glicol), MeOH (metanol), ACN (acetonitrilo), DMF (dimetilformamida), EG (etilenglicol), DMSO (dimetilsulfóxido), NMF (*N*-metil-2-pirrolidona). El valor de viscosidad del PEG se tomó a 25°C.

Tabla 5.3. Propiedades fotofísicas de **2.5c** en diferentes disolventes.

<i>Disolvente</i>	ϵ	n	Δf	η (cP)	λ_a (nm)	$\bar{\nu}_a$ (cm ⁻¹)	λ_e (nm)	$\bar{\nu}_e$ (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}_e - \bar{\nu}_e'$ (cm ⁻¹)
Pentano	1.844	1.3575	1.6E-4	0.894	510	19608	538	18587	1020
Dioxano	2.22	1.4224	0.0215	1.177	511	19569	626	15974	3595
Tolueno	2.38	1.4961	0.0135	0.560	515	19417	598	16722	2695
<i>p</i> -Xileno	2.562	1.5054	0.0262	0.603	515	19417	595	16807	2611
Et ₂ O	4.27	1.3526	0.1647	0.224	508	19685	643	15552	4133
MTBE	4.50	1.3690	0.1161	0.360	506	19763	626	15974	3788
Cloroformo	4.81	1.4459	0.1483	0.537	515	19417	633	15798	3620
AcOBu	5.07	1.3940	0.1163	0.685	509	19646	664	15060	4586
AcOEt	6.081	1.3723	0.2007	0.423	506	19763	680	14706	5057
1,1,1-TCA	7.243	1.438	0.1952	0.793	510	19608	645	15504	4104
THF	7.52	1.4050	0.2096	0.456	510	19608	682	14663	4945
DCM	8.93	1.4242	0.2171	0.413	508	19685	685	14599	5086
<i>n</i> -Octanol	10.30	1.4295	0.2254	7.288	510	19608	621	16103	3505
EDC	10.50	1.4448	0.2217	0.8385	515	19417	558	17921	1496
BnOH	11.916	1.5404	0.2006	5.474	515	19417	540	18519	899
Ciclohexanol	16.4	1.4648	0.2391	57.5	513	19493	635	15748	3745
<i>i</i> -Butanol	16.68	1.3960	0.2626	3.102	511	19569	613	16313	3256
<i>n</i> -Butanol	17.5	1.3989	0.2636	2.544	510	19608	617	16207	3400
MEK	18.51	1.3788	0.2729	0.430	506	19763	532	18797	966
<i>i</i> -Propanol	20.18	1.3776	0.2765	2.038	508	19685	615	16260	3425
EtOH	24.65	1.3611	0.2889	1.074	508	19685	530	18868	817
2-Cloroetanol	25.80	1.4419	0.2714	3.380	515	19417	552	18116	1302
PEG	32.00	1.4310	0.2713	48.60b	508	19685	531	18832	853
MeOH	33.00	1.3288	0.3086	0.544	508	19685	532	18797	888
ACN	36.64	1.3442	0.3049	0.369	505	19802	538	18587	1215
DMF	36.70	1.4305	0.2744	0.794	506	19763	540	18519	1244
EG	41.40	1.4320	0.2762	16.1	508	19685	533	18762	923
DMSO	46.68	1.4793	0.2631	1.987	507	19724	536	18657	1067
Agua	80.40	1.3325	0.3203	0.890	522	19157	725	13793	5364
NMF	189.00	1.4319	0.2901	1.678	507	19724	533	18762	962

Constante dieléctrica, (ϵ), Índice de refracción, (n) Polarizabilidad de orientación, (Δf); Longitud de onda de absorción, (λ_a); Número de onda de absorción, ($\bar{\nu}_a$); Longitud de onda de emisión, (λ_e); Número de onda de emisión, ($\bar{\nu}_e$). Notación de disolventes: OEt₂ (éter dietílico), MTBE (éter *t*-butil metílico), AcOBu (acetato de butilo), AcOEt (acetato de etilo), 1,1,1-TCA (tricloroetano), THF (tetrahydrofurano), DCM (diclorometano), EDC (1,2-dicloroetano), BnOH (alcohol bencílico), MEK (etil metil cetona), EtOH (etanol), PEG (polietilen glicol), MeOH (metanol), ACN (acetonitrilo), DMF (dimetilformamida), EG (etilenglicol), DMSO (dimetilsulfóxido), NMF (*N*-metil-2-pirrolidona). El valor de viscosidad del PEG se tomó a 25°C.

5.3. Espectros de absorción y de fluorescencia a diferentes valores de viscosidad.

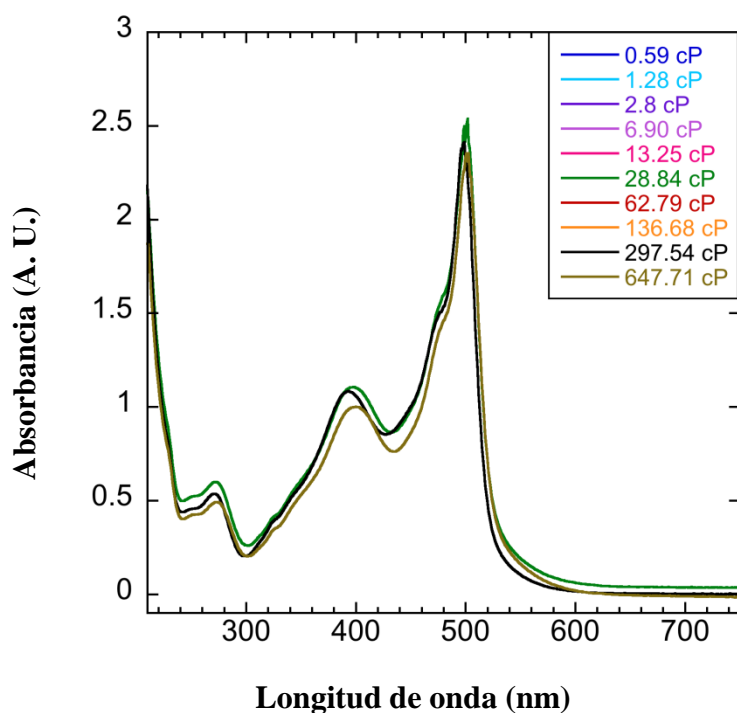


Figura 5.1. Espectros de absorción de **2.5a** (40 μM) en diferentes proporciones metanol:glicerol.

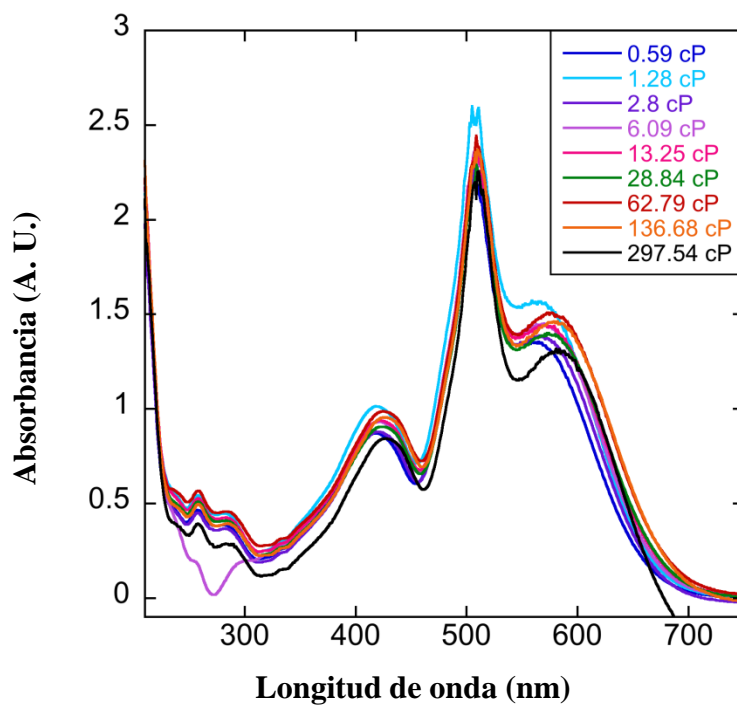


Figura 5.39. Espectros de absorción de **2.5b** (40 μM) en diferentes proporciones metanol:glicerol.

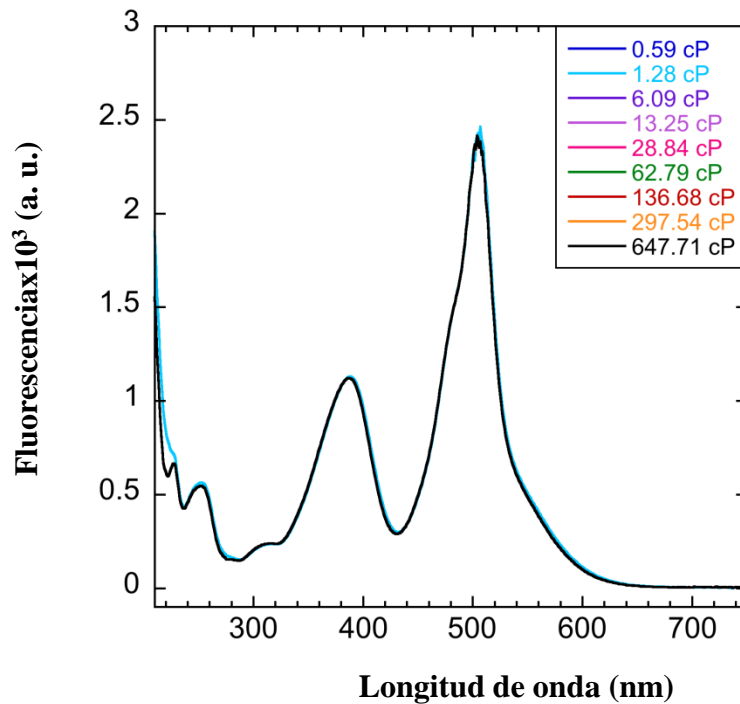


Figura 5.40. Espectros de absorción de **2.5c** ($40 \mu\text{M}$) en diferentes proporciones metanol:glicerol.

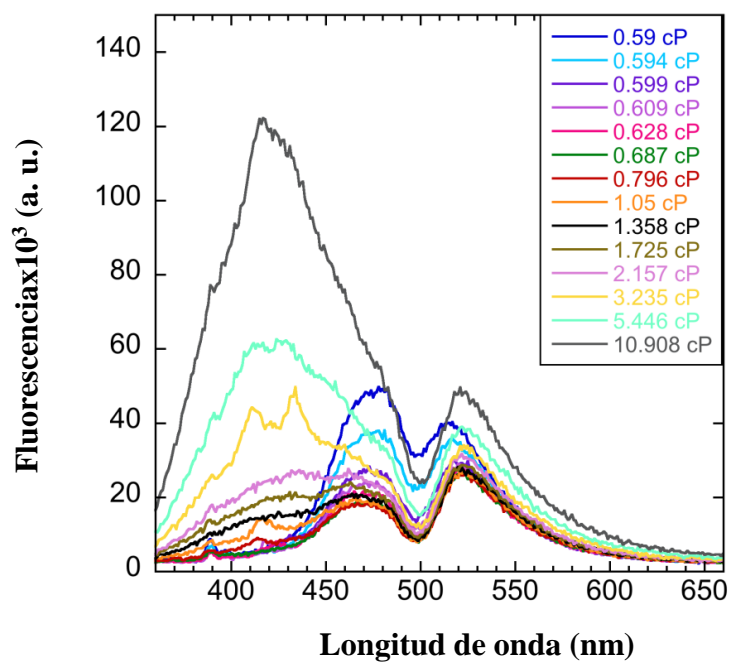


Figura 5.41. Espectros de fluorescencia de **2.5a** ($40 \mu\text{M}$) en diferentes proporciones metanol:glicerol.

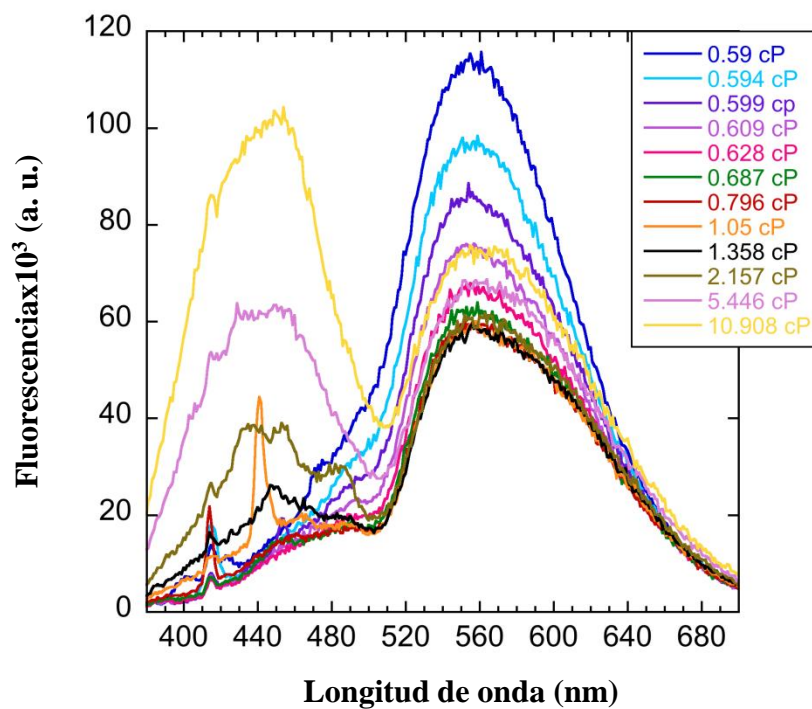


Figura 5.42. Espectros de fluorescencia de **2.5b** ($40 \mu\text{M}$) en diferentes proporciones metanol:glicerol

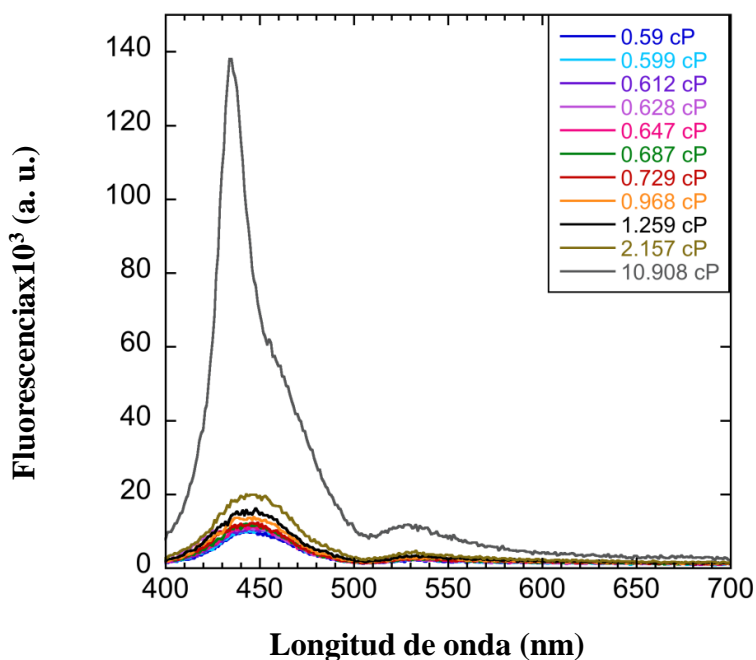
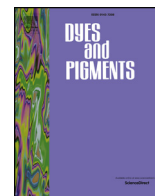


Figura 5.43. Espectros de fluorescencia de **2.5c** ($40 \mu\text{M}$) en diferentes proporciones metanol:glicerol.

5.4. Publicación



A series of dual-responsive Coumarin-Bodipy probes for local microviscosity monitoring

Javier Ordóñez-Hernández^a, Arturo Jiménez-Sánchez^{b,*}, Héctor García-Ortega^a,
Nuria Sánchez-Puig^c, Marcos Flores-Álamo^d, Rosa Santillan^e, Norberto Farfán^{a,**}

^a Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad de México, Mexico

^b Instituto de Química, Departamento de Química Orgánica, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad de México, Mexico

^c Instituto de Química, Departamento de Química de Biomacromoléculas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad de México, Mexico

^d Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad de México, Mexico

^e Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apdo. Postal 14-740, 0700, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Fluorescent probes
Viscosity probes
Coumarin
Bodipy
Fluorescent molecular rotors

ABSTRACT

Local microviscosity monitoring in living cells is a powerful tool to determine their healthy status in either a specific organelle or in the cytosol. Here is presented the rational design of a new family of self-calibrating dual-microviscosity probes as a strategy to improve the probe response at low viscosity ranges. We found one of the probes is useful to determine low viscosity variations in living cells where subtle stiffening of the rotor group in the probe can increase its viscosity sensitivity. Further X-ray structure analysis, fluorescence anisotropic measurements, and quantum chemical calculations of the electronic excitation by means of a natural transition orbital (NTO) analysis confirmed the observed response. The present work demonstrates that small viscosity variations (0.01–0.1 cP) in cells require improved analytical sensitivity to be properly monitored.

1. Introduction

Local microenvironment sensing is an essential tool that relates the physical and chemical behavior of a molecule with its surrounding. Molecular microenvironment information includes polarity, polarizability, acidity, basicity, microviscosity, temperature and redox status [1–7], thus being implicated in many biological processes [8].

Fluorescence molecular rotors are molecules exhibiting excited-state intramolecular rotation capable of being calibrated either by physical (light), chemical (ionic species) or physicochemical (local microviscosity) inputs [9–11]. On the other hand, fluorescence polarization techniques can be used to estimate the rotor dynamics. These techniques, however, require the probes to fulfill as far as possible the following requirements: 1) minimum disturbance by the medium, 2) transition moment symmetry and direction such that rotations can be considered as isotropic (thus the molecular structure of the rotor needs to be non-planar), 3) minimum specific interactions with the surrounding molecules and 4) minimum sensitivity of the excited-state lifetime to the microenvironment when only steady-state anisotropy is measured.

Despite microviscosity measurements in living cells and/or specific

organelles have been described previously, the analytical sensitivity of the molecular rotors remains poorly characterized. Most of the reported research focuses on instrumental sensitivity, time response, and the optical response nature. However, these probes have not been carefully designed nor evaluated for small microviscosity variations which comprises a crucial factor determining the intrinsic analytical sensitivity of the probe. In fact, most of the present literature describes a typical fluorophore calibration attained after extremely large changes in viscosity which do not occur in real biological samples [12–14].

On the other hand, monitoring of small microviscosity variations is a challenging enterprise since the probe needs to present a fluorescent response with only 0.1 cP variations. This subtle microviscosity variation can be achieved by an external perturbation such as temperature, pressure, and by the addition of chemical agents or drugs that induce cellular malfunction caused by structural changes or swelling [15–17].

In this contribution, we report a new family of probes with dual-emission band pattern containing a different rotor group, i.e. phenylene (**mVP1**), thiophenylene (**mVP2**), and a coumarin moiety directly connected to a Bodipy fragment (**mVP3**). The architecture of the probes belongs to the electron donor-acceptor family, featuring an electron-withdrawing boron-dipyrromethene (Bodipy) core and electron-

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: sogma_javi@hotmail.com (J. Ordóñez-Hernández), arturo.jimenez@quimica.unam.mx (A. Jiménez-Sánchez), norberto.farfán@gmail.com (N. Farfán).

donating 2H-chromen-2-one (coumarin) motif. Finally, rotational dynamics were evaluated by fluorescence anisotropic technique and X-ray structure analysis.

2. Experimental section

2.1. Materials and reagents

All starting materials were purchased from Aldrich and used without further purification. Solvents were dried by standard methods or distilled prior to use. Reactions were monitored by TLC on pre-coated silica gel plates (ALUGRAM SIL G/UV254) and revealed by exposure to a UV254 lamp. Melting points were determined using an Electrothermal Mel-Temp[®] apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were obtained using a Perkin-Elmer Spectrum 400 FT-IR/FT-FIR spectrophotometer, wavenumber is reported in cm^{-1} . Absorption and fluorescence spectra were obtained using a Perkin Elmer Lambda 2SUV/Vis spectrometer and Varian Cary Eclipse fluorescence spectrometer, respectively. Fluorescence spectra were recorded at 25 °C in a 1 cm quartz fluorescence cuvette placed in a thermostated holder at 25 ± 0.1 °C with a recirculating bath. All the fluorescence quantum yield measurements were obtained using the experimental procedure reported [18]. ^1H , ^{13}C , ^{11}B and ^{19}F NMR spectra were recorded using Varian Unity Inova 300, JEOL ECA 500 and Bruker 400 spectrometers, chemical shifts (δ /ppm) are reported relative to $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, CDCl_3 , BF_3OEt_2 , CFCl_3 . High-resolution mass spectra were acquired with an Agilent Technologies ESI TOF spectrometer.

2.2. Experimental procedure

7-(Diethylamino)-2H-chromen-2-one (1). 4-Diethylaminosalicylaldehyde (11.40 g, 59.0 mmol), diethyl malonate (18 mL, 118.0 mmol) and piperidine (6 mL) were dissolved in absolute ethanol (150 mL) and stirred for 24 h under reflux. Ethanol was evaporated under reduced pressure, concentrated HCl (100 mL) and glacial acetic acid (100 mL) were added with constant stirring and the reaction mixture was refluxed for 24 h. The solution was cooled to room temperature and poured into ice water (100 mL). NaOH was added to adjust the pH = 5.0 whereby a precipitate formed immediately. The solid was filtered, washed with water, dried and chromatographed over silica gel using methylene chloride as eluent to give 10.34 g of **1** (81% yield) as a pale yellow solid. Rf = 0.35 (hexane/ethyl acetate, 8:2). mp: 86–88 °C. FTIR (ATR, ν , cm^{-1}): 3112, 2970, 2927, 1713, 1616, 1582, 1541, 1408, 1385, 1347, 1257, 1203, 1071. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7.54 (d, J = 9.3 Hz, 1H, H-4), 7.26 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-5), 6.58 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H, H-6), 6.51 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-8), 6.05 (d, J = 9.3 Hz, 1H, H-3), 3.43 (q, J = 7.1 Hz, 4H, H-9), 1.23 (t, J = 7.1 Hz, 6H, H-10). ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 162.2 (C-2), 156.6 (C-8a), 150.6 (C-7), 143.6 (C-4), 128.7 (C-5), 109.0 (C-3), 108.6 (C-6), 108.2 (C-4a), 97.4 (C-8), 44.4 (C-9), 12.3 (C-10). HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ 217.1176, found $[\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2 + \text{H}]^+$ 218.1175.

3-Bromo-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one (2). This compound was synthesized following a procedure described in the literature [19,20] using 7-(diethylamino)coumarin (**1**) (6.13 g, 28.2 mmol) in acetic acid (100 mL) and Br_2 (1.73 mL, 33.8 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 50 min, the resulting orange solid was filtered and washed with water, dried and chromatographed over silica gel using methylene chloride/methanol (95:5) as eluent to give 8.35 g of **2** (82% yield) as a yellow solid. Rf = 0.52 (hexane/ethyl acetate, 8:2). mp: 130–132 °C. FTIR (ATR, ν , cm^{-1}): 3057, 2979, 2970, 2932, 2904, 2871, 2046, 1917, 1864, 1719, 1691, 1611, 1581, 1508, 1349, 1235, 1129. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7.88 (s, 1H, H-4), 7.21 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-5), 6.59 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H, H-6), 6.48 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-8), 3.41 (q, J = 7.1 Hz, 4H, H-9), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 6H, H-10). ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 158.3 (C-

2), 156.0 (C-8a), 150.8 (C-7), 144.7 (C-4), 128.3 (C-5), 109.3 (C-6), 108.9 (C-4a), 102.9 (C-3), 97.2 (C-8), 44.9 (C-9), 12.4 (C-10). HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{BrNO}_2$ 295.0286, found $[\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{BrNO}_2 + \text{H}]^+$ 296.0270.

4-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)benzaldehyde (3a). This compound was synthesized following a procedure described in the literature [21] using compound **2** (0.98 g, 3.3 mmol), 4-formylphenylboronic acid (1.00 g, 6.7 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.19 g, 1.7 mmol, 5% mol), K_2CO_3 (1.38 g, 10 mmol) and the mixture of EtOH (25 mL)/ H_2O (50 mL)/toluene (25 mL) under N_2 atmosphere. Compound **3a** (0.91 g, 85% yield) was obtained as a yellow solid. Rf = 0.29 (hexane/ethyl acetate, 8:2). mp: 126–128 °C. FTIR (ATR, ν , cm^{-1}): 3072, 2974, 2925, 2724, 1697, 1616, 1585, 1560, 1516, 1502, 1466, 1345, 1211, 1169, 1133. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 10.01 (s, 1H, H-5'), 7.85 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-2'), 7.83 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-3') 7.79 (s, 1H, H-4), 7.33 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-5), 6.62 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.53 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-8), 4.43 (q, J = 7.1 Hz, 4H, H-9), 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 6H, H-10). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 191.8 (C-5'), 161.1 (C-2), 156.5 (C-8a), 151.0 (C-7), 142.0 (C-4'), 141.7 (C-4), 135.2 (C-1'), 129.7 (C-2'), 129.4 (C-5), 128.6 (C-3'), 119.1 (C-3), 109.4 (C-6), 109.0 (C-4a), 97.2 (C-8), 45.0 (C-9), 12.4 (C-10). HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ 321.1438, found $[\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_3 + \text{H}]^+$ 322.1441.

5-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)thiophene-2-carbaldehyde (3b). Compound **2** (1.00 g, 3.3 mmol), 5-formylthiophen-2-ylboronic acid (1.00 g, 6.7 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.19 g, 1.7 mmol, 5% mol) and K_2CO_3 (1.38 g, 10 mmol) were dissolved in EtOH (60 mL) under N_2 . Then, the flask was placed under vacuum and back-filled with N_2 for three times and the reaction mixture was refluxed for 2 h. The resulting orange solid was filtered, washed with cold water and dried to give 0.85 g of **3b** (79% yield) as a yellow solid. Rf = 0.19 (hexane/ethyl acetate, 8:2). mp: 216–218 °C. FTIR (ATR, ν , cm^{-1}): 3074, 2969, 2695, 1916, 1683, 1653, 1617, 1587, 1510, 1411, 1351, 1260, 1232, 1134. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 9.90 (s, 1H, H-6'), 8.02 (s, 1H, H-4), 7.76 (d, J = 4.1 Hz, 1H, H-4'), 7.72 (d, J = 4.1 Hz, 1H, H-3'), 7.36 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-5), 6.64 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H, H-6), 6.53 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-8), 3.46 (q, J = 7.1 Hz, 4H, H-9), 1.25 (t, J = 7.1 Hz, 6H, H-10). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 182.8 (C-6'), 159.9 (C-2), 156.3 (C-8a), 151.5 (C-7), 147.7 (C-5'), 142.0 (C-2'), 139.2 (C-4), 136.4 (C-3'), 129.7 (C-5), 125.3 (C-4'), 112.9 (C-3), 109.7 (C-6), 108.4 (C-4a), 97.0 (C-8), 45.0 (C-9), 12.5 (C-10). HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}$ 327.1002, found $[\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S} + \text{H}]^+$ 328.1004.

7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carbaldehyde (3c). This compound was synthesized following a procedure described in the literature [22] using POCl_3 (2.4 mL, 25.8 mmol), compound **1** (1.80 g, 8.3 mmol), and DMF (15 mL) with N_2 atmosphere to give 1.40 g of **3c** (69% yield) as an orange solid. Rf = 0.19 (hexane/ethyl acetate, 8:2). mp: 164–165 °C. FTIR (ATR, ν , cm^{-1}): 3112, 2969, 2930, 2872, 1715, 1676, 1611, 1572, 1507, 1446, 1421, 1393, 1353, 1260, 1133. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 10.06 (s, 1H, H-11), 8.19 (s, 1H, H-4), 7.35 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H-5), 6.57 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H, H-6), 6.42 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-8), 3.41 (q, J = 7.2 Hz, 4H, H-9), 1.19 (t, J = 7.2 Hz, 6H, H-10). ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 187.9 (C-11), 161.8 (C-2), 158.9 (C-8a), 153.4 (C-7), 145.3 (C-4), 132.5 (C-5), 114.3 (C-3), 110.3 (C-6), 108.2 (C-4a), 97.1 (C-8), 45.3 (C-9), 12.4 (C-10). HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ 245.1125, found $[\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_3 + \text{H}]^+$ 246.1128.

3-(4-(Di(1H-pyrrol-2-yl)methyl)phenyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one (4a). Compound **3a** (0.99 g, 3.1 mmol) and pyrrole (4.30 mL, 61.6 mmol) were dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (50 mL) under N_2 atmosphere followed by the addition of trifluoroacetic acid (0.24 mL, 3.1 mmol). The reaction mixture was stirred under N_2 for 10 min at room temperature, quenched with NaOH solution (0.1 M) and washed with water. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent and pyrrole excess were removed under reduced pressure. The crude product was supported on celite and purified by column

chromatography over silica gel with hexane/ethyl acetate (85:15) as eluent to give 0.45 g of **4a** (34% yield) as a brown solid. Rf = 0.19 (hexane/ethyl acetate, 8:2). mp: 110 °C (dec.). FTIR (ATR, ν , cm^{-1}): 3356, 3097, 3029, 2971, 2928, 1704, 1615, 1591, 1519, 1406, 1351, 1270, 1132. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7.96 (s, 2H, H-1'), 7.65 (s, 1H, H-4), 7.62 (dt, J = 8.3, 1.9 Hz, 2H, H-2'), 7.29 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-5), 7.24 (dt, J = 8.3, 1.9 Hz, 2H, H-3'), 6.69–6.67 (m, 2H, H-5'), 6.59 (dd, J = 8.8, 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.52 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-8), 6.15 (dd, J = 6.0, 2.7 Hz, 2H, H-4''), 5.96–5.92 (m, 2H, H-3''), 5.49 (s, 1H, H-5'), 3.41 (q, J = 7.1 Hz, 4H, H-9), 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 6H, H-10). ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 156.2 (C-2), 154.8 (C-8a), 150.6 (C-7), 141.5 (C-1'), 140.5 (C-4), 134.6 (C-4'), 132.3 (C-2''), 128.9 (C-5), 128.5 (C-2'), 128.4 (C-3'), 120.4 (C-3), 117.2 (C-5''), 109.1 (C-4a), 109.0 (C-6), 108.5 (C-4''), 107.1 (C-3''), 97.1 (C-8), 44.9 (C-9), 43.8 (C-5'), 12.5 (C-12). HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2$ 437.2176, found $[\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2 + \text{H}]^+$ 438.2176.

3-(5-(Di(1H-pyrrol-2-yl)methyl)thiophen-2-yl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one (4b). This compound was obtained as described for **4a** using **3b** (0.90 g, 2.75 mmol), pyrrole (3.8 mL, 55.0 mmol), trifluoroacetic acid (0.21 mL, 2.7 mmol) and anhydrous CH_2Cl_2 (50 mL). The product was obtained as a brown solid (0.44 g, 36% yield). Rf = 0.19 (hexane/ethyl acetate, 8:2). mp: 148–150 °C. FTIR (ATR, ν , cm^{-1}): 3373, 3215, 3093, 2962, 2922, 2854, 2339, 1699, 1616, 1591, 1190, 1078, 964, 814, 706. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 8.09 (s, 2H, H-1'), 7.78 (s, 1H, H-4), 7.53 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-3'), 7.27 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-5), 6.87 (d, J = 3.7 Hz, 1H, H-4'), 6.72 (dd, J = 4.1, 2.7 Hz, 2H, H-5''), 6.59 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.51 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.17 (dd, J = 5.8, 2.7 Hz, 2H, H-4''), 6.10–6.06 (m, 2H, H-3''), 5.74 (s, 1H, H-6'), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H, H-9), 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 6H, H-10). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 160.6 (C-2), 155.5 (C-8a), 150.5 (C-7), 145.7 (C-5'), 136.8 (C-2'), 136.7 (C-4), 131.9 (C-2''), 128.9 (C-5), 126.1 (C-4'), 125.0 (C-3'), 117.6 (C-5''), 114.6 (C-3), 109.4 (C-6), 108.8 (C-4a), 108.5 (C-4''), 107.1 (C-3''), 97.1 (C-8), 45.0 (C-9), 39.4 (C-6'), 12.6 (C-10). HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ 444.1740, found $[\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2\text{S} + \text{H}]^+$ 445.1740.

3-(Di(1H-pyrrol-2-yl)methyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one (4c). This compound was obtained as described for **4a** using **3c** (0.89 g, 3.6 mmol), pyrrole (3.8 mL, 72.6 mmol), trifluoroacetic acid (0.21 mL, 3.6 mmol) and anhydrous CH_2Cl_2 (50 mL). The product was obtained as a light brown solid (0.52 g, 36% yield). Rf = 0.19 (hexane/ethyl acetate, 8:2). mp: 142–143 °C. FTIR (ATR, ν , cm^{-1}): 3352, 3219, 2972, 1689, 1594, 1514, 1412, 1350, 1238, 1194, 1132, 1105, 800, 713, 704. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 8.66 (s, 2H, H-1'), 7.43 (s, 1H, H-4), 7.16 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-5), 6.69–6.67 (m, 2H, H-5'), 6.53 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.44 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.13 (dd, J = 5.9, 2.9 Hz, 2H, H-4'), 6.00–5.97 (m, 2H, H-3'), 5.42 (s, 1H, H-11), 3.37 (q, J = 7.1 Hz, 4H, H-9), 1.18 (t, J = 7.1 Hz, 6H, H-10). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 163.3 (C-2), 155.8 (C-8a), 150.3 (C-7), 141.2 (C-4), 130.9 (C-2'), 128.7 (C-5), 122.1 (C-3), 117.3 (C-5'), 108.8 (C-6), 108.4 (C-4a), 108.1 (C-4'), 106.5 (C-3'), 96.9 (C-8), 44.7 (C-9), 40.0 (C-11), 12.4 (C-10). HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$ 361.1863, found $[\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2 + \text{H}]^+$ 362.1865.

meso-(4-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)phen-1-yl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (mVP1). Compound **4a** (0.41 g, 0.9 mmol) and DDQ (0.28 g, 1.2 mmol) were dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (50 mL). Then, the flask was placed under vacuum and back-filled with N_2 three times while the reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. After this time $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (2.60 mL, 20.7 mmol) was added dropwise and stirred for 10 min followed by dropwise addition of Et_3N (2.90 mL, 20.7 mmol). The reaction was stirred for 2 h and then washed with water; the organic solvents were removed under reduced pressure. The crude product was supported on celite and purified by column chromatography over silica gel with hexane/ethyl acetate (85:15) as eluent to give 0.14 g of **mVP1** (31% yield) as a green solid. Rf = 0.19 (hexane/ethyl acetate, 8:2). mp:

214–216 °C. FTIR (ATR, ν , cm^{-1}): 3185, 3113, 2970, 1710, 1619, 1591, 1558, 1539, 1521, 1412, 1385, 1356, 1108, 1069, 984, 771. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7.95 (s, 2H, H-3'), 7.90 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-3''), 7.84 (s, 1H, H-4), 7.63 (d, J = 8.2 Hz, 2H, H-2'), 7.37 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-5), 7.02 (d, J = 3.8 Hz, 2H, H-1'), 6.64 (dd, J = 8.8, 2.2 Hz, 1H, H-6), 6.58–6.55 (m, 3H, H-8, H-2''), 3.46 (q, J = 7.1 Hz, 4H, H-9), 1.25 (t, J = 7.1 Hz, 6H, H-10). ^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 161.4 (C-2), 156.4 (C-8a), 151.0 (C-7), 147.0 (C-1'), 143.9 (C-3''), 141.4 (C-4), 138.7 (C-4'), 134.8 (C-8''), 132.8 (C-8a''), 131.5 (C-1''), 130.6 (C-2'), 129.3 (C-5), 128.2 (C-3'), 118.9 (C-3), 118.5 (C-2'), 109.2 (C-6), 108.9 (C-4a), 97.0 (C-8), 44.9 (C-9), 12.4 (C-10). ^{11}B NMR (160.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -0.25 (t, $J_{\text{B-F}}$ = 28.8 Hz). ^{19}F NMR (282.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -145.12 (q, $J_{\text{B-F}}$ = 28.8 Hz). HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{BN}_3\text{O}_2\text{F}_2$ 483.2002, found $[\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{BN}_3\text{O}_2\text{F}_2 + \text{H}]^+$ 484.2000.

meso-(5-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)thiophen-2-yl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (mVP2). This compound was obtained as described for **mVP1**, using compound **4b** (0.43 g, 1.0 mmol), DDQ (0.29 g, 1.3 mmol), anhydrous CH_2Cl_2 (50 mL), $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (2.70 mL, 21.0 mmol) and Et_3N (2.90 mL, 21.0 mmol). The product was obtained as a black solid (0.12 g, 26% yield). Rf = 0.12 (hexane/ethyl acetate, 8:2). mp: 188–190 °C. FTIR (ATR, ν , cm^{-1}): 3142, 3123, 3097, 3026, 2964, 2925, 1696, 1618, 1590, 1533, 1385, 1258, 1114, 955, 769. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 8.05 (s, 1H, H-4), 7.91 (s, 2H, H-3'), 7.76 (d, J = 4.1 Hz, 1H, H-4'), 7.59 (d, J = 4.1 Hz, 1H, H-3''), 7.41–7.37 (m, 3H, H-1', H-5), 6.66 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H, H-6), 6.58 (dd, J = 4.2, 1.9 Hz, 2H, H-2'), 6.56 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-8), 3.47 (q, J = 7.1 Hz, 4H, H-9), 1.25 (t, J = 7.1 Hz, 6H, H-10). ^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 160.3 (C-2), 156.0 (C-8a), 151.4 (C-7), 145.0 (C-5'), 142.8 (C-3''), 139.7 (C-2'), 138.0 (C-4), 134.6 (C-8''), 133.9 (C-3'), 133.8 (C-8a''), 131.2 (C-1''), 129.6 (C-5), 124.7 (C-4'), 118.1 (C-2''), 112.8 (C-3), 109.8 (C-6), 108.5 (C-4a), 97.0 (C-8), 45.0 (C-9), 12.4 (C-10). ^{11}B NMR (160.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -0.31 (t, $J_{\text{B-F}}$ = 28.8 Hz). ^{19}F NMR (282.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -145.38 (q, $J_{\text{B-F}}$ = 28.8 Hz). HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{BN}_3\text{O}_2\text{F}_2\text{S}$ 489.1567, found $[\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{BN}_3\text{O}_2\text{F}_2\text{S} + \text{H}]^+$ 490.1569.

meso-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (mVP3). This compound was obtained as described from **mVP1** using compound **4c** (0.24 g, 0.7 mmol), DDQ (0.19 g, 0.9 mmol), anhydrous CH_2Cl_2 (50 mL), $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (1.70 mL, 13.2 mmol) and Et_3N (1.40 mL, 10.0 mmol). The product was obtained as a green solid (0.08 g, 30% yield). Rf = 0.12 (hexane/ethyl acetate, 8:2). mp: 83 °C (dec.). FTIR (ATR, ν , cm^{-1}): 3106, 2971, 2927, 1713, 1616, 1582, 1541, 1509, 1408, 1385, 1347, 1257, 1071, 1033, 955, 762. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7.89 (s, 2H, H-3'), 7.81 (s, 1H, H-4), 7.35 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-5), 7.10 (d, J = 4.2 Hz, 2H, H-1'), 6.65 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H, H-6), 6.56 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-8), 6.52 (dd, J = 4.2, 1.4 Hz, 2H, H-2'), 3.48 (q, J = 7.1 Hz, 4H, H-9), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 6H, H-10). ^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 160.1 (C-2), 157.4 (C-8a), 152.2 (C-7), 146.1 (C-4), 144.2 (C-3'), 141.2 (C-8'), 135.1 (C-8a'), 130.3 (C-5), 130.2 (C-1'), 118.3 (C-2'), 113.1 (C-3), 109.6 (C-6), 107.6 (C-4a), 97.0 (C-8), 45.08 (C-9), 12.4 (C-10). ^{11}B NMR (160.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -0.36 (t, $J_{\text{B-F}}$ = 28.8 Hz). ^{19}F NMR (282.4 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -147.87 (q, $J_{\text{B-F}}$ = 28.8 Hz), -142.77 (q, $J_{\text{B-F}}$ = 28.8 Hz). HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{BN}_3\text{O}_2\text{F}_2$ 407.1689, found $[\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{BN}_3\text{O}_2\text{F}_2 + \text{H}]^+$ 408.1691.

3. Results and discussion

Monitoring physical status in cells using fluorescent probes that measure intracellular viscosity is a promising tool for the diagnosis of several diseases such as diabetes, Parkinson's and Alzheimer's diseases and different types of cancer [23]. However, important improvements in terms of the molecular rotor sensitivity toward subtle changes in viscosity are desired. To this end, many restrictions arise, for instance if molecular rotation is highly allowed the radiative deactivation channel

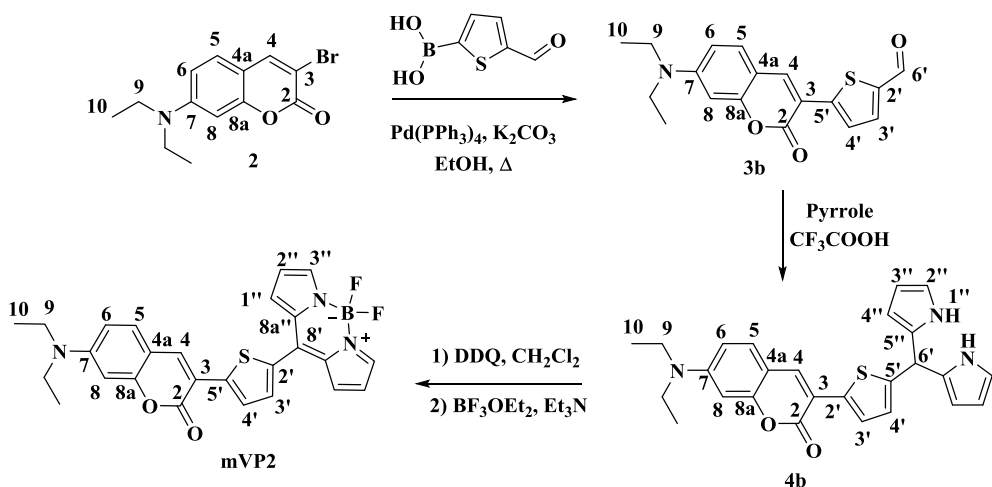
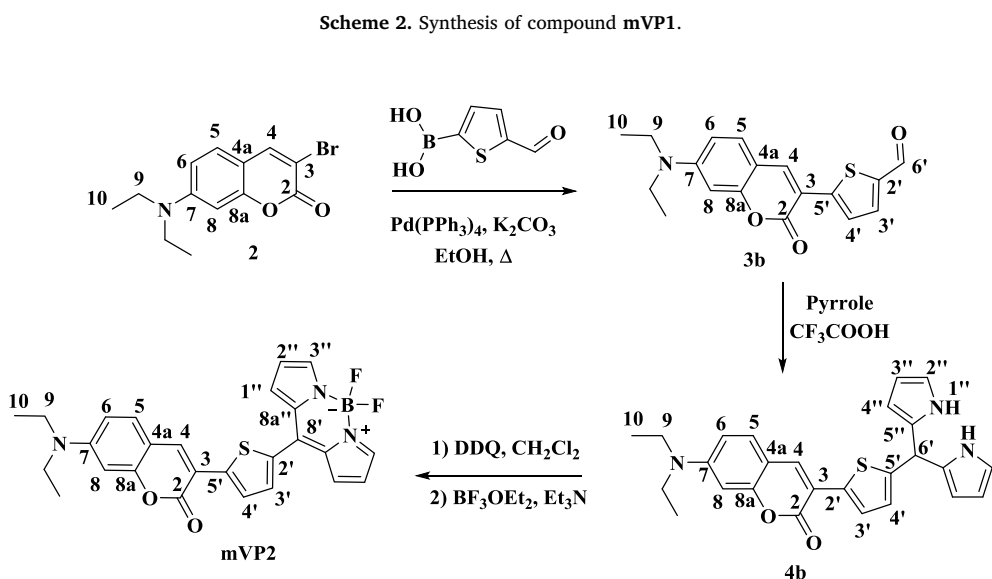
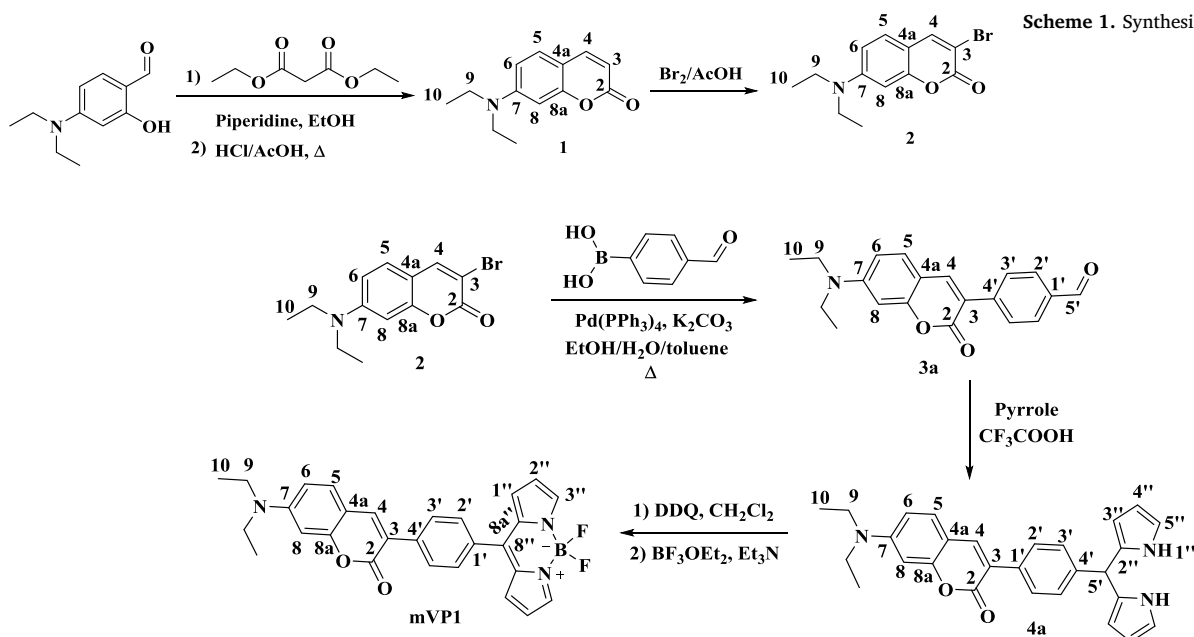
will be inhibited thus reducing quantum yield and sensitivity and, on the other hand, if that rotation is restricted, this will lead to a non-linear Förster-Hoffmann behavior, where the probe will not be useful to measure viscosity variations. In the search to design sensitive probes, the compounds *meso*-(4-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)phen-1-yl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**mVP1**), *meso*-(5-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)thiophen-2-yl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**mVP2**) and *meso*-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**mVP3**) were prepared as described below (Schemes 1–4).

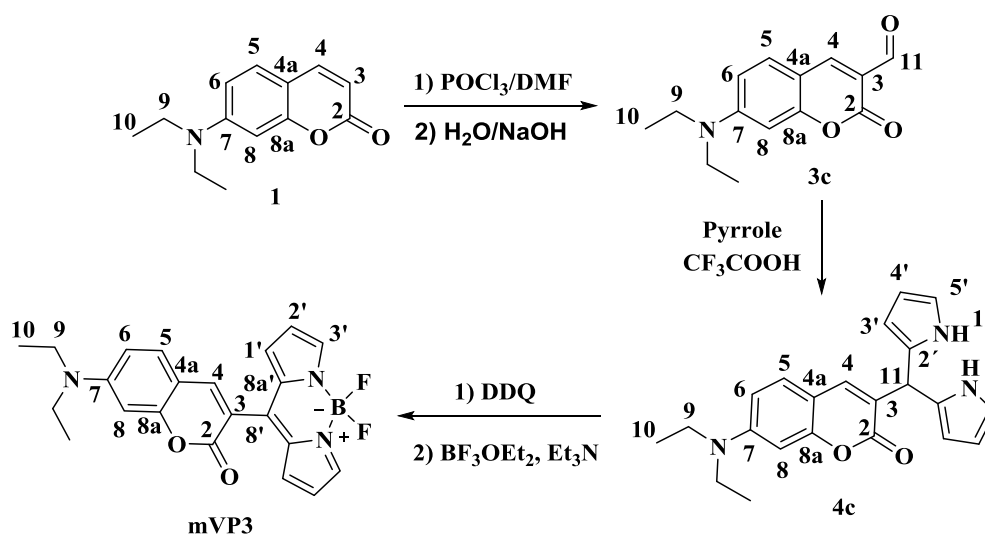
Single crystal X-ray studies showed that **mVP1**, **mVP2** and **mVP3** crystallize in the monoclinic systems with $P2_1/n$, $C2/c$ and $P2_1/c$ space groups respectively (Table S1).

In **mVP1**, the discrete unit contains one Bodipy-phenylene-coumarin molecule with a phenylene-Bodipy torsion angle of $51.31(4)^\circ$ with a bond distance connecting these fragments of $1.475(3) \text{ \AA}$. A search in the Cambridge Structural Data evidenced that the values of bond lengths and angles are within the expected range (see Figs. S31–S33[†]). Of notice, the angle formed between the Coumarin-Bodipy

planes is $14.32(5)^\circ$. The asymmetric unit of **mVP2** is formed by the Bodipy-thiophenylene-coumarin molecule, the **mVP3** structure consists of one Coumarin-Bodipy molecule (Fig. 1). The torsion angles between the planes containing the fluorophore units, i.e. **mVP1** ($14.32(5)^\circ$), **mVP2** ($30.94(6)^\circ$) and **mVP3** ($68.45(3)^\circ$) evidenced that introducing a larger group between the coumarin-Bodipy system creates a strong tendency to planarity, thus facilitating the rotational dynamics.

Although the introduction of a thiophenylene group can induce an electronic distribution polarization, it led to a V-shaped structure [24] which significantly decreased the intramolecular charge transfer (ICT) interactions. In fact, careful analysis by means of charge transfer excitation parameters, the so-called spatial extent index [25,26], revealed that the fraction of electron charge transferred upon de-excitation from the local excited (LE) state of **mVP1** was $q_{CT} = 0.85$ at a $D_{CT} = 9.16 \text{ \AA}$ spatial distance from the donor centroid to the acceptor centroid. This electron redistribution corresponds to an electric dipole moment difference of 27.6 D . The H index defined as half of the sum of the centroid axis along the donor–acceptor direction is 2.35 , which resulted to be 4.47 \AA lower than the CT excitation length; this represents no overlap





Scheme 4. Synthesis of compound mVP3.

between donor and acceptor centroids allowing for highly efficient CT process. In the case of probes **mVP2** and **mVP3**, we obtained q_{CT} values of 0.69 and 0.84 at a D_{CT} of 6.81 and 5.47 Å spatial distances, respectively, leading to H index values of 2.92 and 1.97. Consequently, a much larger amount of overlap (0.96 and 1.53 Å lower than the CT excitation length, respectively) was observed (Tables S2–S4).[†]

Then, an important suppression of solvent polarity interference is promoted [27–30]. Similarly, probe **mVP3** experienced an important disruption of ICT due to the twisted conformation that the probe adopts in its longitudinal axis. However, as shown in the theoretical calculations section, we observed that the electron distribution for **mVP3** spans over the same region for HONTO-LUNTO natural transition orbitals, where the Bodipy fragment contributes more to the LUNTO level, although this contribution is less strong for **mVP3** compared to **mVP1** and **mVP2**, highlighting that ICT process is less efficient for **mVP3** but still exists. These subtle structure modifications not only hinder solvent

polarity interference (Tables S5–S7[†], Fig. S35[†] and Fig. 2) but also triggered significant viscosity sensitivity in the low viscosity range. On the other hand, the linear dynamic range of this system at higher viscosity is reduced since the rotational states are hindered in comparing to those for **mVP1–2** (Figs. S35–S36[†]). The overall position of the absorption bands exhibits a non-monotonic behavior with solvent polarity increments. In contrast, for proton-donor solvents such as *n*-octanol, benzyl alcohol, cyclohexanol, *i*-butanol, *n*-butanol, *i*-propanol, ethanol, 2-chloroethanol, polyethylene glycol, ethylene glycol, methanol and water, all the probes showed additional absorption bands in the range between 500 and 600 nm. This red-shift band pattern observed in the fluorescence spectra at wavelengths comprising 600–800 nm can be attributed to specific solvent-solute hydrogen bonding interactions.

Further solvatochromic analysis indicates a strong Stokes shift-solvent dependence implying that upon photoexcitation significant geometric variations are taking place in the excited state of the probe depending on the medium. In fact, large variations were observed for **mVP1** (658 cm^{-1} in pentane to 5700 cm^{-1} in water) while **mVP3** presented the smallest variations (1020 cm^{-1} in pentane to 5360 cm^{-1} in water) highlighting a smaller conformational (rotational) motion for the latter.

The viscosity influence was first addressed by means of the Förster-Hoffmann logarithmic analysis. Figs. S35–S37[†] show the linear relationship between relative quantum yields and viscosity variations obtained for the probes, suggesting a rotational dynamics as a function of viscosity variations. The analysis was extended to include small variations at low viscosities. Only **mVP3** showed a linear increment in the fluorescence intensity upon changes in viscosity. For probes **mVP1–2** an anomalous fluorescence decrement prevents monitoring their relationship with viscosity variations (Fig. 3).

Fluorescence anisotropy constitutes a method to determine the molecular orientation and mobility of a molecule; thus helping to understand how local viscosity affects a probe photophysics. Typical anisotropic fluorophores are excited by polarized light, since electric vector of which is parallel to the vector of the absorption transition moment of the molecule. Therefore, during the lifetime of the excited state, the molecule rotates changing the polarization plane [31].

As can be seen in Fig. 4, a similar working dynamic range for the three molecular rotors is obtained. However, in the low viscosity region (0.59–10 cP) only probe **mVP3** responded with homogeneous increments in anisotropy, highlighting its viscosity sensitivity in the low viscosity range. This behavior could be attributed to a relatively higher rotational vibration dynamic in this probe since their unidirectional and

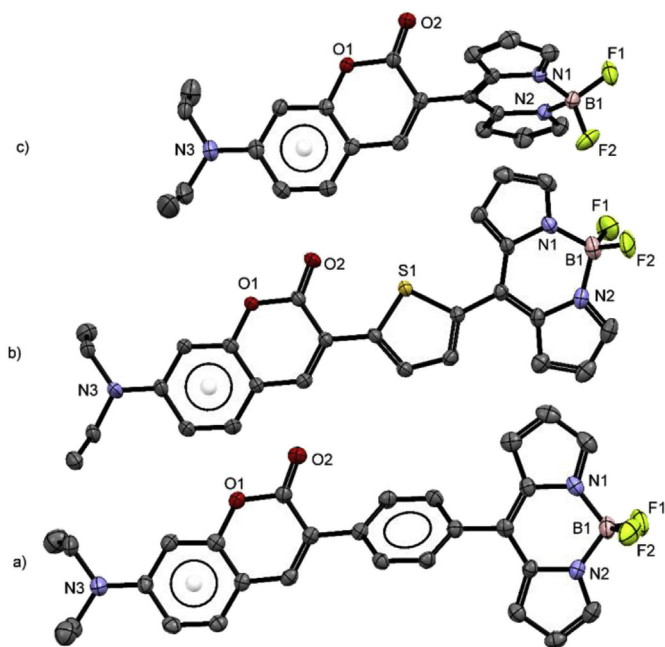


Fig. 1. ORTEP plots for a) **mVP1**, b) **mVP2**, and c) **mVP3** compounds. Hydrogen atoms are omitted for clarity (70% ellipsoid probability level). CCDC: 1553447–1553449.

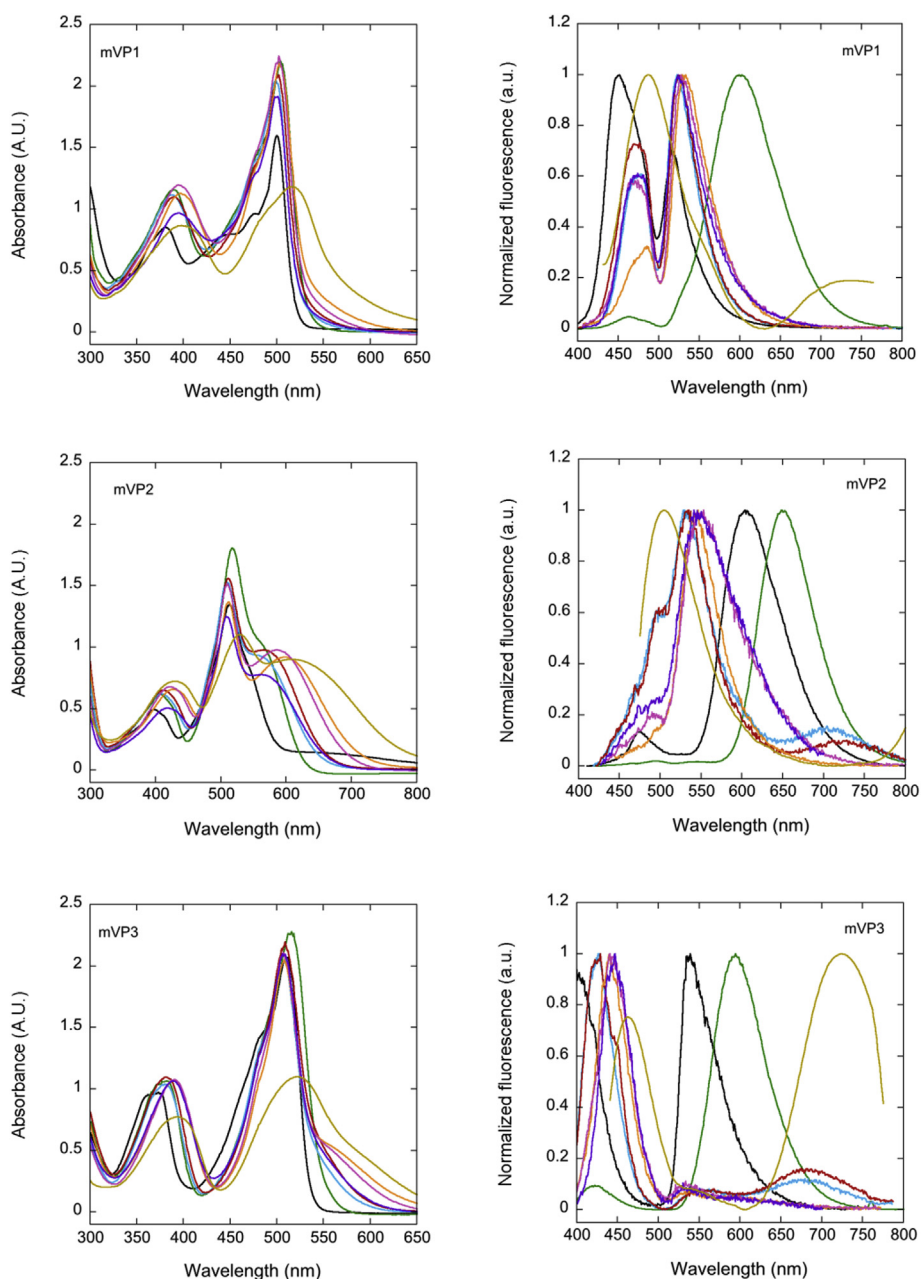


Fig. 2. UV-Vis/fluorescence emission spectra for **mVP1-3**. Some solvents were omitted for clarity; the spectra for all the solvents tested are presented in [Figure S35](#). Color code is as follows: pentane (black), *p*-Xylene (green), AcOEt (blue), THF (red), DMSO (orange), NMF (pink), EtOH (purple), water (gold). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

full-rotational motions are probably prevented by steric hindrance.

To gain insight into the molecular structure influence on the observed optical properties, we implemented a time-dependent density functional theory (TD-DFT) analysis for the three molecules. DFT calculations at a PBE0/6-31 + G (d, p)/PCM-methanol level of theory were used to determine the optimized molecular geometry of probes **mVP1-3**. The frequency analysis suggests that these geometries correspond to an energy minimum. The TD-DFT was carried out by a natural transition orbital analysis (NTO). NTO represents the most compact orbital representation for a given single-electronic excitation; we analyzed the absorption properties at the frontier region of the molecules. [Fig. 5](#) shows the NTO distribution for **mVP1-3**. Noteworthy, the three molecules can be viewed as planar dipolar structures with a Cs symmetry. The electronic transition from the ground ($|g\rangle$) to the first excited state ($|e1\rangle$) is represented as $A' \rightarrow A''$. As can be seen in [Fig. 5](#), a

strong ICT character in the $A' \rightarrow A''$ transition is present in compound **mVP1** at this hole-particle distribution, where the hole is spread in the coumarin moiety and the electron is mainly spread in the Bodipy unit. In the case of **mVP2** a similar ICT character is present but to a lesser extent. Importantly, very low ICT character can be observed for probe **mVP3**. This effect was also observed in the transition density analysis (mentioned earlier) and can be attributed to the slight twisting present in **mVP3**. Overall these observations lead to low polarity interference during viscosity monitoring using probe **mVP3** compared with the other probes.

Finally, we performed confocal fluorescence microscopy imaging of HeLa cells stained with the probes finding better image contrast for **mVP3** derivative, [Fig. S44](#). HeLa cells were seeded in three different 8-well μ -slides at a density of 15000 cells per well 1 day prior to experiments in RPMI medium supplemented with 10% FBS. Then, 10 μ M

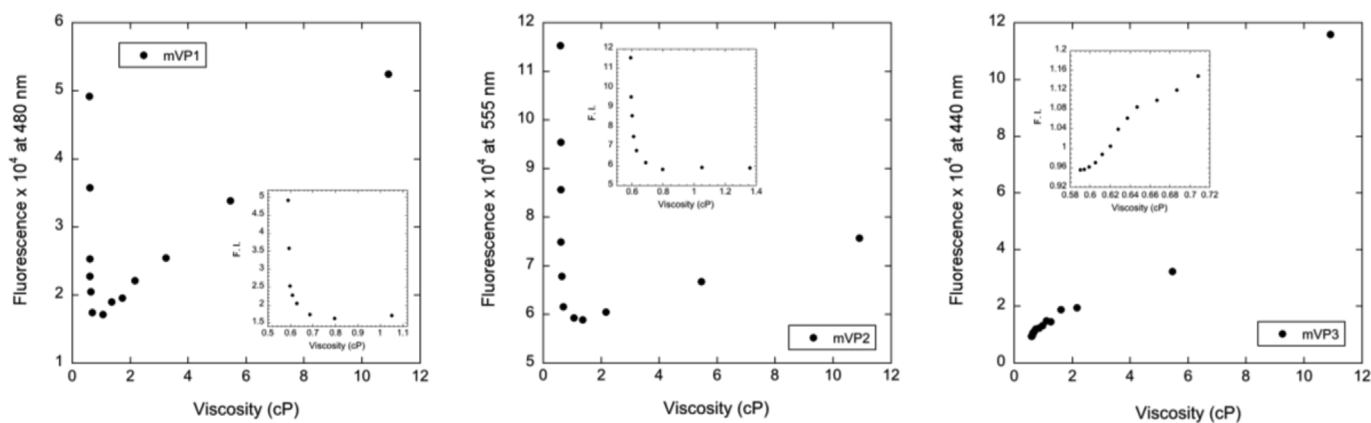


Fig. 3. Viscosity titration profiles of 40 μM **mVP1-3** upon small viscosity variations using methanol:glycerol mixtures.

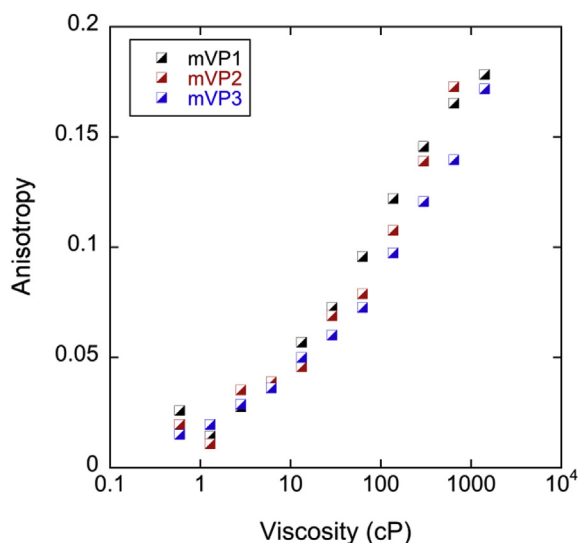


Fig. 4. Steady-state fluorescence anisotropy profile of 40 μM **mVP1-3** evaluated at different viscosities ranging from 0.59 cP to 1410 cP.

mVP1-3 probes in RPMI medium were added on each slide 30 min before imaging experiments. The background fluorescence controls were obtained with non-treated cells. The probes exhibited non-specific organelle distribution, i.e. non-specific membrane localization as seen in Fig. 6C for **mVP3**. This type of cell membrane localization for the probes could be a consequence of the lack of formal charge distribution and their relatively low hydrophobicity that prevents selective localization. The ratiometric emission pattern (Fig. 6A) allows to estimate the viscosity status of the cell with the probe **mVP3** using a ratiometric calibration plot which has a good dynamic range (Fig. 6B). Thus, comparison between the calibration ratiometric plot for the probe and the ratiometric images for the living cells indicates a viscosity map varying from 1.3 to 62.0 cP (ratio values from 6 to 16). The methanol:glycerol scale matches with that of the confocal ratiometric scale. For example, the viscosity distribution for the membranes at the peripheral nucleus region had a viscosity range of 40–50 cP with a predominant region of $r = 14.2$ (~ 43 cP), while cytosol region has a ~ 1.3 cP viscosity ($r = 6.6$) Fig. 6C. Then, small viscosity changes in cells can be estimated thus enabling improved analytical sensitivity to be properly monitored. Furthermore, a very stable fluorescence intensity behavior was only observed for **mVP3** with no intensity variation occurring during the experiment (Fig. 6). The red-channel is, on the other hand,

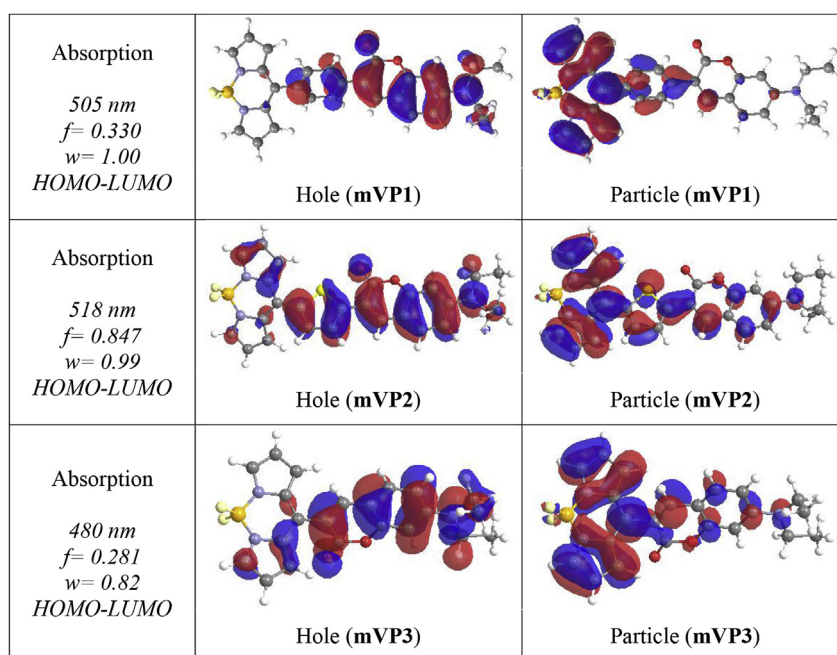


Fig. 5. Natural Transition Orbitals (NTOs) computed at PBE0/6-31 + G(d,p)/PCM-methanol for **mVP1-3**. The left column shows the wavelength value in nanometers, the oscillator strength value in nanometers, the oscillator strength (f), the NTO eigenvalue (w) and the MO occupation.

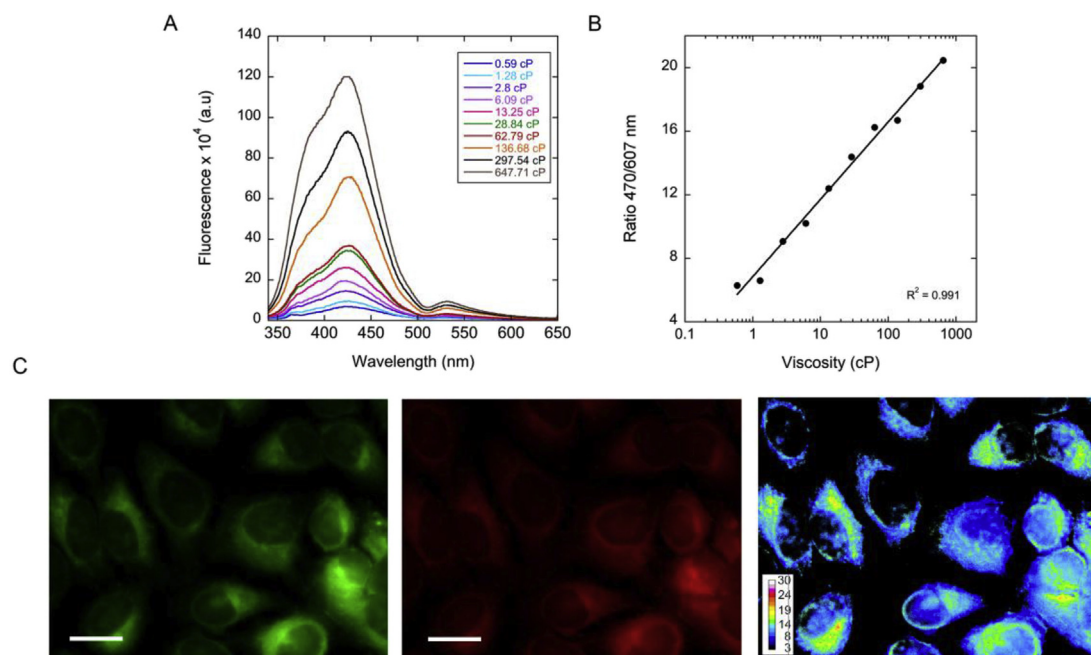


Fig. 6. A) Fluorescence emission spectra of **mVP3** in methanol:glycerol mixtures varying viscosity from 0.59 to 647.71 cP. B) The corresponding calibration plot between ratio of emission maxima (Ratio 470/607 nm vs. viscosity in cP). C) Confocal fluorescence images in the green ($\lambda_{em} = 470$ nm), red ($\lambda_{ex} = 613$ nm) and ratiometry (green/red) channels for Hela cells stained with 5 μ M for **mVP3**. Scale bar represents 20 μ m while the inset in the ratiometry images represent the ratio scale bar in pseudo-colors. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

weaker in intensity due to the lower conjugation present in **mVP3**. However, this pitfall can be overcome by simple instrumental setup. Finally, the probe exhibited non-specific organelle localization but the viscosity measurements do not suffer interference by interactions with nuclear RNA or specific protein intercalation, a common issue for coumarin-based probes.

4. Conclusions

In conclusion, we report a new family of rotors with dual-emission band pattern based on Coumarin-Bodipy constructs. Particularly, **mVP3** probe was found able to monitor small viscosity differences in living cells. Single crystal X-ray studies show that a larger linker between the coumarin and Bodipy moieties promotes planarity, facilitating the rotational dynamics of the probe (**mVP1-2**). However, small viscosity increments were found to be of strong influence for probe **mVP3**, having subtle stiffening of the rotor fragment. Further, the viscosity sensitivity expands a wide range, in the case of probe **mVP3** subtle changes at a low viscosity region can be detected and a wide linear dynamic range is favored ($r = 5$ to 22). Fluorescence anisotropic measurements pointed out a linear behavior for **mVP3** particularly at low viscosity values. Finally, local microviscosity monitoring in living cells stained with the probes were determined by means of confocal ratiometric analyzes finding better image contrast for **mVP3** derivative. Although probe **mVP3** exhibited a non-specific organelle interaction, this concept can be used for specific organelle targeting strategies.

Acknowledgements

A. Jiménez-Sánchez acknowledges the UNAM supercomputer Mistli cluster for computational resources. N. Farfán acknowledges to Facultad de Química, UNAM (PAPIIT IN-216616). J. Ordóñez-Hernández acknowledges to CONACYT for the granted scholarship (271117).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.05.009>.

References

- [1] Jiang N, Fan J, Xu F, Peng X, Mu H, Wang J, Xiong X. Ratiometric fluorescence imaging of cellular polarity: decrease in mitochondrial polarity in cancer cells. *Angew Chem Int Ed* 2015;54(8):2510–4.
- [2] Xu Z, Xu L. Fluorescent probes for the selective detection of chemical species inside mitochondria. *Chem Commun* 2016;52:1094–119.
- [3] Wang B, Zhang X, Wang C, Chen L, Xiao Y, Pang Y, Bipolar, Probe Fixable. Targeting mitochondria to trace local depolarization via two-photon fluorescence lifetime imaging. *Analyst* 2015;140(16):5488–94.
- [4] Yang Z, Cao J, He Y, Yang JH, Kim T, Peng X, Kim JS. Macro-/Micro-Environment-Sensitive chemosensing and biological imaging. *Chem Soc Rev* 2014;43:4563–601.
- [5] Sarkar AR, Heo CH, Xu L, Lee HW, Si HY, Byun JW, Kim HM. A ratiometric two-photon probe for quantitative imaging of mitochondrial pH values. *Chem Sci* 2016;7:766–73.
- [6] Shota H, Satoshi A, Shinji T. A TEMPO-conjugated fluorescent probe for monitoring mitochondrial. *Chem Commun* 2012;48:4845–7.
- [7] Homma M, Takei Y, Murata A, Inoue T, Takeoka S. A ratiometric fluorescent molecular probe for visualization of mitochondrial temperature in living cells. *Chem Commun* 2015;51:6194–7.
- [8] Andreux PA, Houtkooper RH, Auwerx J. Pharmacological approaches to restore mitochondrial function. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(6):465–83.
- [9] Valeur B. Fluorescent probes for evaluation of local physical, structural parameters. In: Schulman SG, editor. *Molecular luminescence spectroscopy. Methods and applications. Part 3*. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1993. p. 109–49.
- [10] Kung CE, Reed JK. Fluorescent molecular rotors: a new class of probes for tubulin structure and assembly. *Biochemistry* 1989;28(16):6678–86.
- [11] Dakanali M, Do TH, Horn A, Chongchivivat A, Jarusreni T, Lichlyter D, Guizzunti G, Haidekker MA, Theodorakis EA. Self-calibrating viscosity probes: design and sub-cellular localization. *Bioorg Med Chem* 2012;20(14):4443–50.
- [12] Wandelt B, Cywinski P, Darling GD, Stranix BR. Single cell measurement of microviscosity by ratio imaging of fluorescence of styrylpyridinium probe. *Biosens Bioelectron* 2005;20(9):1728–36.
- [13] Gatzogiannis E, Chen Z, Wei L, Wombacher R, Kao YT, Yefremov G, Cornish VW, Min W. Mapping protein-specific micro-environments in live cells by fluorescence lifetime imaging of a hybrid genetic-chemical molecular rotor tag. *Chem Commun* 2012;48(69):8694–6.
- [14] Li J, Zhang Y, Zhang H, Xuan X, Xie M, Xia S, Qu G, Guo H. Nucleoside-based ultrasensitive fluorescent probe for the dual-mode imaging of microviscosity in living cells. *Anal Chem* 2016;88(10):5554–60.

- [15] Liu F, Wu T, Cao J, Cui S, Yang Z, Qiang X, Sung S, Song F, Fan J, Wang J, Peng X. Ratiometric detection of viscosity using a two-photon fluorescent sensor. *Chem Eur J* 2013;19(5):1548–53.
- [16] Varga ZV, Ferdinandy P, Liaudet L, Pacher P. Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015;309(9):1453–67.
- [17] Song X, Li N, Wang C, Xiao Y. Targetable and fixable rotor for quantifying mitochondrial viscosity of living cells by fluorescence. *J Mater Chem B* 2017;5:360–8.
- [18] Fery-Forgues S, Lavabre D. Are fluorescence quantum yields so tricky to Measure? A demonstration using familiar stationary products. *J Chem Educ* 1999;76:1260–4.
- [19] Sun H, Guo H, Wu W, Liu X, Zhao J. Coumarin phosphorescence observed with N^N Pt(II) bisacetylide complex and its applications for luminescent oxygen sensing and triplet-triplet-annihilation based upconversion. *Dalton Trans* 2011;40:7834–41.
- [20] Liu L, Huang D, Draper SM, Yi X, Wua W, Zhao J. Visible light-harvesting trans bis (alkylphosphine) platinum(II)-alkynyl complexes showing long-lived triplet excited states as triplet photosensitizers for triplet-triplet annihilation upconversion. *Dalton Trans* 2013;42:10694–706.
- [21] Wu W, Ji S, Wu W, Shao J, Guo H, James TD, Zhao J. Ruthenium(II)-Polyimine-Coumarin light-harvesting molecular arrays: design rationale and application for triplet-triplet-annihilation-based upconversion. *Chem Eur J* 2012;18:4953–64.
- [22] Areti S, Khedkar JK, Bandarua S, Teotia R, Bellare J, Rao Ch P. Coumarin-Imino-C2-Glucosyl conjugate as receptor for Cu (2⁺) in blood serum milieu, on silica gel sheet and in hep G2 cells and the characterization of the species of recognition. *Anal Chim Acta* 2015;873:80–7.
- [23] Senyilmaz D, Virtue S, Xu X, Tan CY, Griffin JL, Miller AK, Vidal-Puig A, Teleman AA. Regulation of mitochondrial morphology and function by stearoylation of TFR1. *Nature* 2015;525(7567):124–5.
- [24] Xochitiotzi-Flores E, Jiménez-Sánchez A, García-Ortega H, Sánchez-Puig N, Romero-Ávila M, Santillan R, Farfán N. Optical properties of two fluorene derived Bodipy molecular rotors as fluorescent ratiometric viscosity probes. *New J Chem* 2016;40:4500–12.
- [25] Le Bahers T, Adamo C, Ciofini I. A qualitative index of spatial extent in charge-transfer excitations. *J Chem Theor Comput* 2011;7(8):2498–506.
- [26] Adamo C, Jacquemin D. The calculations of excited-state properties with time-dependent density functional theory. *Chem Soc Rev* 2013;42(3):845–56.
- [27] Klymchenko AS. Solvatochromic and fluorogenic dyes as environment-sensitive probes: design and biological applications. *Acc Chem Res* 2017;50(2):366–75.
- [28] Grabowski ZR, Rotkiewicz K. Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures. *Chem Rev* 2003;103:3899–4032.
- [29] Kucharak OA, Didier P, Mély Y, Klymchenko AS. Fluorene analogues of prodan with superior fluorescence brightness and solvatochromism. *J Phys Chem Lett* 2010;1:616–20.
- [30] Qian H, Cousins ME, Horak EH, Wakefield A, Liptak MD, Aprahamian I. Suppression of Kasha's rule as a mechanism for fluorescent molecular rotors and aggregation-Induced emission. *Nat Chem* 2016;9:83–7.
- [31] Uzhinov BM, Ivanov VL, Melnikov MY. Molecular rotors as luminescence sensors of local viscosity and viscous flow in solutions and organized systems. *Russ Chem Rev* 2011;80(12):1179–90.