



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DISEÑO Y ESTUDIO DE LA FOTODINÁMICA DE CROMÓFOROS
BIFUNCIONALES CON EMISORES POLIMETÍNICOS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ANDRÉS ARROYO PIECK

Dr. JORGE PEÓN PERALTA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Jurado Asignado

Presidente: Dr. Carlos Amador Bedolla

Vocal: Dr. José Alfredo Vázquez Martínez

Vocal: Dr. Michel Grutter de la Mora

Vocal: Dr. Jorge Tiburcio Báez

Secretario: Dr. José Guadalupe López Cortés

Asesor

Dr. Jorge Peón Peralta

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Química.

Al CONACyT por la beca otorgada, número de becario: 273459. Y el Proyecto de Fronteras de la Ciencia 179.

Al Dr. Jorge Peón, por todo su apoyo, sus enseñanzas y su interés en mi formación académica.

A los integrantes de mi comité tutor, la Dra. Alicia Negrón y el Dr. Alfredo Vázquez, por todo su apoyo durante estos 4 años.

A los integrantes del jurado:

Dr. Carlos Amador Bedolla

Dr. José Alfredo Vázquez Martínez

Dr. Michel Grutter de la Mora

Dr. Jorge Tiburcio Báez

Dr. José Guadalupe López Cortés

por sus comentarios y correcciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la Dra. Daniela Araiza por su ayuda con los experimentos con células vivas.

Al departamento de Imagenología del Instituto de Fisiología, y en especial a la Dra. Ruth Rincón por su ayuda con los experimentos en el microscopio confocal.

A mis compañeros: César Guarín, Jesús Rodríguez, Vianey Salas, Luis Gutiérrez, Rafael López, Beatriz González, Mario González, Andrea Cadena, Denhy Hernández.

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Espectroscopia Láser ubicado en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Jorge Peón Peralta.

Los resultados de esta investigación se publicaron en:

- Arroyo-Pieck, A., Araiza-Olivera, D., Peón, J., *ChemPlusChem*, **2018**, 83

Y se han presentado como posters en:

- Simposios internos del Instituto de Química, UNAM, en el periodo del 2015 al 2018.
- The 13th Femtochemistry Conference, realizado en Cancún, México en 2017.

A mi familia.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción.....	4
2. Objetivos	10
2.1 General	10
2.2 Específicos	10
3. Fundamentos Teóricos.....	12
3.1 Procesos de Desactivación de Estados Excitados	12
3.2 Estados de Transferencia de Carga	14
3.3 Transferencia de Energía	18
3.5 Cinética de los Procesos de Desactivación de Estados Excitados	24
3.6 Espectroscopia con Resolución Temporal.....	26
3.7 Elección de los Cromóforos Utilizados.....	28
4. Metodología.....	30
4.1 Síntesis de BB, BN, BBIR y BNIR.....	30
4.2 Espectroscopia Estática.....	32
4.3 Espectroscopia Resuelta en Tiempo	33
4.4 Microscopía en Células Vivas.....	34
5. Resultados y Discusión	36
5.1 Espectroscopia Estática.....	36
5.2 Espectroscopia Resuelta en Tiempo	47
5.3 Simulación de la Dinámica de Estados Excitados	53
5.4 Microscopía en Células Vivas.....	60

6.1 Conclusiones.....	67
Referencias	69
Apéndice 1: Caracterización de las Moléculas.....	72
Apéndice 2: Datos Experimentales de los BODIPY Precursores BB y BN.....	76
Apéndice 3: Integración por Matrices de Ecuaciones Cinéticas.....	79
Apéndice 4: Datos Experimentales Utilizados en las Simulaciones.	82
Apéndice 5: Calibración de los Resultados del Microscopio Confocal.	83
Apéndice 6: Artículo Publicado.....	85

Resumen

Existe un gran interés en el desarrollo de moléculas fluorescentes sensibles a su ambiente local, principalmente para el estudio de medios biológicos vivos. La estabilidad en medios biológicos, la baja toxicidad, la longitud de onda de excitación y emisión y la sensibilidad son características importantes que se deben tener en cuenta en estas moléculas. Además, debido a la heterogeneidad de las muestras biológicas, se busca que los sensores puedan ser utilizados con técnicas independientes de la concentración de los mismos en las muestras, como la medición de la relación de intensidad de emisión de dos bandas de fluorescencia de una misma molécula. Estas variables dependen de la estructura de las moléculas y por lo tanto pueden ser moduladas.

En este trabajo se diseñó una nueva arquitectura molecular que resulta en el aumento de la sensibilidad de moléculas bicromofóricas a cambios en su ambiente local. Este aumento se debe a dos competencias cinéticas consecutivas entre los procesos fotofísicos que definen el rendimiento de fluorescencia de la molécula y procesos fotofísicos sensibles al medio. Además, estos sensores bicromofóricos presentan dos emisiones de fluorescencia en diferentes regiones del espectro, por lo que pueden ser utilizadas con la técnica de medición de relación de intensidad de emisión.

Para demostrar el concepto, se sintetizaron dos sensores, compuestos de un BODIPY y una cianina. La transferencia de energía del BODIPY a la cianina y la emisión de esta última compiten cinéticamente con la formación de estados de transferencia de carga, dando como resultado una doble dependencia del rendimiento de emisión de la cianina con polaridad del medio. La relación de intensidad emisión de la cianina (800 nm) y la del BODIPY (500 nm) es utilizada para obtener medidas independientes de la concentración de los sensores.

Las moléculas se estudiaron con técnicas de espectroscopia estática y resuelta en tiempo, cuyos resultados demuestran que las moléculas son sensibles a la polaridad del

medio, así como el aumento en la sensibilidad de estos sensores en comparación con los cromóforos que los componen. También, se demostró que pueden ser utilizadas con la técnica de medición de relación de intensidad de emisión, por lo que los resultados son independientes de la concentración de los sensores.

El análisis de los resultados experimentales llevó al planteamiento del esquema del funcionamiento de los sensores con base en los procesos fotofísicos involucrados en su funcionamiento y a los cambios producidos en éstos en respuesta al cambio en el ambiente local de los sensores.

Además, se llevaron a cabo estudios de microscopía en células vivas, en donde se demostró que los sensores pueden detectar cambios en la polaridad local en medios biológicos, tanto en diferentes estructuras celulares, como en cambios producidos por agentes externos.

Abstract

There is great interest in the development of fluorescent molecules that are sensitive to their local environment, especially for the study of live biological samples. Important properties for these sensors are their stability in biological samples, their low toxicity, their excitation and emission wavelengths and their sensitivity. Also, due to the heterogeneity of biological samples, these sensors must be able to be used in detection schemes that are independent of their concentration in the samples, such as the ratiometric measurements between two emission bands of the same molecule. All these variables depend on the structure of the sensors, so they can be modulated.

In this present work, a new molecular architecture was designed to enhance the sensitivity of bichromophoric molecules to changes in their local environment. The sensitivity enhancement is the consequence of two consecutive kinetic competitions

between the photophysical processes that define the fluorescence yield of the sensor and the photophysical processes sensitive to the environment. Also, these bichromophoric sensors have two emission bands in different regions of the visible spectrum, which can be used in ratiometric measurements.

To demonstrate this concept, two sensors were synthesized from a BODIPY and a cyanine dyes. Both the energy transfer from the BODIPY to the cyanine and the emission of the cyanine are in kinetic competition with the formation of charge transfer states, resulting in a double dependence of the fluorescence yield of the cyanine with the polarity of the medium. The ratio between the emission intensity of the cyanine (800 nm) and BODIPY (500 nm) moieties is used in ratiometric measurements, so the results are independent of the concentration of the sensors in the samples.

The molecules were analyzed with static and time-resolved spectroscopy, which demonstrated both the sensitivity of the molecules to the polarity of the medium, and the enhancement of their sensitivity compared with the parent chromophores. Also, the results show that the sensors can be used for ratiometric measurements.

The analysis of the experimental data led to the development of the scheme of their behavior based on the photophysical processes involved in their performance, and the changes produced in these processes in response to changes in the local environment of the sensors.

Also, the sensors were used in live cell imaging, and the results show that the sensors can be used to detect changes in the local polarity of biological samples, both in different cellular structures, as in changes produced by external agents.

1. Introducción

Las células son medios complejos muy heterogéneos, donde las condiciones locales varían de manera importante entre diferentes estructuras celulares y organelos. Esta complejidad es fundamental para la vida, ya que muchos procesos pueden darse sólo en ciertas regiones de las células debido a sus condiciones específicas. El efecto del ambiente local en las moléculas involucra varios parámetros, incluyendo el pH, la temperatura, la viscosidad y la polaridad.^[1]

La medición de estos parámetros a escala microscópica se ha logrado utilizando moléculas fluorescentes sensibles a cambios en su ambiente local y que permiten el estudio de células vivas.^[2] La resolución espacial y temporal de la microscopía de fluorescencia ha permitido el estudio de procesos bioquímicos en tiempo real,^[3] y la información obtenida ha sido vital para el entendimiento de la biología celular. Es por esto que existe un gran interés en el desarrollo de nuevos sensores específicos para organelos o ciertos procesos bioquímicos en células.^[4] Debido a la heterogeneidad de las células y la tinción de las mismas, en esta área de estudio es muy importante utilizar técnicas de medición que no dependan de la concentración de los sensores en la muestra. Este es un aspecto importante del diseño de nuevos sensores debido a que las características de los mismos determinan el tipo de técnicas en las que pueden ser utilizados.

Dos técnicas de medición cuyos resultados son independientes de la concentración de los sensores son la medición de tiempos de vida de fluorescencia^[5] y la medición de la relación de intensidad de emisión entre dos bandas de fluorescencia de una misma molécula.^[6] La primera técnica requiere tiempos de adquisición más largos y equipos e instrumentación más especializados, en contraste con la detección de relación de intensidad de emisión, la cual puede ser utilizada en cualquier equipo que mida la intensidad de fluorescencia y requiere tiempos de adquisición menores, por lo que suele ser mejor para monitorear procesos celulares rápidos.^[7]

Los sensores presentados en este trabajo son sensibles a la polaridad del medio en que se encuentran, la cual es importante en procesos físicos, químicos y biológicos. Las moléculas sensibles a la polaridad de su ambiente local han resultado útiles en la medición de cambios en membranas celulares^[8]; la medición de hidrofobicidad de la superficie de proteínas;^[9] el monitoreo de la autofagia lisosoma^[10] y la disfunción de estos organelos;^[11] la detección selectiva de proteínas;^[12] activación y funcionamiento de proteínas;^[1] y cambios en la polaridad mitocondrial entre células sanas y cancerosas.^[13]

El término de polaridad en un solvente se refiere a la capacidad de solvatación de solutos del mismo, la cual depende de todas las interacciones, específicas y no específicas, que existen entre el soluto y el solvente.^[14] Existen varias escalas para la medición de la polaridad, de entre las cuales se eligió utilizar la constante dieléctrica del solvente en este trabajo. Esta propiedad está involucrada en la disminución de las fuerzas coulómbicas entre cargas puntuales en el solvente por medio de la polarización del mismo, como sería el caso de moléculas que presentan cargas formales en su estructura, por lo que resulta apropiada para el caso de formación de estados de transferencia de carga.

Los sensores de polaridad utilizados suelen ser cromóforos que forman estados de transferencia de carga tras absorber luz.^[15] Este fenómeno se da por la transferencia fotoinducida de un electrón entre dos fragmentos de su estructura, un donador y un aceptor de electrones. Debido al gran momento dipolar que presentan estos estados, tanto su formación como su decaimiento son muy sensibles a la polaridad del medio en que se encuentran. La cinética de los estados de transferencia de carga, y su dependencia con los disolventes, se ha estudiado en muchos sistemas modelo,^[16] incluyendo BODIPY^{[17],[18]} y cianinas.^{[19],[20]}

La competencia cinética entre la formación de estados de transferencia de carga y la emisión de fluorescencia permite la medición de cambios en la polaridad del medio en función de cambios en la fluorescencia de los cromóforos, y es la razón de que este tipo de moléculas puedan utilizarse como sensores de polaridad. Además de afectar el rendimiento de emisión de fluorescencia, cualquier otro proceso fotofísico que compita con la formación de los estados de transferencia de carga también presentará una

dependencia con la polaridad del medio, lo cual es central en el funcionamiento de los sensores sintetizados en este trabajo.

Aunque existe una gran cantidad de moléculas que forman estados de transferencia de carga, su uso en medios biológicos requiere que los sensores tengan otras propiedades importantes. Entre éstas está la estabilidad de las moléculas, tanto al medio como a la irradiación con luz, su baja toxicidad, la capacidad de atravesar la membrana celular, su alta sensibilidad a cambios en el medio y que puedan ser utilizados con técnicas que no dependan de la concentración. Todas estas propiedades dependen de la estructura de las moléculas y deben tomarse en cuenta en el diseño de nuevos sensores.

En este trabajo se diseñó un nuevo tipo de sensor de polaridad para su uso en medios biológicos, cuya principal característica es la amplificación de la sensibilidad de los sensores como se explica a continuación. Las moléculas planteadas se encuentran formadas por dos cromóforos que absorben y emiten luz en diferentes regiones del espectro visible, y se encuentran acopladas por transferencia resonante de energía.

En la Figura 1.1 se puede observar el esquema de su funcionamiento: cuando el cromóforo que absorbe a menor longitud de onda es excitado selectivamente, éste puede relajarse por tres caminos: emisión de fluorescencia, transferencia de energía al otro cromóforo y la formación de estados de transferencia de carga. Los cambios en la polaridad del medio afectan la cinética de este último proceso, y por tanto también afecta a los dos procesos que compiten cinéticamente con él. Aquellas moléculas donde se haya dado la transferencia de energía al segundo cromóforo pueden emitir o formar otro estado de transferencia de carga en este fragmento. Esta segunda competencia también depende de la polaridad del medio y afecta el rendimiento de emisión del segundo cromóforo. La doble dependencia de la emisión con la polaridad le da una mayor sensibilidad a la molécula a cambios en la polaridad.

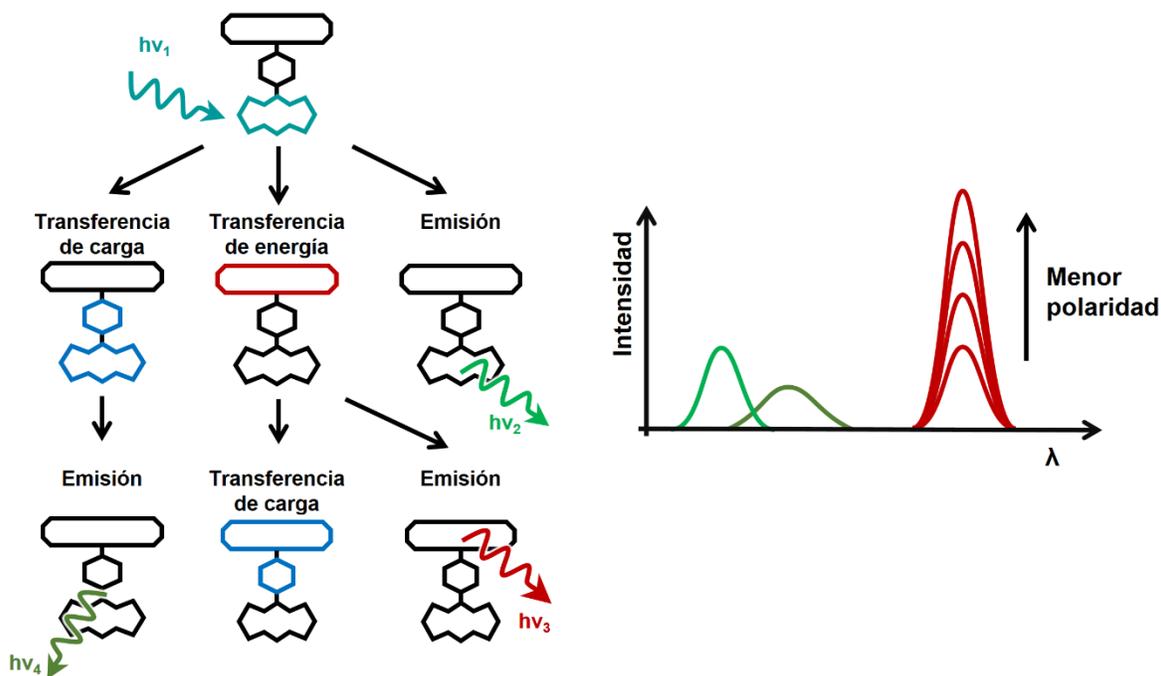


Figura 1.1. Esquema simplificado de la dinámica del estado excitado de los sensores bicromofóricos desarrollados en este trabajo. La emisión verde claro corresponde a la emisión del estado excitado del primer cromóforo, la verde oscura a la emisión del estado de transferencia de carga del primer cromóforo y la roja a la emisión del segundo cromóforo, que es sensible a la polaridad.

Para demostrar el funcionamiento del diseño propuesto, se sintetizaron las dos moléculas prototipo mostradas en la Figura 1.2. La cianina IR780 es comercial y se eligió por sus propiedades ópticas y porque puede ser funcionalizada fácilmente. Los BODIPY se eligieron porque su espectro de absorción presenta un máximo en la región donde la cianina no absorbe, de tal forma que puede ser excitado selectivamente con luz. El acoplamiento por medio de un enlace éter permite que ambos cromóforos se comporten como si fueran moléculas independientes. Ambos cromóforos pueden formar estados de transferencia de carga, una propiedad esencial en el diseño, en donde el fragmento aromático del puente que los une funciona como un donador de electrones.

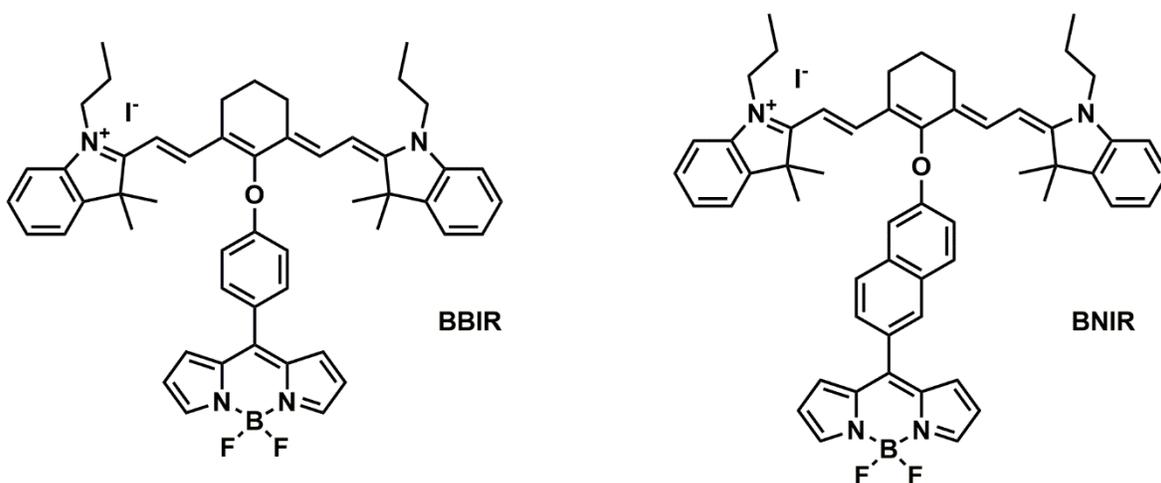


Figura 1.2. Sensores bicromofóricos sintetizados en este trabajo, BBIR (izq.) y BNIR (der.)

La caracterización de estas moléculas se llevó a cabo en disolventes puros para poder demostrar que funcionan como sensores de polaridad, y que presentan las características centrales del diseño: una doble fluorescencia para la medición de la relación de intensidad de emisión, dando como resultado mediciones independientes de la concentración, y un aumento en la sensibilidad debido a la doble competencia cinética entre la formación de estados de transferencia de carga en los cromóforos y la transferencia de energía y emisión de los mismos. Estos datos experimentales fueron utilizados para plantear un modelo de la dinámica del estado excitado de los sensores que permite el análisis a fondo del comportamiento de los sensores en función de cambios en los procesos fotofísicos que se llevan a cabo en las moléculas tras la absorción de luz.

Una vez comprobado el funcionamiento de los sensores, se llevaron a cabo experimentos en células de adenocarcinoma de pulmón humano (SK-LU-1) para demostrar que estos cromóforos pueden teñir este tipo de muestras y ser utilizados en microscopía para el análisis de cambios en la polaridad local en diferentes regiones de las células. Además, se comprobó la capacidad de los cromóforos para reportar cambios entre células sanas y células tratadas con agentes externos que afecten su metabolismo o morfología.

Como se mencionó anteriormente, existe una gran cantidad de moléculas utilizadas como sensores de polaridad,^[1] las cuales presentan diferentes aplicaciones y beneficios. Existen dos áreas principales en donde las moléculas sintetizadas en este trabajo presentan una mejoría comparadas con los sensores presentados previamente. En primer lugar, el uso de estas moléculas como sensores de polaridad se basa principalmente en la medición de rendimientos de fluorescencia y el desplazamiento de los máximos de emisión en diferentes solventes, los cuales resulta difícil medir en células vivas con microscopía, por lo que las mediciones en estos casos requieren de comparar diferentes cultivos de células marcadas.^[8, 10] En comparación, la medición de la intensidad de relación entre dos bandas de emisión permite asegurarse de que las mediciones sean independientes de la concentración de los sensores, así como de la degradación de los mismos en el medio por la luz utilizada en las mediciones.

En segundo lugar, los sensores de polaridad utilizados hasta ahora se basan en la dependencia de una sola molécula en los cambios de polaridad en su medio. En las moléculas BBIR y BNIR, los cambios en la emisión del fragmento BODIPY en función de la polaridad son amplificados por los cambios presentados por el fragmento cianina, dando como resultado una mayor sensibilidad a cambios en el medio. Además, esto da la oportunidad de alterar la estructura de ambos fragmentos para la modulación del funcionamiento de estos sensores.

2. Objetivos

2.1 General

Diseñar y sintetizar moléculas bicromofóricas sensibles a la polaridad para su aplicación en medios biológicos, y demostrar que presentan una mayor sensibilidad a cambios en su ambiente local debido a la doble competencia cinética consecutiva entre la formación de estados de transferencia de carga con la transferencia de energía y la emisión de los cromóforos que componen a los sensores.

2.2 Específicos

- Sintetizar moléculas bicromofóricas a partir de un BODIPY y una cianina que estén basadas en el diseño molecular planteado, Figura 1.1.
- Analizar la emisión de las moléculas utilizando técnicas de espectroscopia estática y resuelta en tiempo, para demostrar su uso como sensores de polaridad, así como la presencia de una doble emisión cuya relación de intensidad de emisión pueda ser utilizada para la medición de la respuesta de los sensores.
- Demostrar que la doble competencia cinética consecutiva entre la formación de estados de transferencia de carga y la transferencia de carga y emisión de los cromóforos que componen a los sensores permite aumentar la sensibilidad de los mismos a cambios en su ambiente.

- Plantear el esquema de la dinámica del estado excitado de las moléculas y simular su comportamiento a partir de los resultados experimentales obtenidos, para entender el funcionamiento de los sensores y que puedan ser utilizados como herramientas en el diseño de otros sensores.
- Demostrar que los sensores pueden ser utilizados en células vivas para identificar cambios en la polaridad local de diferentes componentes celulares, así como cambios producidos por agentes externos.

3. Fundamentos Teóricos

En esta sección se abordan de manera breve los principales temas relacionados con el desarrollo del proyecto y el análisis de los resultados obtenidos.

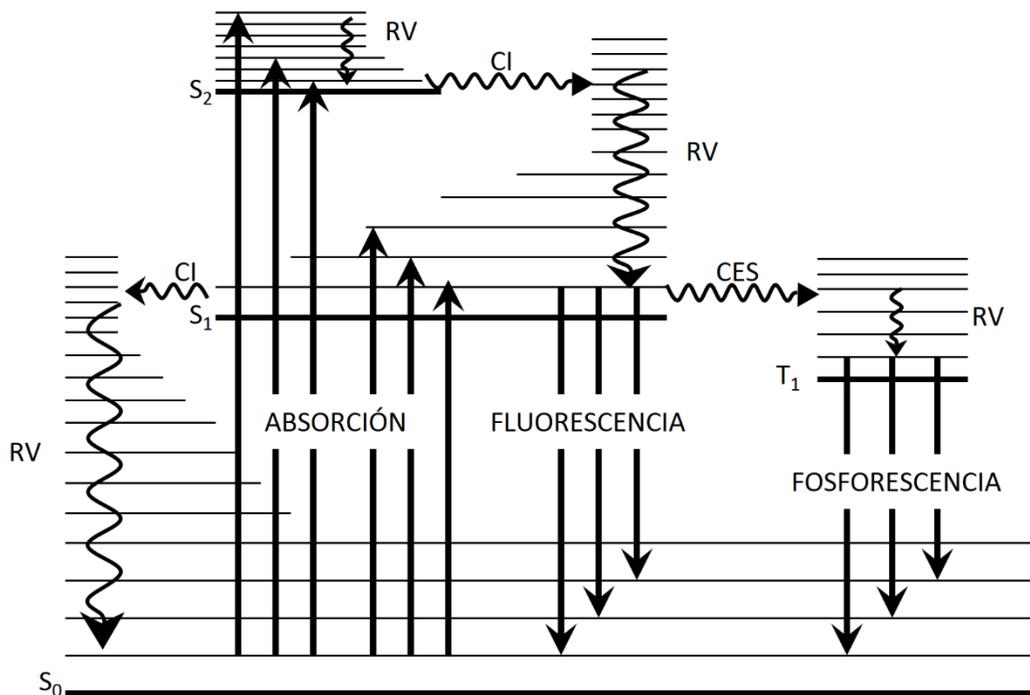
Se exponen los conceptos necesarios para comprender los procesos de desactivación de las moléculas excitadas, siendo de principal importancia en este estudio la transferencia de carga y la transferencia de energía. Se incluye también un apartado acerca de la cinética de estos procesos para comprender mejor la competencia entre los mismos y su influencia en las propiedades de los sensores. Así mismo, se describen aspectos relacionados con la técnica de espectroscopia con resolución temporal utilizada en este estudio para analizar la cinética de los procesos estudiados, sobre todo acerca del funcionamiento de los arreglos ópticos y los equipos utilizados, la obtención de los datos experimentales en ambas técnicas y su proceso de análisis.

Además se presentan las moléculas elegidas para sintetizar el cromóforo modelo utilizado en este estudio, así como las razones para su elección.

3.1 Procesos de Desactivación de Estados Excitados^[21-24]

Cuando las moléculas son irradiadas con luz, existe la posibilidad de que éstas absorban fotones cuya energía corresponde a la diferencia de energía entre el estado basal de la molécula y uno de sus estados excitados. Estos estados de mayor energía tienden a regresar al estado basal, disipando la energía absorbida a través de diversos canales fotofísicos y fotoquímicos.

Todos los canales de desactivación de un estado excitado compiten cinéticamente entre sí. La probabilidad de que la molécula regrese al estado basal a través de uno de estos canales depende de la velocidad a la que ocurre cada uno de ellos, como se verá a fondo más adelante. Una forma muy útil de representar gráficamente estos procesos es utilizando diagramas de Jablonski.



Constantes de Velocidad Características:

Absorción $10^{15} s^{-1}$

Relajación Vibracional (RV) $10^{12} - 10^{10} s^{-1}$

Conversión Interna (CI) $10^{11} - 10^9 s^{-1}$

Cruce entre sistemas (CES) $10^{10} - 10^8 s^{-1}$

Fluorescencia $10^{10} - 10^7 s^{-1}$

Fosforescencia $10^6 - 1 s^{-1}$

Figura 3.1. Diagrama de Jablonski con los principales procesos fotofísicos.

En estos diagramas las líneas horizontales gruesas representan estados electrónicos y las líneas delgadas estados vibracionales. Los estados singuletes se etiquetan como S_n, donde n = 0 es el estado basal y n > 0 son los excitados. Los estados tripletes se representan como T_n, con n ≥ 1.

Los procesos fotofísicos, es decir, aquellos en los que no hay reacciones químicas, se dividen en radiativos y no radiativos. Las transiciones radiativas ocurren con la absorción o emisión de un fotón y suelen representarse con flechas rectas. Las transiciones no radiativas se representan con flechas onduladas y no involucran la interacción con luz.

Entre estos procesos, es de especial importancia la fluorescencia. Ésta es una transición radiativa entre estados electrónicos con la misma multiplicidad de espín. Debido a que la conversión interna entre los singuletes excitados superiores y el primer singulete excitado es muy rápida, esta transición se da (con muy pocas excepciones) a partir de este último, lo que se conoce como la regla de Kasha. Debido a esto, las moléculas suelen presentar sólo una banda de emisión, sin importar la longitud de onda de excitación utilizada. La importancia de este proceso radica en que la detección de la intensidad de emisión de las moléculas en función del tiempo nos permite adquirir información acerca de los procesos involucrados en la desactivación de las moléculas.

Además de los mostrados en la Figura 3.1, existen otros procesos de desactivación de estados excitados. De especial importancia en el presente estudio son la transferencia de carga y la transferencia de energía, centrales en el funcionamiento de las moléculas como sensores de polaridad y el aumento en la sensibilidad del diseño molecular planteado. A continuación, se tratan más a fondo estos dos procesos.

3.2 Estados de Transferencia de Carga^[22-23]

La formación y desactivación de los estados de transferencia de carga son procesos muy sensibles a la polaridad del medio en que se encuentran, por lo que son muy útiles como sensores de esta propiedad. Este proceso se puede dar entre moléculas diferentes, o en distintos fragmentos de una misma molécula, como sucede en los sensores sintetizados en este trabajo.

Una molécula que se encuentra en un estado excitado puede ser un mejor oxidante o reductor que cuando se encuentra en el estado basal. Cuando se da una transición del orbital más alto ocupado (HOMO) al orbital más bajo desocupado (LUMO), es posible que el orbital HOMO pueda aceptar un electrón o el LUMO pueda donar el suyo. Este proceso se conoce como transferencia de electrón fotoinducida.

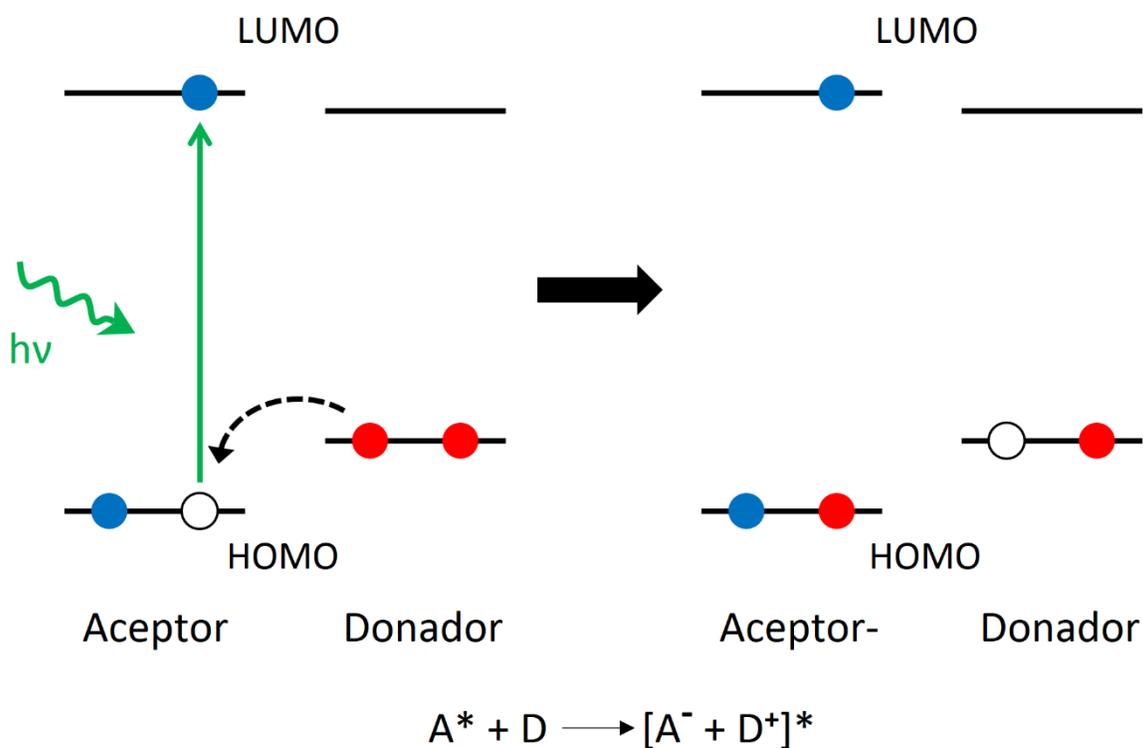


Figura 3.2. Esquema de la transferencia de electrón fotoinducida donde la molécula excitada es el aceptor.

El resultado de este proceso es la formación de un par de radicales iónicos, donde el donador queda con una carga positiva y el aceptor con una negativa. Debido a esto, los estados de transferencia de carga presentan momentos dipolares elevados, lo que explica su sensibilidad a la polaridad del medio.

El efecto de la polaridad del disolvente en este proceso se debe principalmente a la estabilización del estado de transferencia de carga con respecto a estados con momentos dipolares menores. Entre mayor es la polaridad del disolvente, menor es la energía del estado de transferencia de carga con respecto al estado excitado del que se forma, por lo

que aumenta la velocidad y eficiencia de la formación del mismo. Esto puede notarse fácilmente en moléculas donde el estado de transferencia de carga es emisivo, en donde se aprecia un corrimiento a longitudes de onda más largas de la emisión de este estado en disolventes más polares. Este efecto se puede apreciar en la emisión de las moléculas BBIR y BNIR, en la sección 5.1.

La capacidad del donador para ceder sus electrones determina la velocidad de este proceso y puede ser modulada con cambios estructurales. Por ejemplo, la presencia de grupos funcionales con pares libres de electrones como las aminas, o grupos electrodonadores, favorecen que el donador ceda sus electrones. Para el caso de los aceptores, el proceso de formación de estados de transferencia de carga se favorece por la presencia de grupos electroattractores. Dependiendo de la naturaleza del donador y el aceptor, el comportamiento de las moléculas en función del disolvente variará. Para el caso de un donador y aceptor buenos, es posible que la formación de transferencia de carga se encuentre muy favorecida incluso en disolventes no polares, mientras que en el caso contrario es posible que la formación de estados de transferencia de carga se dé sólo en los disolventes más polares. Para el caso de que la transferencia de carga (sea inter o intramolecular) sea la base de sensores moleculares del ambiente, el mejor caso es cuando la variación de la velocidad del proceso de transferencia de carga se dé de forma sistemática a lo largo de una serie de disolventes.

Los sensores moleculares presentados en este trabajo forman estados de transferencia de carga intramoleculares, en donde la distancia entre el donador y el aceptor se mantiene fija, a la vez de que no existe conjugación extendida entre los fragmentos (por lo que se consideran como cromóforos independientes). Debido a esto, no hay una dependencia de la formación de estos estados con la concentración de las moléculas. Además, la energía del estado de transferencia de carga no puede disminuir por la separación del par iónico, por lo que los cambios en la energía de este estado se deben únicamente a la solvatación, cuando el disolvente se rearregla alrededor de la molécula durante y después de la transferencia de carga.

Es importante mencionar que en los BODIPY y en otras moléculas es posible que el estado localmente excitado y un estado de transferencia de carga se encuentren en equilibrio a temperatura ambiente por repoblación térmica.^[25] Debido a este equilibrio, la emisión del estado localmente excitado presenta un decaimiento biexponencial.^[26] En este caso, uno de los tiempos está relacionado con la formación del equilibrio en la población de estado localmente excitado y el de transferencia de carga, mientras que el segundo depende de la velocidad de decaimiento de ambos estados. Este fenómeno se tomó en cuenta en el análisis del comportamiento de las moléculas sintetizadas, y el planteamiento del esquema de su funcionamiento.

La transferencia de carga en los sensores presentados en este trabajo es una reacción de esfera externa, es decir, no involucra la formación o rompimiento de enlaces en el donador o el aceptor. Este tipo de reacciones fueron estudiadas por Rudolph Marcus y se diferencian de otras reacciones por dos factores principales. Primero, la formación de las cargas, el electrón es transferido en un solo paso del donador al aceptor, por lo que las coordenadas nucleares del sistema no cambian mientras el electrón “salta” del donador al aceptor. Debido a esto, la coordenada de reacción en la transferencia de carga no se debe a cambios en la geometría del donador o el aceptor, sino en las moléculas del disolvente alrededor de éstas. A esto se suma que el rearrreglo de cargas afecta de manera importante al solvente, debido a que las moléculas de disolvente se orientan en dirección al campo eléctrico producido por las mismas, dando como resultado que la polarización de las moléculas del disolvente determine la energía de activación de la reacción y su cinética.

La energía de activación en la transferencia de carga proviene de la energía térmica del disolvente y las fluctuaciones térmicas de las moléculas del mismo, que pueden resultar en una configuración del solvente donde la polarización del mismo permite el salto del electrón del donador al aceptor. Debido a esto, la naturaleza del disolvente es un factor determinante en la cinética de estas reacciones, lo que permite la medición de la polaridad del disolvente por cambios en la cinética de la transferencia de carga.

3.3 Transferencia de Energía^[22-24, 27-28]

Este proceso fotofísico es central en el diseño molecular de los sensores bicromofóricos presentados en este trabajo. Los dos cromóforos que componen a los sensores se encuentran acoplados por este proceso, lo que resulta en la emisión de fluorescencia de ambos fragmentos cuando el BODIPY es excitado selectivamente. Esto se aprovecha para la medición de la relación de intensidad de emisión de ambos cromóforos, la cual es independiente de la concentración de los mismos. Además, la competencia cinética de este proceso y la formación de estados de transferencia de carga del BODIPY es esencial para el aumento de la sensibilidad de los sensores diseñados.

La transferencia de energía es una transferencia de excitación electrónica hacia una molécula aceptora A, a partir de la energía obtenida por la desactivación de una molécula excitada donadora D*.

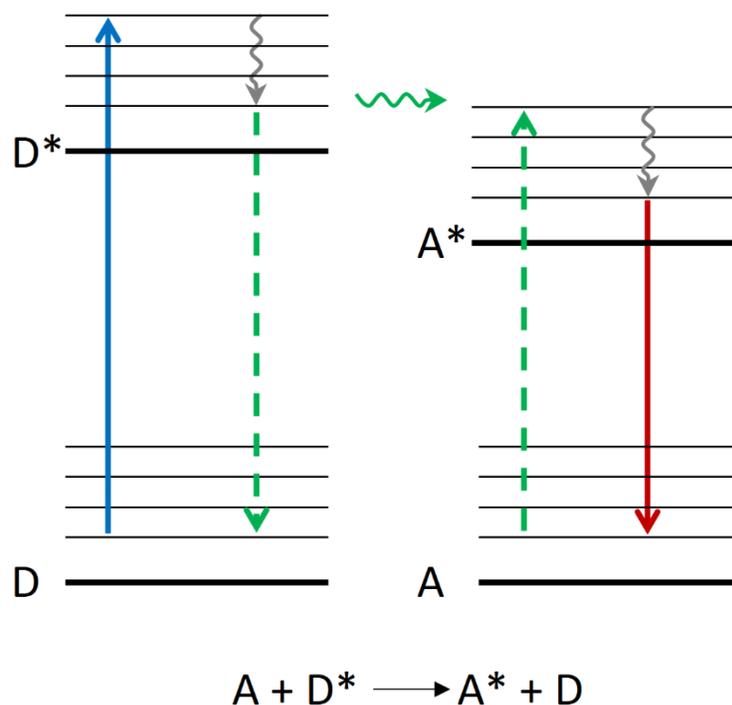


Fig. 3.3. Esquema de la transferencia de energía (EET) entre dos moléculas.

Esta transferencia también puede suceder entre dos fragmentos de una misma molécula cuando los enlaces entre ellos no permiten que se extienda la conjugación y se comporten ópticamente como dos cromóforos independientes, como el caso de los sensores presentados en este trabajo.

La transferencia de energía puede ser radiativa o no radiativa. En el caso radiativo, denominado trivial, el donador emite un fotón que es absorbido por el aceptor. La eficiencia del proceso depende de la concentración del donador y el aceptor, el rendimiento cuántico de fluorescencia del donador y el solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor.

El caso no radiativo, que es el que se lleva a cabo en los sensores sintetizados, requiere que exista interacción entre el donador y el aceptor. Esta interacción puede ser coulombica (desarrollada por Förster), o de intercambio (desarrollada por Dexter).

En el proceso de transferencia de energía entre dos cromóforos, el estado inicial del par donador-aceptor ($D^* + A$) y su estado final ($D + A^*$) pueden ser descritos de manera aproximada tomando en cuenta sólo las funciones de onda $\Psi(n)$ de los electrones involucrados en las transiciones de ambos cromóforos, marcados con las etiquetas (1) y (2).

$$\Psi_i = \frac{1}{\sqrt{2}} [\Psi_{D^*}(1)\Psi_A(2) - \Psi_{D^*}(2)\Psi_A(1)] \quad (3.3)$$

$$\Psi_f = \frac{1}{\sqrt{2}} [\Psi_D(1)\Psi_{A^*}(2) - \Psi_D(2)\Psi_{A^*}(1)] \quad (3.4)$$

El segundo término entre los corchetes garantiza que las funciones de onda sean antisimétricas al intercambio de los electrones que participan en el proceso de transferencia de energía.

El acoplamiento entre el estado inicial y el final del sistema está descrito por el elemento matricial de interacción:

$$\langle \Psi_f | \hat{V} | \Psi_i \rangle = V_C + V_{in} \quad (3.5)$$

$$\hat{V} = \frac{e^2}{\epsilon r_{12}} \quad (3.6)$$

en donde \hat{V} es la perturbación del hamiltoniano total, r_{12} es la distancia entre los dos electrones involucrados en el proceso y ϵ es la constante dieléctrica del medio. El primer término en la ecuación 3.5 corresponde a la interacción Coulómbica (V_C), mientras que el segundo término corresponde a la interacción de intercambio (V_{in}).

$$V_C = \frac{1}{\sqrt{2}} \langle \Psi_{D^*}(1) \Psi_A(2) | \hat{V} | \Psi_D(1) \Psi_{A^*}(2) \rangle \quad (3.7)$$

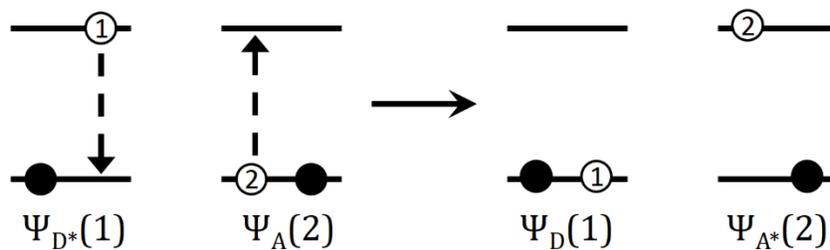


Fig. 3.4. Esquema de la transferencia de energía por el mecanismo Coulómbico.

$$V_{in} = -\frac{1}{\sqrt{2}} \langle \Psi_{D^*}(1) \Psi_A(2) | \hat{V} | \Psi_D(2) \Psi_{A^*}(1) \rangle \quad (3.8)$$

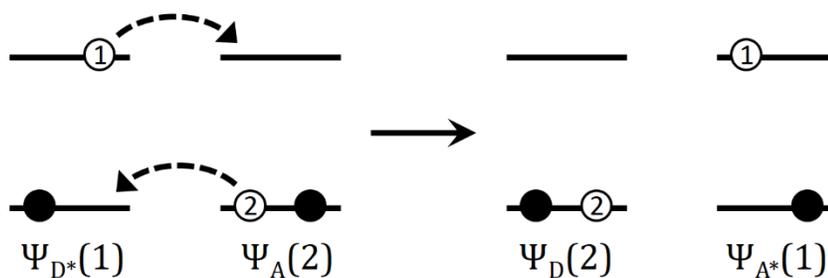


Fig. 3.5. Esquema de la transferencia de energía por el mecanismo de intercambio.

Existen casos en los que uno de los dos términos domina el comportamiento del sistema. Por ejemplo, en el caso de transiciones de momento dipolar prohibidas la interacción Coulómbica es despreciable, y por lo tanto se puede considerar sólo la interacción de intercambio. El caso contrario se da cuando la interacción entre los orbitales del donador y el aceptor se pierde debido a la distancia entre los dos cromóforos. Se considera que cuando la distancia es mayor a 10 nm, la contribución del término de intercambio es despreciable, y puede considerarse solamente la interacción Coulómbica.

En el caso de las moléculas sintetizadas en este trabajo, no se puede despreciar ninguno de los dos términos, y por tanto no se puede aplicar directamente las ecuaciones desarrolladas por Förster o Dexter. Sin embargo, es importante conocer estas ecuaciones para entender los factores del diseño de los cromóforos que pueden afectar el proceso de transferencia de energía, y por tanto, el funcionamiento de los sensores.

Förster derivó una ecuación para la constante de velocidad de la transferencia de energía cuando se puede considerar solamente al término Coulómbico:

$$k_c = \frac{9000 \ln 10 \Gamma^2 \Phi_D}{128 \pi^5 n^4 N_A \tau_D R^6} J_c \quad (3.10)$$

donde n es el índice de refracción del medio, Φ_D el rendimiento cuántico de fluorescencia del donador, τ_D el tiempo de vida de D^* , Γ es un parámetro que depende de la orientación relativa de los momentos de transición del donador y el aceptor, N_A el número de Avogadro, R es la distancia entre los cromóforos y J_c es la integral de solapamiento entre el espectro de fluorescencia normalizado del donador $\overline{F}_D(\bar{\nu})$ y el espectro de absorción del aceptor expresado en coeficientes de extinción:

$$J_c = \int_0^\infty \frac{\overline{F}_D(\bar{\nu}) \epsilon_A(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\bar{\nu}^4} \quad (3.11)$$

Para el caso en donde sólo es importante el término de intercambio, Dexter desarrolló una expresión para el cálculo de la constante de velocidad del proceso de transferencia de energía:

$$k_{in} = \left(\frac{2\pi}{\hbar} \right) K J_{in} \exp\left(-\frac{2R}{L}\right) \quad (3.14)$$

donde R es la distancia entre donador y aceptor, L es una constante relacionada con el promedio de los radios de los orbitales moleculares del estado inicial y final del sistema donador-aceptor, K es un parámetro relacionado con la interacción de los orbitales del donador y el aceptor y no puede obtenerse de medidas espectroscópicas, J_{in} es la integral de solapamiento entre el espectro de emisión normalizado del donador $\overline{F}_D(\bar{\nu})$ y el espectro de absorción normalizado del aceptor $\epsilon_A(\bar{\nu})$, definido como:

$$J_{in} = \int_0^{\infty} \overline{F_D}(\bar{\nu}) \epsilon_A(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad (3.15)$$

Como puede observarse en ambas ecuaciones, tanto la distancia entre los cromóforos como el solapamiento del espectro de emisión del donador y el de absorción del aceptor afectan la velocidad del proceso de transferencia de energía. Estos factores son importantes porque pueden ser relacionados con la estructura de la molécula y deben tomarse en cuenta en el diseño.

En particular, debido a la corta distancia entre los cromóforos que componen los sensores presentados en este trabajo, se espera que la velocidad de la transferencia de energía sea del orden de decenas de femtosegundos, como se ha visto en otras moléculas desarrolladas en nuestro grupo de trabajo.^[29] Esto es indeseable en el diseño actual, ya que se busca que la velocidad de los procesos de transferencia de carga y de energía en el BODIPY sea de la misma magnitud. Si uno de los dos procesos es significativamente mayor que el otro, los cambios producidos en la velocidad del proceso de transferencia de carga afectarán mínimamente al rendimiento de la transferencia de energía, y por tanto la amplificación de la sensibilidad de las moléculas por la competencia cinética entre estos dos procesos será muy pequeña.

Debido a que el aumentar el tamaño de la molécula para que la separación entre los cromóforos disminuya la velocidad de la transferencia de carga es indeseable, se buscó que la integral de solapamiento del espectro de emisión del donador y el de absorción del aceptor fuera mínima, y por tanto la velocidad de la transferencia de energía fuera menor a la observada en las otras moléculas sintetizadas en nuestro grupo.

Esto nos lleva a considerar que la modulación de este parámetro a través de cambios en la estructura de los cromóforos es una variable que puede servir en la optimización de estos sensores. Para esto, es importante entender dinámica de los estados excitados de las moléculas y la competencia cinéticas entre los procesos fotofísicos involucrados.

3.5 Cinética de los Procesos de Desactivación de Estados Excitados^[22, 30]

La competencia cinética es un tema central para el funcionamiento de los sensores desarrollados en este trabajo. La competencia entre la transferencia de energía (BODIPY a cianina) o la emisión de fluorescencia con la formación de estados de transferencia de carga es lo que permite la detección de cambios en el ambiente local de las moléculas, y por tanto permite su uso como sensores. Además, el aumento en la sensibilidad de los sensores diseñados se basa en la dependencia del rendimiento de la transferencia de energía por su competencia con otro canal de formación de estados de transferencia de carga. Es por esto que se revisan brevemente los conceptos centrales de la cinética de procesos de desactivación de los estados excitados.

Como se mencionó anteriormente, una molécula que se encuentra en un estado electrónico excitado tiende a regresar a su estado basal a través de diversos canales fotofísicos. La velocidad a la que una molécula excitada A^* regresa a su estado basal se expresa por medio de la ecuación 3.16, la cual considera la posibilidad de que existan múltiples canales de desactivación:

$$-\frac{d[A^*]}{dt} = (k_1 + k_2 + \dots + k_n)[A^*] \quad (3.16)$$

donde $[A^*]$ es la concentración de moléculas en el estado excitado y k_i son las constantes de velocidad de los procesos por los que se desactiva la molécula. Integrando la ecuación anterior, podemos conocer la concentración de moléculas en el estado excitado a cualquier tiempo:

$$[A^*] = [A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) \quad (3.17)$$

donde $[A^*]_0$ es la concentración de moléculas en el estado excitado a tiempo cero y τ_T es el tiempo de vida del estado excitado, definido como:

$$\tau_T = \frac{1}{(k_1 + k_2 + \dots + k_n)} \quad (3.18)$$

Cuando hay más de un proceso de desactivación de un estado excitado, estos compiten cinéticamente y la eficiencia de cada uno de ellos está dada por:

$$\Phi_i = \frac{k_i}{(k_1 + k_2 + \dots + k_n)} \quad (3.19)$$

Es importante mencionar que no todos los procesos de desactivación se encuentran presentes en todas las moléculas y que diferentes estados excitados de una misma molécula pueden presentar distintos canales de desactivación.

Los procesos radiativos, como la fluorescencia, son de especial importancia ya que nos permiten obtener información acerca de la cinética de los procesos de desactivación de una molécula. La intensidad de la fluorescencia I_F a un tiempo t de una población de moléculas excitadas es proporcional a la concentración instantánea de moléculas excitadas $[A^*]$ al tiempo t , donde el factor de proporcionalidad es la constante de velocidad radiativa k_F :

$$I_F(t) = k_F[A^*] = k_F[A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) \quad (3.19)$$

Midiendo la intensidad de fluorescencia de una muestra a diferentes tiempos después de la excitación es posible obtener el tiempo de decaimiento del estado excitado de las moléculas. Al conjunto de técnicas para la medición de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo se le conoce como espectroscopia resuelta en tiempo. Los resultados obtenidos con estas técnicas nos permiten entender la cinética de desactivación de las moléculas excitadas.

3.6 Espectroscopia con Resolución Temporal^[23, 31]

Para poder analizar la dinámica de los procesos de emisión, transferencia de energía y transferencia de carga, requerimos de técnicas espectroscópicas con resolución temporal de femto y picosegundos, escalas temporales en la que suceden dichos procesos. En el presente estudio se utilizó la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados en tiempo (TCSPC por sus siglas en inglés) para el estudio de las moléculas BBIR y BNIR.

La técnica de TCSPC permite la medición de tiempos de vida de estados excitados desde decenas de picosegundos hasta milisegundos. En ésta, la muestra es excitada utilizando un láser pulsado y se mide el tiempo transcurrido entre este pulso y la detección de un fotón. Esta información se guarda en un histograma donde el eje Y representa el número de fotones detectados con esa diferencia de tiempo y el eje X representa la diferencia de tiempo entre la excitación y la detección, el cual se encuentra dividido en intervalos de tiempo que van de un tiempo t_k a $t_k + \Delta t$, donde Δt es el ancho del canal de medición.

Las condiciones se ajustan para que sólo uno de cada cien fotones emitidos por la muestra sea detectado, debido a que sólo se puede medir el primer fotón que llega al detector. Si se aumenta el número de fotones detectados existe una acumulación preferencial en tiempos tempranos, y se miden tiempos más cortos que los reales.

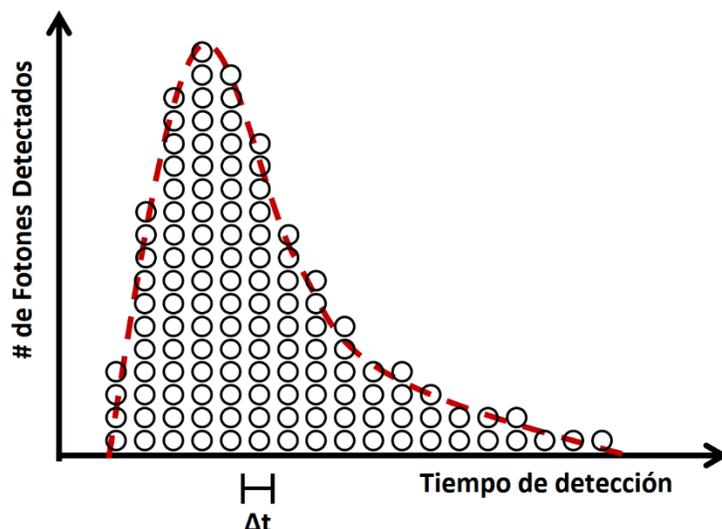


Figura 3.6. Esquema de un histograma obtenido de la técnica de TCSPC, y la función a la que se aproxima.

El histograma obtenido es la convolución del decaimiento de la intensidad de la fluorescencia y la función de respuesta del equipo. Esta función de respuesta se puede obtener al medir un cromóforo cuyo tiempo de vida sea menor a la duración del pulso de excitación del haz pulsado por un factor de 10.

Una vez que se tiene la función de respuesta y el histograma obtenido para el decaimiento de fluorescencia de la muestra, se ajusta una función exponencial por el método de reconvolución, para obtener los valores de tiempo de vida de fluorescencia de la molécula medida. Estos valores son útiles para la caracterización de moléculas y en el análisis de dinámica de su estado excitado, que en nuestro caso, permitió plantear el esquema del funcionamiento de estos sensores.

3.7 Elección de los Cromóforos Utilizados

Las moléculas BBIR y BNIR analizadas en este trabajo fueron sintetizadas a partir de una cianina y un BODIPY, unidos por un enlace éter y un anillo aromático. El propósito de utilizar diferentes fragmentos aromáticos utilizados en ambas moléculas (fenilo para BBIR y naftilo para BNIR) es el análisis del efecto de cambiar el donador de electrones con el que ambos cromóforos forman estados de transferencia de carga, y por extensión, su efecto en la sensibilidad de ambas moléculas.

La cianina IR 780 se escogió por sus propiedades ópticas y porque puede ser funcionalizada fácilmente en la posición meso. Los BODIPY se escogieron porque sus bandas de absorción se encuentran en un mínimo del espectro de absorción de la cianina IR780. Esto permite que puedan ser excitados de manera selectiva. Además, presentan un alcohol aromático que puede ser utilizado para acoplarse con la cianina por medio de un enlace éter, de tal forma que ambos fragmentos se comporten como cromóforos independientes.

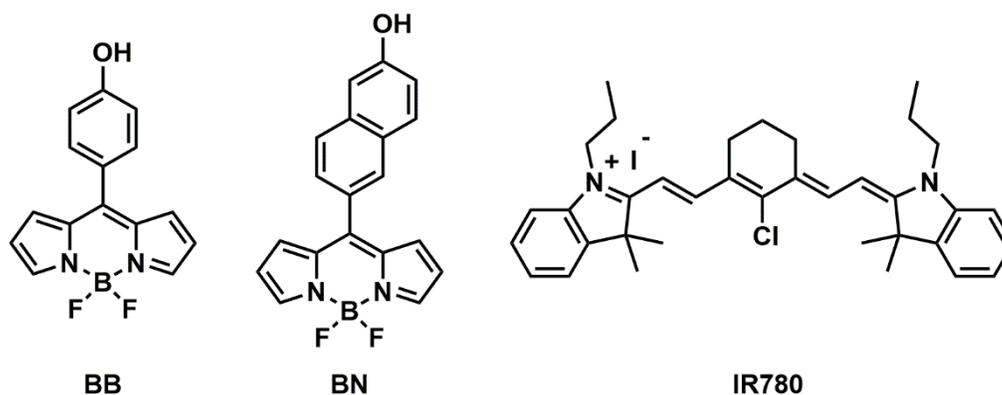


Figura 3.7. Estructura de los BODIPY BB y BN, y la cianina IR780.

Una característica esencial de los cromóforos precursores es que deben ser capaces de formar estados de transferencia de carga, lo cual se ha demostrado con análogos de los cromóforos elegidos.^{[18],[32]}

A esto se suma que ambos tipos de cromóforos han sido utilizados previamente en microscopía. La cianina IR780 ha sido utilizada ampliamente como un sensor fluorescente que emite en el infrarrojo debido a su baja toxicidad y su fácil absorción en células y tejidos.^{[33],[34]} Es importante mencionar que las cianinas y los BODIPY insolubles en agua tienden a acumularse en las membranas de la célula y la mitocondria.^{[8],[33]}

4. Metodología

4.1 Síntesis de BB, BN, BBIR y BNIR

El 2-hidroxi-6-naftaldehído fue comprado a Accela ChemBio; el 4-hidroxibenzaldehído, la cianina IR780, el eterato de trifluoruro de boro ($\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{Et})_2$), la trietilamina y el pirrol fueron comprados en Sigma Aldrich. Los disolventes utilizados en la síntesis (DMF, diclorometano y pirrol), se destilaron antes de ser utilizados. Los espectros de resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C) se adquirieron con un equipo Jeol Eclipse de 300 MHz. Los espectros de masas se adquirieron con dos equipos: Jeol AX505HA (EI-MS) y Jeol AccuTOF JMS-T100LC (DART-MS).

La síntesis de ambos BODIPY, con fenol (BB) y naftol (BN) se llevó a cabo siguiendo una metodología ya reportada^[35] (Figura 4.1). En una síntesis típica, se adicionan 4 mmol del aldehído aromático a 80 mmol (20 equiv.) de pirrol bajo atmósfera inerte y con agitación. Se agrega una gota de ácido trifluoroacético y se monitorea el avance por cromatografía. Una vez terminada la reacción, se evapora el pirrol y se diluye la mezcla con 30 mL de diclorometano. Se adiciona lentamente una solución de DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona, 4.8 mmol, 1.2 equiv.) en 125 mL de diclorometano y se deja 4 horas en agitación. Al terminar, se agregan 40 mmol (10 equiv.) de trietilamina y $\text{BF}_3 \cdot \text{O}(\text{Et})_2$ y se deja en agitación toda la noche. El medio de reacción se lava con agua (3x50 mL), se filtra sobre sulfato de sodio y se evapora el disolvente. El producto se purifica por cromatografía (gel de sílice, diclorometano), para obtener una película naranja metálico con un rendimiento del 32%.

Para sintetizar las moléculas BBIR y BNIR, se disuelven 500 mg de la cianina IR780 y 1.2 equivalentes del BODIPY correspondiente en DMF. Se agregan 10 equivalentes de trietilamina, y se deja la reacción a 40°C por 8 horas. Se evapora el disolvente en vacío y la

reacción se purifica por cromatografía (gel de sílice, diclorometano/metanol 99:1) para obtener un polvo negro con un rendimiento del 65%.

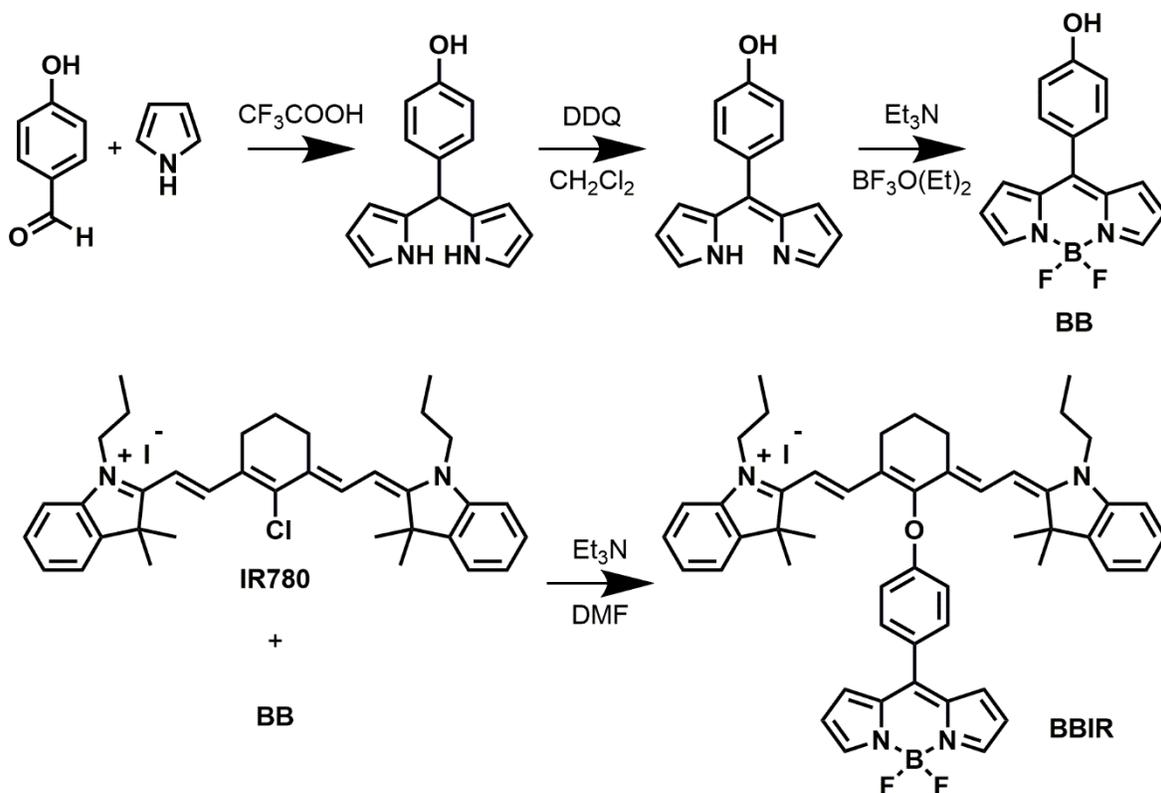


Figura 4.1. Esquema de síntesis de las moléculas BB y BBIR. La síntesis de BN y BNIR sigue el mismo proceso, partiendo del 2 hidroxí-6-naftaldehído.

Para la síntesis del BODIPY, es muy importante utilizar la menor cantidad posible de ácido trifluoroacético, ya que este promueve la polimerización del pirrol, bajando el rendimiento de la reacción y dificultando la purificación del producto. Asimismo, es de vital importancia cuidar la calidad del DDQ utilizado, ya que durante la síntesis se observó una gran dependencia del rendimiento de reacción con respecto al DDQ utilizado.

En la purificación del BODIPY puede ser necesario el uso de una segunda columna cromatográfica para eliminar completamente las impurezas. Es útil hacer una percolada rápida en una columna con gel de sílice y utilizando diclorometano como eluyente para eliminar los residuos más polares antes de la columna cromatográfica., haciendo más fácil la purificación y eliminando la necesidad de una segunda columna.

Para la síntesis de las moléculas BBIR y BNIR se puede utilizar acetonitrilo para que sea más sencillo eliminar el solvente al terminar la reacción, sin embargo esto suele dar menores rendimientos de reacción (aprox. 5% menores).

Es importante mencionar que ambos productos tienen un R.F: muy similar a la cianina IR780 utilizada en la reacción, dificultando su separación por cromatografía. Utilizando un exceso del BODIPY, el cual es fácil de separar, se puede resolver este problema. Incluso es posible utilizar diclorometano puro como eluyente para eliminar el exceso de BODIPY y las impurezas menos polares antes de utilizar la mezcla diclorometano/metanol para la purificación.

4.2 Espectroscopia Estática.

Los espectros de absorción fueron medidos en un espectrofotómetro CARY 50 BIO (Varian). Los espectros de emisión y excitación fueron tomados con un fluorímetro CARY Eclipse (Varian). Las muestras se midieron en una celda de cuarzo de 1 cm, a 20 ± 1 °C. La concentración de las muestras fue del orden de 10^{-7} M, asegurando que la absorbancia estuviera por debajo de 0.8 para minimizar los efectos de reabsorción. Los disolventes utilizados en las mediciones espectroscópicas eran grado HPLC o equivalente.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia se calcularon con la ecuación:

$$\Phi_M = \frac{I_M A_S \Phi_S}{A_M I_S} * \frac{n_M^2}{n_S^2} \quad (4.1)$$

donde los subíndices M y S denotan a la muestra y el estándar respectivamente, Φ es el rendimiento cuántico, I es la integral del espectro de emisión, A es la absorción de la muestra a la longitud de onda de excitación y n es el índice de refracción del disolvente.

Como estándares se utilizó la rodamina 6G ($\Phi = 0.93$)^[36] para la emisión del BODIPY, y la cianina IR780 ($\Phi = 0.076$)^[37] para la emisión del fragmento cianina.

Las mediciones se realizaron por triplicado, con desviaciones estándar de alrededor de 6×10^{-4} . Se utilizó un algoritmo de suavizado (regresión polinomial ponderada con funciones gaussianas) para mejorar la visibilidad de las emisiones de baja intensidad. Los espectros suavizados se compararon con los originales para asegurar que la forma y el máximo de las bandas no cambiaran. Todos los cálculos se realizaron utilizando los datos sin suavizado.

4.3 Espectroscopia Resuelta en Tiempo

Los tiempos de vida de los estados excitados de las moléculas BBIR y BNIR fueron medidos por la técnica de conteo de fotones correlacionas en tiempo (TCSPC, por sus siglas en inglés), utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de ancho. Para excitar las muestras se utilizó un láser pulsado de picosegundos (LDH-D-C-485, 482 nm, PicoQuant), enfocado con un objetivo de microscopio (AN = 0.25). La fluorescencia se recolectó utilizando el mismo objetivo, para ser reenfozada en un fotodiodo de avalancha de fotón individual (PD-050-CTE, Micro Photon Devices), conectado al sistema de TCSPC (PicoHarp 300, PicoQuant), sincronizado con la frecuencia de repetición del láser. Se utilizó un filtro de paso largo para eliminar los fotones residuales del haz de excitación.

La intensidad de los pulsos se ajustó para asegurar que menos del 1% de los eventos de excitación resultaran en la detección de un fotón. No se detectó señal al irradiar el disolvente puro. Las señales fueron analizadas con el programa SymphoTime 64 (PicoQuant), el cual utiliza el algoritmo de iteración de Levenberg-Marquardt.

Los experimentos se llevaron a cabo con soluciones de concentración 10^{-6} M, usando filtros de banda de 520 ± 10 nm y 600 ± 10 nm (NewPort) para la emisión del BODIPY y su estado de transferencia de carga respectivamente. La emisión de la cianina se midió usando un filtro de paso largo de 700 nm. La función de respuesta del equipo se midió utilizando una solución de Allura Red en metanol ($\tau \approx 10$ ps).^[38]

4.4 Microscopía en Células Vivas

Para demostrar y evaluar el funcionamiento de los sensores sintetizados en medios biológicos, se realizaron experimentos utilizando células de adenocarcinoma de pulmón humano (SK-LU-1), provistas por el *National Cancer Center* de los Estados Unidos.

Para los ensayos de viabilidad celular, las células SK-LU-1 se sembraron en placas de 96 pozos. Éstas se cultivaron en un medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal de bovino, L-glutamina (2 μ M), penicilina G (100 U/mL), sulfato de estreptomycin (100 μ g/mL) y se mantuvieron a 37 °C en CO₂ (5% v/v). Después de 24 horas, se adicionaron soluciones de la molécula BNIR de diferente concentración (1, 10, 25, 50, 75, 100 y 200 μ M) y la viabilidad celular se evaluó tras 24 horas de incubación, utilizando Alamar Blue como indicador fluorescente (Life Technologies, Carlsbad, USA). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para el análisis con el microscopio confocal, las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio cubiertos con poli-L-lisina, y se cultivaron en el medio descrito en el párrafo anterior por 48 horas.

Las células de control fueron teñidas sin ningún tratamiento extra. Un segundo grupo de células fueron tratadas con una mezcla 1:1 de glicerol y medio de cultivo por 30 minutos antes de ser teñidas. Un tercer grupo fue tratado con BKM-120 (150 μ M) por 24 horas antes de la tinción para inducir apoptosis.

La tinción de las células se lleva a cabo justo antes de la formación de imágenes. Las células se lavaron con un buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4), se incubaron con 1.5 mL de solución de la molécula BNIR en DMSO por 30 min, se enjuagaron con la solución salina y se montaron en porta muestras de vidrio. Las células de control y las tratadas con glicerol o BKM-120 fueron teñidas con una solución de BNIR 100 μ M. Un segundo grupo de células sin tratamiento se teñieron con una solución 25 μ M de BNIR.

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), con un tamaño de 1024 x 1024 píxeles y profundidad de 12-bits. Se utilizó un objetivo de 63x de inmersión en aceite. Se programó el microscopio para tomar 4 imágenes en cada punto de interés en la muestra: dos utilizando una excitación de 488 nm y detectando primero a 500-550 nm y después a 750-800 nm; la tercera imagen fue tomada excitando a 633 nm y detectando a 750-800 nm; la cuarta es la imagen de campo claro de la muestra. El procesado y análisis de las imágenes se hizo con el programa ImageJ (*National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA*).

5. Resultados y Discusión

Utilizando la metodología descrita en el capítulo anterior, se llevó a cabo el estudio de los sensores sintetizados como prueba de concepto del diseño molecular planteado. En este capítulo se presentan y analizan los resultados experimentales obtenidos para demostrar que las moléculas BBIR y BNIR (Figura 1.2, pag. 8):

- Son sensibles a la polaridad del medio
- Presentan una mayor sensibilidad a la polaridad en comparación a los cromóforos que las conforman.
- Presentan dos bandas de emisión cuya relación de intensidad de emisión puede ser analizada para obtener medidas que son independientes de la concentración.
- Funcionan como sensores de la polaridad en medios biológicos.

5.1 Espectroscopia Estática

La caracterización de las moléculas BBIR y BNIR comenzó comprobando que los fragmentos BODIPY y cianina se comportan ópticamente como cromóforos independientes. Como puede verse en la Figura 5.1, los espectros de absorción de los sensores son la suma de los espectros de absorción de las moléculas precursoras. El desplazamiento de los máximos de las bandas (aprox. 10 nm) se debe a la formación del enlace éter que une a los dos cromóforos que conforman a los sensores.

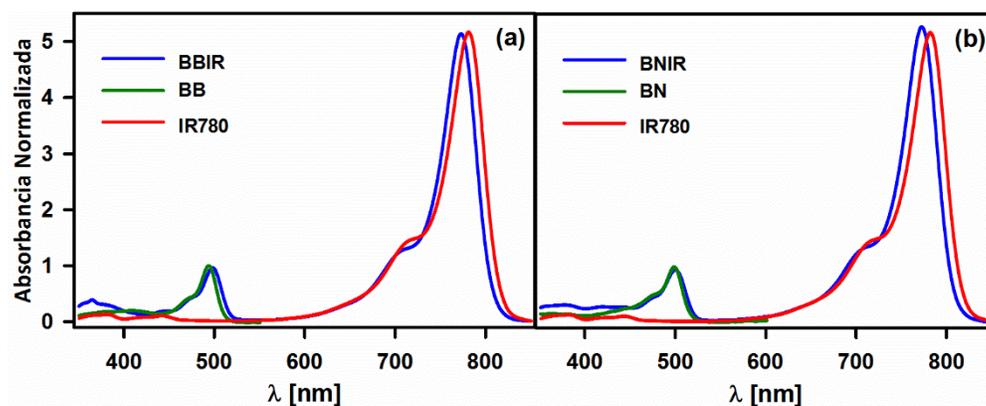


Figura 5.1. Espectros de absorción de BBIR (a) y BNIR (b), comparados con los espectros de las moléculas precursoras BB, BN e IR780.

El fragmento BODIPY de las moléculas sintetizadas puede ser excitado selectivamente utilizando luz de 470-500 nm, el cual corresponde a la transición a un estado excitado localizado en el BODIPY. El espectro de emisión, Figura 5.2, presenta 3 bandas diferentes: la primera (500-600 nm) es la emisión del estado localmente excitado (LE) del BODIPY. La segunda banda (550-700 nm) ha sido observada en otros BODIPY^[35] y corresponde a la emisión del estado de transferencia de carga localizado en el BODIPY. Esto se puede confirmar observando el marcado solvatocromismo presentado por esta banda, como se puede ver en el recuadro de la Figura 5.2. El cambio de polaridad entre metanol y pentanol tiene un efecto mínimo en la banda del estado localmente excitado del BODIPY, pero causa un desplazamiento del máximo de emisión de ≈ 20 nm en la banda del estado de transferencia de carga. La tercera banda (750-800 nm) corresponde a la emisión del estado excitado localizado en el fragmento cianina. Debido a que la excitación inicial se localiza en el BODIPY, esta última banda de emisión debe ser el resultado de transferencia de energía entre el BODIPY y la cianina.

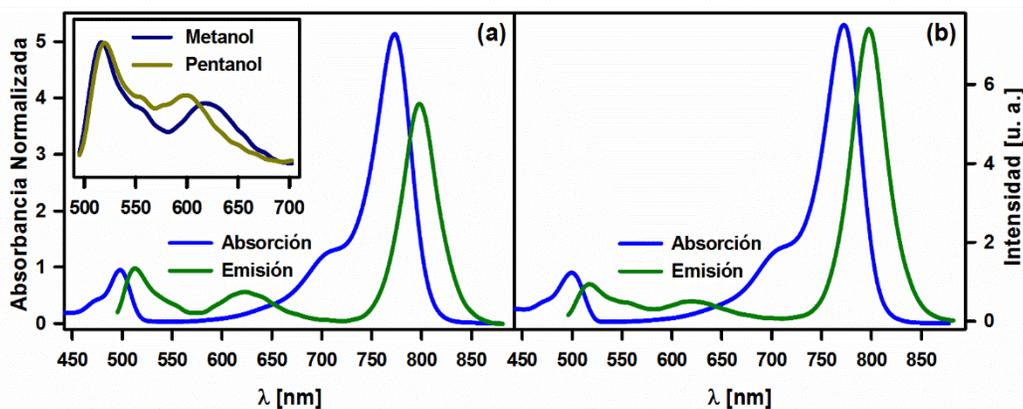


Figura 5.2. Espectros de absorción y emisión de BBIR (a) y BNIR (b) en metanol. El recuadro muestra la comparación de las bandas de emisión del BODIPY en metanol y pentanol.

Para demostrar que existe transferencia de energía entre los dos fragmentos de las moléculas, se tomó el espectro de excitación de los sensores detectando la banda de emisión de la cianina (790 nm). Este espectro, Figura 5.3, muestra una serie de bandas en la región de 300-470 nm, las cuales corresponden a las bandas de absorción de los estados excitados de la cianina, como puede observarse al compararlos con el espectro de excitación de la cianina precursora IR780. La banda adicional en la región de 470-520 nm se debe a la absorción del fragmento BODIPY, la cual produce emisión del fragmento cianina a 790 nm. Esta observación confirma que existe transferencia de energía entre ambos cromóforos.

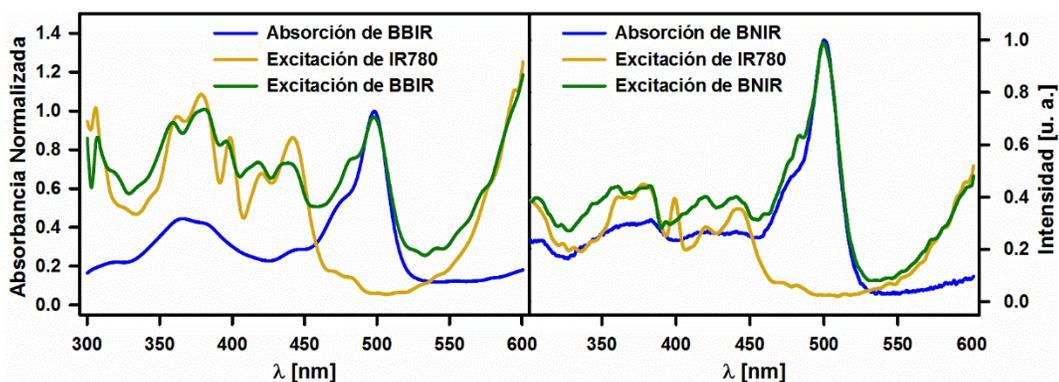


Figura 5.3. Comparación entre el espectro de absorción y excitación ($\lambda_{det} = 790$ nm) de las moléculas BBIR (a) y BNIR (b) y el espectro de excitación ($\lambda_{det} = 800$ nm) de la cianina IR780 en metanol.

El siguiente paso fue comprobar que las moléculas presentan cambios en función de la polaridad del medio, para lo cual los espectros de emisión de las moléculas BBIR y BNIR se midieron en varios disolventes, excitando al fragmento BODIPY ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$). En la serie de alcoholes de metanol a pentanol (Figura 5.4) se puede observar que la intensidad de la banda de emisión de la cianina (790 nm) crece conforme la polaridad del disolvente disminuye. Los cambios en las bandas de emisión del BODIPY, tanto del estado localmente excitados como del estado de transferencia de carga (500-700 nm) son despreciables.

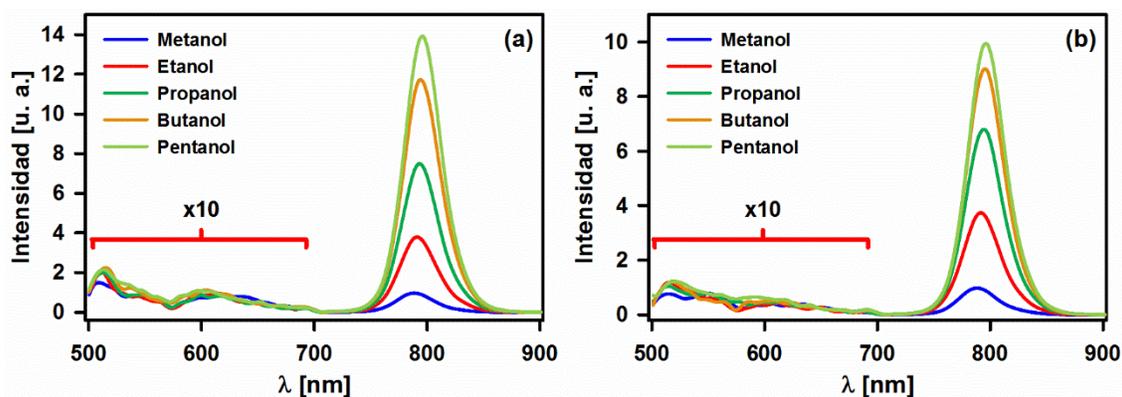


Figura 5.4. Espectros de emisión ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$) de las moléculas BBIR (a) y BNIR (b) en la serie de alcoholes de metanol a pentanol. El intervalo de 500-700 nm se multiplicó por 10 para mejorar la visibilidad.

Adicionalmente, se tomaron los espectros de emisión de las moléculas BBIR, BNIR e IR780 excitando al fragmento cianina directamente (690 nm) en la misma serie de alcoholes, Figura 5.5. Mientras que la emisión de la cianina precursora IR780 solamente cambia por un factor de aprox. 1.6 entre metanol y pentanol, este factor es mayor en las moléculas BBIR (5.7) y BNIR (3.5).

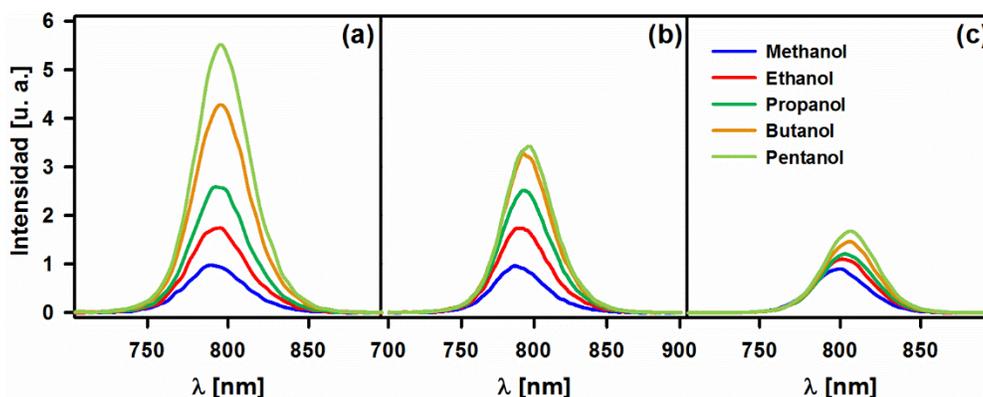


Figura 5.5. Emisión de las moléculas BBIR (a), BNIR (b) e IR780 (c) en la serie de alcoholes, excitando directamente a la cianina ($\lambda_{\text{ex}} = 690 \text{ nm}$).

Esta diferencia en la dependencia de la emisión de la cianina con el disolvente entre los sensores sintetizados y la cianina precursora se debe a la formación de estados de transferencia de carga en este fragmento. Este comportamiento es central en el funcionamiento de los sensores, aumentando la sensibilidad de los mismos a cambios en su ambiente. Debido a la diferencia en el donador de electrones en la formación de los estados de transferencia de carga entre la molécula BBIR y BNIR, este aumento en la sensibilidad es diferente para cada molécula.

Utilizando los espectros obtenidos, se calcularon los rendimientos de fluorescencia de las moléculas BBIR y BNIR en la serie de alcoholes. Como se había comentado antes, la emisión del fragmento BODIPY presenta cambios mínimos en los diferentes disolventes utilizados, con rendimientos de emisión menores a 0.001. Aunque este rendimiento de fluorescencia es bajo, es suficiente para ser detectado y cuantificado en un microscopio confocal (sección 5.4).

Para el fragmento cianina se cuenta con dos rendimientos de fluorescencia: cuando se irradia de manera selectiva al BODIPY ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, excitación indirecta) y cuando se irradia de manera selectiva a la cianina ($\lambda_{\text{ex}} = 690 \text{ nm}$, excitación directa). El rendimiento de fluorescencia de la cianina cuando es excitada indirectamente depende tanto del rendimiento de transferencia de energía entre los dos cromóforos como del rendimiento de fluorescencia de la cianina excitada directamente. Conociendo el

rendimiento de emisión con ambas longitudes de onda de excitación, es posible calcular el rendimiento de la transferencia de energía, utilizando la fórmula 5.1.

$$\Phi_{\text{TRE}} = \frac{\Phi_{\text{FC490}}}{\Phi_{\text{FC690}}} \quad (5.1)$$

donde Φ_{TRE} es el rendimiento de la transferencia de energía entre los cromóforos, Φ_{FC690} es el rendimiento de fluorescencia de la cianina cuando es excitada directamente ($\lambda_{\text{ex}} = 690 \text{ nm}$) y Φ_{FC490} es el rendimiento de emisión de la cianina cuando se excita al fragmento BODIPY ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$).

Estos resultados se muestran en la Figura 5.6, en donde se observa que tanto el rendimiento de transferencia de energía como el rendimiento de emisión de la cianina son sensibles a la polaridad, incrementando su valor en los disolventes menos polares. Estos dos efectos se combinan cuando el fragmento BODIPY de los sensores es excitado, aumentando la sensibilidad de la molécula a cambios en la polaridad local.

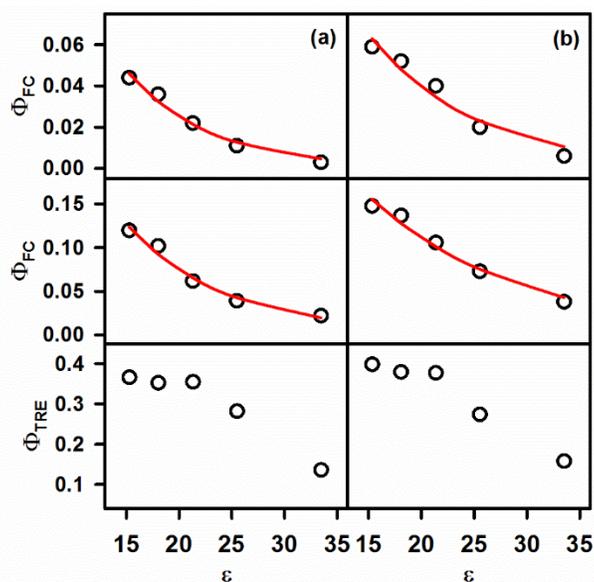


Figura 5.6. Rendimiento de fluorescencia del fragmento cianina ($\lambda_{\text{det}} = 790 \text{ nm}$), excitando el fragmento BODIPY ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, primera fila) y el fragmento cianina ($\lambda_{\text{ex}} = 690 \text{ nm}$, segunda fila); rendimiento de la transferencia de energía (tercera fila) como función de la constante dieléctrica del disolvente para las moléculas BBIR (a) y BNIR (b) en la serie de alcoholes de metanol a pentanol.

Se puede notar que ambas moléculas tienen valores semejantes de rendimiento de transferencia de energía, así como un comportamiento similar, presentando una saturación en el máximo del rendimiento de transferencia de energía en los disolventes menos polares. La tendencia no lineal de los datos se debe tanto a la complejidad de las interacciones entre los sensores y el medio, así como a la dinámica del estado excitado de los mismos.

Se calculó también la relación de intensidad de emisión (I_C/I_B) entre la fluorescencia de los fragmentos cianina (I_C) y BODIPY (I_B) para los sensores en la serie de alcoholes. La Figura 5.7 muestra que la relación de intensidad de emisión depende de la polaridad del medio, y que además crece con los rendimientos de emisión de la cianina medidos. Esto demuestra que en ambos sensores se puede medir esta relación para detectar cambios en el ambiente local (a nivel molecular) de los mismos, dando así medidas independientes de la concentración de los mismos.

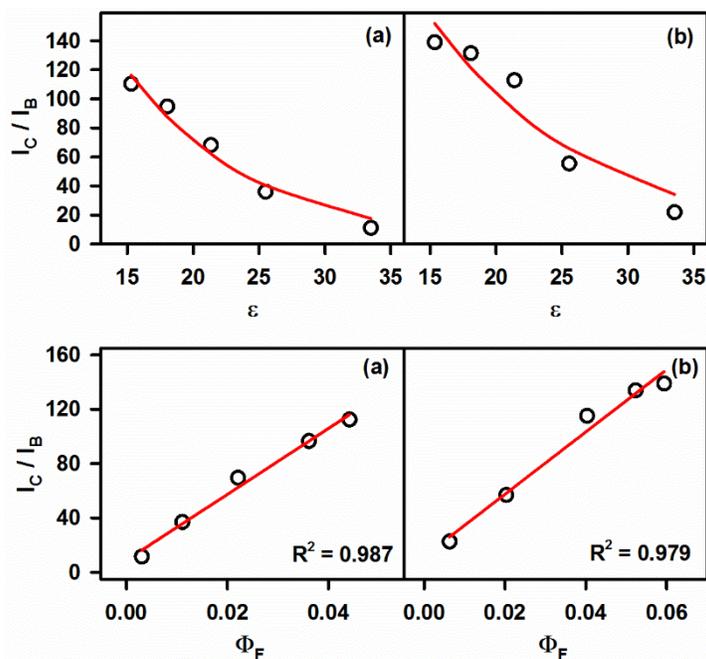


Figura 5.7. Relación de intensidad de emisión (I_C/I_B) entre los fragmentos BODIPY y cianina en función de la constante dieléctrica del disolvente (arriba) y el rendimiento de fluorescencia de la cianina (abajo) para las moléculas BBIR (a) y BNIR (b) en la serie de alcoholes.

Es importante destacar la separación espectral entre la emisión de ambos cromóforos, la cual es de aproximadamente 280 nm. Esta separación es importante ya que permite medir ambas emisiones sin que haya interferencia entre ambas. Esto es especialmente importante en microscopía, donde la separación entre distintas regiones del espectro visible depende de los filtros utilizados. Muchas veces éstos no son capaces de medir distintas bandas de emisión cercanas entre sí, o dejan pasar un poco de cada emisión en los dos diferentes canales de detección.

Para tener una idea del aumento en la sensibilidad de las moléculas, central en el diseño de las mismas, puede cuantificarse el cambio en los rendimientos de emisión medidos en disolventes de diferente polaridad. Por ejemplo, la emisión de la cianina tras la excitación del BODIPY ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$) en la molécula BBIR es 14.6 mayor en pentanol que en metanol. Esto puede compararse con el cambio en la misma molécula excitando directamente al fragmento cianina ($\lambda_{\text{ex}} = 690 \text{ nm}$) que es solo 5.5 veces mayor en pentanol.

Una vez comprobada la dependencia de la emisión de las moléculas con la polaridad, y el aumento en la sensibilidad de las mismas por el diseño molecular planteado, se buscó analizar con más detalle su comportamiento. Para esto se realizaron los experimentos en mezclas de disolventes, donde se tenía mayor control en los cambios en el ambiente local de los sensores. En la Figura 5.8, puede observarse que tanto en medios próticos (metanol/butanol) como apróticos (acetona/diclorometano), la relación de intensidad de emisión del BODIPY y la cianina aumenta junto con la proporción del disolvente menos polar de la mezcla. Esto indica que los sensores pueden ser utilizados en ambos tipos de medio, próticos y apróticos.

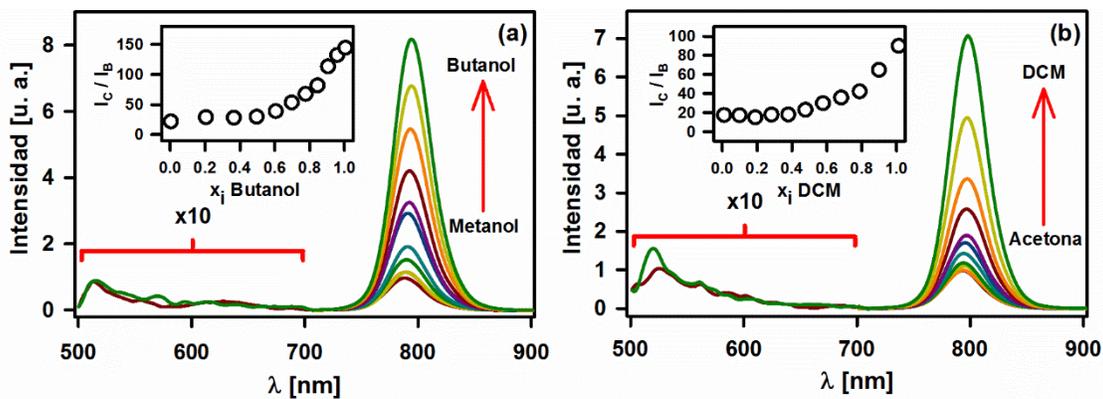


Figura 5.8 Espectros de emisión ($\lambda_{ex} = 490$ nm) de la molécula BNIR en mezclas de metanol/butanol (a) y acetona/diclorometano (DCM) (b). Lo recuadros muestran la dependencia de la relación de intensidad de emisión (I_c/I_b) de los fragmentos BODIPY y cianina en función de la fracción molar de los disolventes. El intervalo de 500-700 nm se multiplicó por 10 para mejorar la visibilidad.

Al analizar los datos anteriores, se notó que el rendimiento de transferencia de energía presenta una tendencia no lineal para los disolventes próticos y lineal para los apróticos, Figura 5.9. Esto indica una diferencia en las interacciones soluto-disolvente entre ambos medios, probablemente debida a la formación de puentes de hidrógeno en los disolventes próticos.

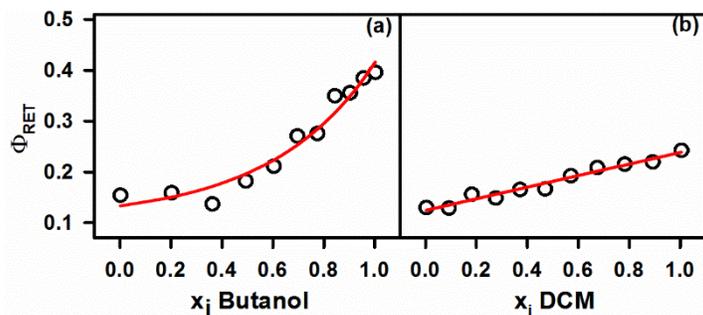


Figura 5.9 Rendimiento de la transferencia de energía entre los fragmentos BODIPY y cianina de la molécula BNIR en función de la fracción molar de los disolventes en mezclas metanol/butanol (a) y acetona/diclorometano (DCM) (b).

A esto se suma que para disolventes con constantes dieléctricas semejantes, por ejemplo acetona ($\epsilon = 21.1$) y propanol ($\epsilon = 21.3$), la emisión del estado de transferencia de carga del BODIPY y la emisión del fragmento cianina son mayores en disolventes próticos, Figura 5.10. Esto se analizó a fondo midiendo los espectros de emisión de las moléculas en

mezclas de acetona/propanol. En estos se observa que la relación de la intensidad de emisión entre los dos cromóforos aumenta de manera no lineal con la proporción del disolvente prótico, con el mayor cambio cuando éste se encuentra en mayor proporción en la mezcla. Esta es una demostración directa de que los sensores son sensibles a las interacciones específicas con grupos OH en su ambiente local.

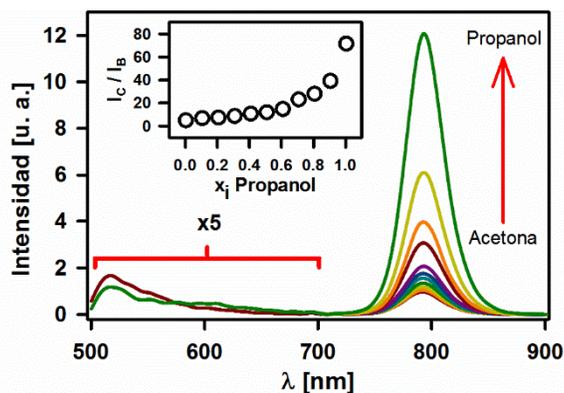


Figura 5.10. Espectros de emisión de la molécula BNIR en mezclas de acetona y propanol. En el recuadro se muestra la relación de intensidad de emisión del BODIPY y la cianina en función de la fracción molar de propanol. La emisión en el intervalo de 500-700 nm se multiplicó por 5 para mejorar la visibilidad.

Para poder descartar que los cambios observados en la emisión de los sensores en los diferentes disolventes usados estén influenciados por cambios en la viscosidad del medio,^[39] se comparó la emisión de los sensores en metanol y dietilenglicol (DEG). Ambos disolventes tienen una constante dieléctrica similar (33.4 vs 31.8, respectivamente) pero la viscosidad cambia de 0.6 cP en metanol a 50 cP en DEG. Como puede observarse en la figura 5.11, las bandas de absorción y emisión presentan un desplazamiento batocrómico en DEG comparado con los espectros en metanol. La emisión de los cromóforos, la transferencia de energía entre el BODIPY y cianina y la emisión del estado de transferencia de carga del BODIPY (580 nm) son mayores en DEG. Sin embargo, este cambio es pequeño comparado con los observados en los experimentos anteriores. El rendimiento de emisión de la cianina tras la excitación del BODIPY ($\lambda_{ex} = 490$ nm) es tan solo 40% mayor en DEG que en metanol, mucho menor al cambio observado con el pentanol, donde la emisión es 980% mayor que en metanol (Figura 5.2). Teniendo en cuenta que la viscosidad es 50 veces mayor en DEG, esto indica que la molécula es poco sensible a la viscosidad del

medio. Además, la molécula está diseñada para utilizar la relación de intensidad de emisión entre los cromóforos, la cual cambia menos del 5% entre las soluciones de metanol y DEG. El resto de los disolventes utilizados en los experimentos tiene viscosidades menores a 5 cP, por lo que el efecto de la viscosidad en estos casos es mínimo.

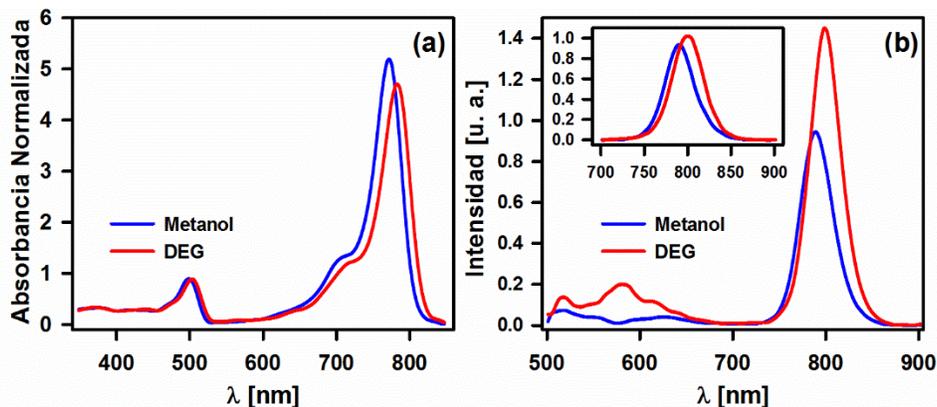


Figura 5.11. Espectros de absorción (a) y emisión (b, $\lambda_{ex} = 490$ nm) normalizados de BNIR en mezclas metanol/dietilenglicol (DEG). El recuadro muestra los espectros de emisión excitando la cianina directamente ($\lambda_{ex} = 690$ nm).

Lo mencionado en el último párrafo se confirmó realizando experimentos en mezclas de metanol/glicerol, en las cuales la viscosidad cambia en cuatro órdenes de magnitud, pero la emisión en glicerol es sólo 220% mayor en glicerol que en metanol, como puede verse en la figura 5.12.

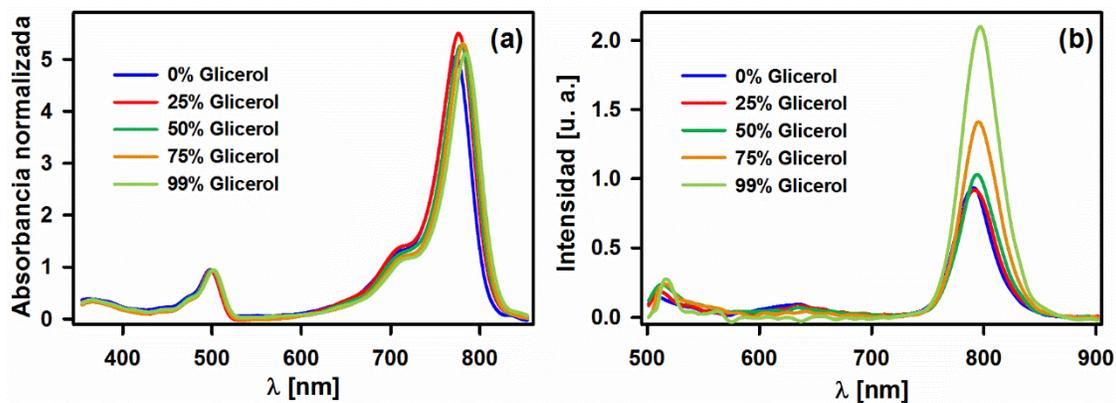


Figura 5.12. Espectros de absorción (a) y emisión (b) de la molécula BNIR en mezclas metanol/glicerol.

Los experimentos reportados en esta sección confirman que las moléculas BBIR y BNIR son altamente sensibles a la polaridad del medio y que sus emisiones presentan una elevada dependencia a cambios en el medio gracias al diseño molecular empleado. Estas moléculas además presentan dos emisiones en diferentes regiones del espectro que permiten medir la relación de intensidad de emisión entre ellas, por lo que las mediciones son independientes de la concentración de los sensores, lo cual es muy útil en medios heterogéneos y celulares.

5.2 Espectroscopia Resuelta en Tiempo

Para entender mejor el comportamiento de los sensores sintetizados se llevó a cabo la medición del tiempo de vida de los estados excitados de los mismos, tras la excitación selectiva del fragmento BODIPY ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$). Los resultados obtenidos se utilizaron para plantear el modelo de la dinámica del estado excitado de los sensores presentado en la siguiente sección

Se detectó la fluorescencia de las moléculas en 3 regiones de interés: 520 nm, asociado a la emisión del estado localmente excitado en el BODIPY; 600 nm, que corresponde al estado de transferencia de carga localizado en el BODIPY; >700 nm, en donde emite el fragmento cianina. Primero se realizaron los experimentos en la misma serie de disolventes, de metanol a pentanol, utilizada en la sección anterior.

La emisión del estado localmente excitado del BODIPY (520 nm) presenta un decaimiento biexponencial. El tiempo más corto es menor a los 50 ps, por lo que no puede ser resuelto cuantitativamente con la técnica de TCSPC, pero representa más de 99% del decaimiento de la fluorescencia del estado localmente excitado del BODIPY. Este resultado es coherente con valores reportados para otros BODIPY, con tiempos del orden de 10 ps para la formación de estados de transferencia de carga.^[26] El segundo decaimiento es sensible al medio, y tanto su tiempo de decaimiento como su amplitud

aumentan conforme la polaridad del disolvente disminuye. De acuerdo a estudios realizados previamente, el estado localmente excitado de una molécula y su estado de transferencia de carga pueden encontrarse en equilibrio térmico,^[25] por lo que el primer tiempo puede ser asignado a la formación de los estados de transferencia de carga, mientras que el segundo representa la disminución de la población una vez que el equilibrio ha sido alcanzado.

Tabla 5.1. Amplitud normalizada y tiempo de decaimiento de la fluorescencia de las moléculas BBIR y BNIR detectando a 520 nm.^[a]

Disolvente	BBIR		BNIR	
	a_2	τ_2 [ps]	a_2	τ_2 [ps]
Metanol	[b]	[b]	[b]	[b]
Etanol	0.008	261 ± 15	[b]	[b]
Propanol	0.012	493 ± 14	[b]	[b]
Butanol	0.011	490 ± 7	0.001	488 ± 13
Pentanol	0.014	604 ± 9	0.001	881 ± 10

[a] El primer tiempo τ_1 se encuentra por debajo de los 50 ps en todos los casos.

[b] La baja amplitud del decaimiento no permite su ajuste.

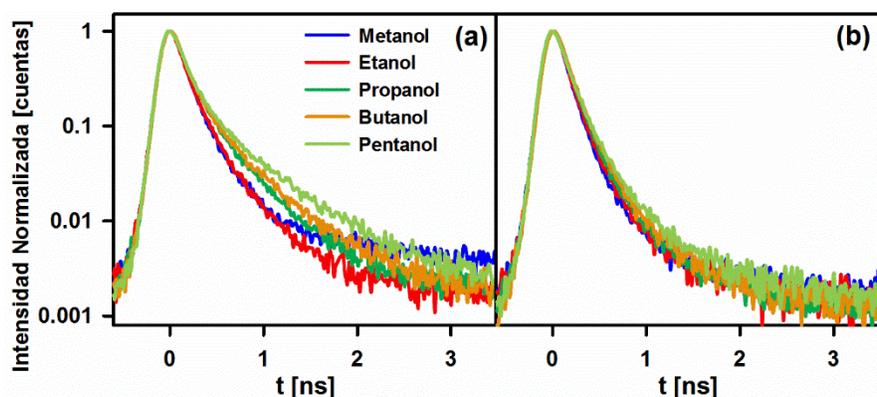


Figure 5.13. Decaimiento de la fluorescencia del fragmento BODIPY (520nm) de las moléculas BBIR (a) y BNIR (b) en la serie de alcoholes de metanol a pentanol.

La emisión del estado de transferencia de carga del BODIPY (600 nm) también presenta un decaimiento biexponencial, Figure 5.13. El tiempo corto varía en los disolventes utilizados, aumentando conforme la polaridad del medio disminuye, indicando que está relacionado con la relajación de este estado al estado basal. El segundo tiempo es similar para ambas moléculas en los cinco alcoholes utilizados, y no presenta una clara dependencia con la polaridad del medio en la serie de alcoholes.

Tabla 5.2. Tiempo de decaimiento de la fluorescencia de las moléculas BBIR y BNIR detectando a 600 nm.

Disolvente	BBIR		BNIR	
	τ_1 [ps]	τ_2 [ps]	τ_1 [ps]	τ_2 [ps]
Metanol	87 ± 5	1553 ± 9	106 ± 5	1509 ± 10
Etanol	171 ± 8	1290 ± 11	150 ± 9	1285 ± 9
Propanol	179 ± 11	1203 ± 8	170 ± 8	1233 ± 8
Butanol	286 ± 18	1270 ± 27	190 ± 10	1223 ± 9
Pentanol	329 ± 31	1290 ± 27	198 ± 13	1224 ± 11

El tiempo de vida del estado excitado localizado en el fragmento cianina (>700 nm) también aumenta al disminuir la polaridad del disolvente. Este cambio es consistente con el aumento en el rendimiento de fluorescencia de este cromóforo, sección 5.1. Además, existe una buena correlación entre el tiempo de decaimiento de la fluorescencia de la cianina y la polaridad de los disolventes, Figura 5.14. Estos resultados indican que las moléculas sintetizadas pueden servir como sensores de polaridad con técnicas de medición de tiempos de vida de fluorescencia y microscopía de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM por sus siglas en inglés).

Tabla 5.3. Decaimiento de la fluorescencia de las moléculas BBIR y BNIR detectando a longitudes de onda mayores a 700 nm.

	BBIR	BNIR
Disolvente	τ [ps]	τ [ps]
Metanol	86 ± 1	212 ± 1
Etanol	197 ± 1	379 ± 1
Propanol	380 ± 1	626 ± 2
Butanol	549 ± 1	770 ± 2
Pentanol	724 ± 1	953 ± 1

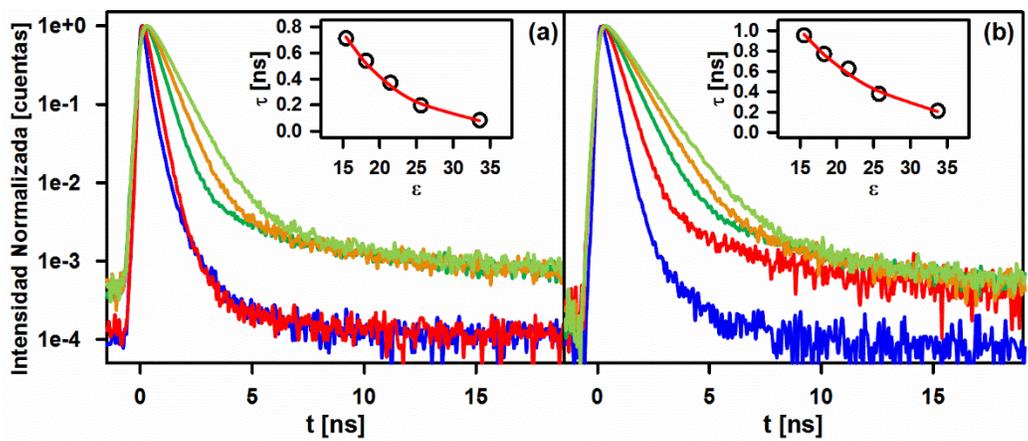


Figure 5.14. Decaimiento de la fluorescencia del fragmento cianina (> 700 nm) de las moléculas BBIR (a) y BNIR (b) en la serie de alcoholes de metanol a pentanol. El recuadro muestra el tiempo de decaimiento como función de la constante dieléctrica del disolvente.

Para complementar los resultados sobre la sensibilidad de las moléculas en medios próticos y apróticos, se midieron los tiempos de vida de los estados excitados de las moléculas en acetona, Figura 5.16. El resultado más importante es que los tiempos de decaimiento en acetona (115 ± 8 ps y 302 ± 7 ps) son menores a los medidos en propanol, Figura 5.10. Como se mencionó antes, estos cambios podrían deberse a la formación de puentes de hidrógeno entre los sensores y el disolvente en los disolventes próticos. Si el fragmento donador de electrones de la molécula, el éter aromático que une los dos cromóforos, forma puentes de hidrógeno con el disolvente en el estado basal, éstos deberían romperse una vez que se da la transferencia del electrón al aceptor, debido a que el donador quedaría cargado positivamente. La dinámica de la formación y ruptura de estos enlaces podría alentar la formación y relajación de los estados de transferencia de carga.

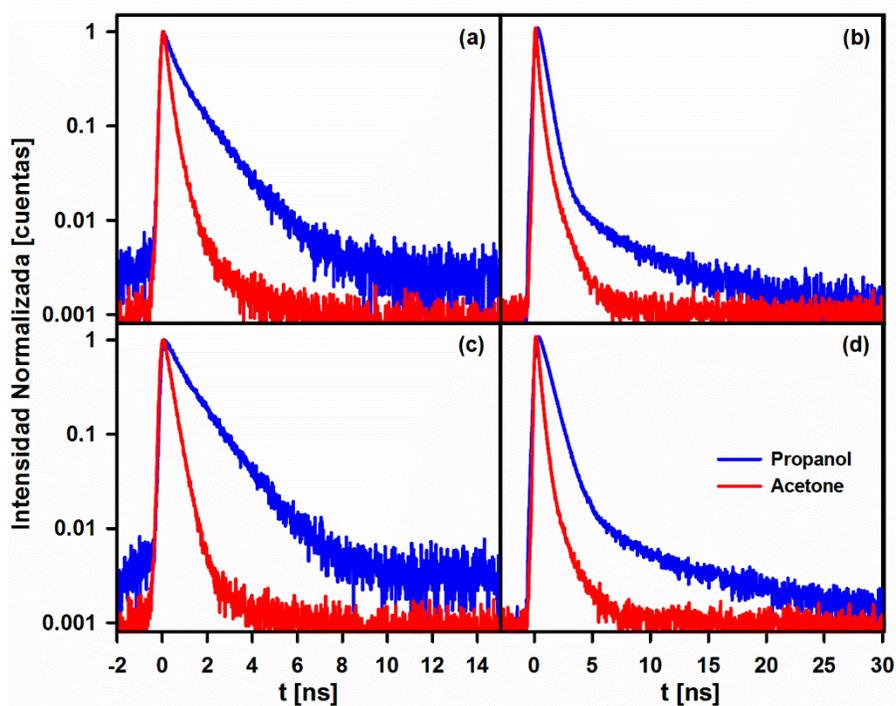


Figura 5.15. Decaimiento de la fluorescencia de las moléculas BBIR (a, b) y BNIR (c, d) en propanol y acetona, detectando la emisión del estado de transferencia de carga del BODIPY (600 nm, izq.) y de la cianina (>700 nm, der.).

En las moléculas BBIR y BNIR, ambos cromóforos forman estados de transferencia de carga con el mismo donador de electrones, por lo que es consistente que haya cambios en ambos debido a las interacciones del fragmento donador de electrones y el medio. Esto indica que es posible utilizar estos sensores para analizar la formación de puentes de hidrógeno en disolventes próticos.

Los resultados presentados en esta sección no sólo confirman las conclusiones obtenidas de los experimentos de espectroscopia estática, sino que además nos dan información útil de la dinámica del estado excitado de las moléculas sintetizadas. Esta dinámica es responsable del funcionamiento de las moléculas como sensores de polaridad y en el aumento en la sensibilidad de éstas, central en el diseño molecular presentado, lo cual se desarrolla a fondo en la siguiente sección.

5.3 Simulación de la Dinámica de Estados Excitados

Los resultados obtenidos en los experimentos de las dos secciones anteriores pueden ser utilizados para plantear el modelo cinético de los procesos fotofísicos que suceden en las moléculas BBIR y BNIR tras absorber luz, y más importante aún, analizar los cambios de los disolventes en estos procesos. A manera de resumen, las observaciones experimentales más importantes consideradas en el planteamiento del modelo son las siguientes:

1. La intensidad de la fluorescencia de ambos cromóforos, el BODIPY y la cianina, dependen de la polaridad del disolvente. Ésto indica que existe competencia cinética entre la formación de estados de transferencia de carga, sensible a la polaridad del medio, los canales de transferencia de energía y emisión de fluorescencia.

2. Los dos cromóforos que conforman la molécula están acoplados por el proceso de transferencia de energía. El rendimiento de este proceso incrementa conforme la polaridad del medio disminuye debido a la formación del estado de transferencia de carga en el fragmento BODIPY.

3. El estado excitado localizado en el BODIPY y el estado de transferencia de carga del mismo cromóforo se encuentran en equilibrio térmico a temperatura ambiente, como ha sido observado en otros BODIPY.

4. Debido a que el estado de transferencia de carga del BODIPY se forma a partir del estado excitado localizado en este cromóforo, deben tener estados vibracionales isoenergéticos. Debido a que el dipolo del estado de transferencia de carga es mayor, el disolvente debe rearrreglarse alrededor de la molécula, disminuyendo la energía del estado de transferencia de carga. Esto puede observarse en la diferencia en el máximo de emisión entre los dos estados: 510 nm para el estado excitado localizado en el BODIPY y 570-620 nm para el estado de transferencia de carga (dependiendo de la polaridad del medio).

5. Cuando el Sistema evoluciona al estado excitado localizado en la cianina debido a la transferencia de energía entre los cromóforos, el canal de emisión de la cianina compite con la formación de estados de transferencia de carga en este cromóforo, que es sensible a la polaridad el medio. Esto resulta en una doble dependencia del rendimiento de emisión del fragmento cianina de las moléculas BBIR y BNIR tras la excitación del BODIPY.

Teniendo en cuenta estas observaciones, se planteó el siguiente esquema de la dinámica del estado excitado de las moléculas BBIR y BNIR:

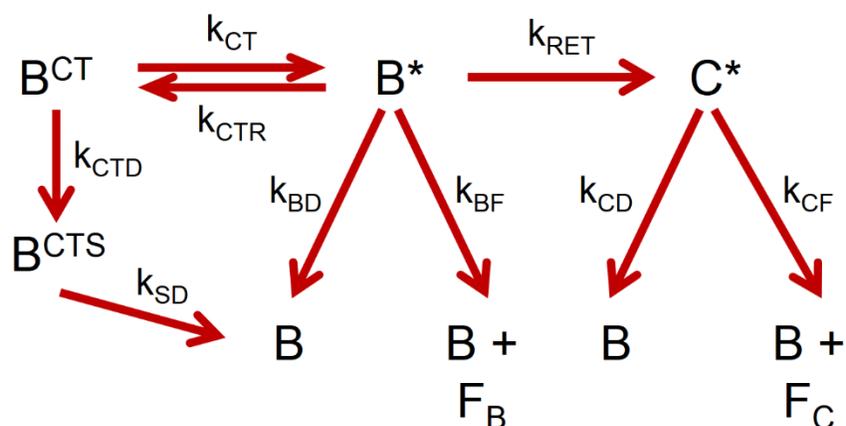


Figura 5.16. Esquema simplificado de la dinámica del estado excitado de las moléculas BBIR y BNIR.

Quando se excita selectivamente el fragmento BODIPY de las moléculas, éstas se encuentran en un estado excitado localizado en este fragmento (B^*), el cual puede formar un estado de transferencia de carga (B^{CT}), que se encuentra en equilibrio térmico con el estado B^* . Una vez formado el estado B^{CT} , el disolvente se reacomoda para solvatarlo, por lo que la molécula llega a un estado de menor energía (B^{CTS}) que ya no puede regresar al estado inicial. Los cambios en la polaridad del disolvente afectan la cinética del estado B^{CT} , y por tanto también a los dos procesos que compiten con él: la emisión de fluorescencia del BODIPY (F_B) y la transferencia de energía a la cianina, formando el estado C^* . Este último estado puede formar otro estado de transferencia de carga, sin embargo, no se tiene evidencia de que estén en equilibrio térmico con C^* , y para simplificar el esquema se toma en cuenta su contribución como cambios en la constante de decaimiento no

radiativo de la cianina (k_{CD}). Este proceso compite con la emisión de fluorescencia de la cianina (F_C).

A partir de este esquema presentado en la Figura 5.10, se pueden escribir las ecuaciones cinéticas para los estados excitados de las moléculas sintetizadas:

$$\frac{d[B^*]}{dt} = -(k_{BF} + k_{BD} + k_{TER} + k_{CT})[B^*] + k_{CTR}[B^{CT}] \quad (5.2)$$

$$\frac{d[B^{CT}]}{dt} = -(k_{CTR} + k_{CTF} + k_{CTD})[B^{CT}] + k_{CT}[B^*] \quad (5.3)$$

$$\frac{d[C^*]}{dt} = -(k_{CF} + k_{CD})[C^*] + k_{TER}[B^*] \quad (5.4)$$

$$\frac{d[F_B]}{dt} = k_{BF}[B^*] \quad (5.5)$$

$$\frac{d[F_C]}{dt} = k_{CF}[C^*] \quad (5.6)$$

Estas ecuaciones se resolvieron analíticamente para ser utilizadas en la simulación de la dinámica del estado excitado de los sensores. La integración de las ecuación 5.2 y 5.3 se realizó con álgebra matricial, dando como resultado las ecuaciones 5.7 y 5.8 (Apéndice 3). La ecuación 5.10 se obtuvo a partir de las ecuaciones 5.5 y 5.7. La ecuación 5.4 se integró como una ecuación diferencial lineal de primer orden, dando como resultado la ecuación 5.9, la cual fue utilizada para la integración de la ecuación 5.6 para dar la ecuación 5.11.

$$[B^*]_t = X_1 \exp(\lambda_1 * t) + X_2 \exp(\lambda_2 * t) \quad (5.7)$$

$$[B^{CT}]_t = X_3 \exp(\lambda_1 * t) + X_4 \exp(\lambda_2 * t) \quad (5.8)$$

$$[C^*]_t = k_{TER} \left[\frac{X_1}{(\lambda_1 + k_{CF} + k_{CD})} (\exp(\lambda_1 * t) - \exp(-(k_{CF} + k_{CD}) * t)) + \frac{X_2}{(\lambda_2 + k_{CF} + k_{CD})} (\exp(\lambda_2 * t) - \exp(-(k_{CF} + k_{CD}) * t)) \right] \quad (5.9)$$

$$[F_B]_t = k_{BF} \left[\left(\frac{X_1}{\lambda_1} \right) (\exp(\lambda_1 * t) - 1) + \left(\frac{X_2}{\lambda_2} \right) (\exp(\lambda_2 * t) - 1) \right] \quad (5.10)$$

$$[F_C]_t = k_{CF} k_{TER} \left[\frac{X_1}{(\lambda_1 + k_{CF} + k_{CD})} \left(\frac{\exp(\lambda_1 * t) - 1}{\lambda_1} + \frac{\exp(-(k_{CF} + k_{CD}) * t) - 1}{k_{CF} + k_{CD}} \right) + \frac{X_2}{(\lambda_2 + k_{CF} + k_{CD})} \left(\frac{\exp(\lambda_2 * t) - 1}{\lambda_2} + \frac{\exp(-(k_{CF} + k_{CD}) * t) - 1}{k_{CF} + k_{CD}} \right) \right] \quad (5.11)$$

Utilizando estas ecuaciones, se simuló primero la dinámica del estado excitado de los BODIPY precursores BB y BN, buscando reproducir los valores experimentales de su rendimiento y tiempo de vida de fluorescencia, como se encuentran presentados el Anexo 1. Los valores obtenidos para las constantes cinéticas k_{BF} , k_{BD} , k_{CT} , k_{CTR} y k_{CTD} se utilizaron como punto de partida para la simulación de los sensores BBIR y BNIR. Para éstas se cuenta también con los valores obtenidos para el rendimiento y tiempo de vida de fluorescencia para el fragmento cianina, con lo cual se pueden obtener valores para las constantes cinéticas k_{CD} y k_{CF} .

La hipótesis del proyecto se basa en que los cambios observados en la fluorescencia de la molécula se dan por el efecto de la polaridad en las constantes cinéticas de formación y decaimiento de los estados de transferencia de carga del BODIPY (k_{CT} , k_{CTR} , k_{CTD}) y la cianina (k_{CD}). Por ello se buscó reproducir los valores experimentales obtenidos de rendimiento de fluorescencia y tiempo de vida de las moléculas BBIR y BNIR la serie de alcoholes cambiando sólo las constantes mencionadas.

Tomando en cuenta las consideraciones del párrafo anterior y utilizando las ecuaciones cinéticas derivadas del modelo cinético propuesto, se simuló la dinámica del estado excitado de las moléculas BBIR y BNIR. En éstas se demostró que es posible reproducir los valores experimentales del rendimiento y el tiempo de fluorescencia

obtenidos en las secciones anteriores con una alta precisión, debido al número de grados de libertad del modelo (las constantes cinéticas) y el número de parámetros ajustados. La comparación entre los valores buscados y los obtenidos de las simulaciones se encuentra en el Apéndice 3. Es importante destacar que estas simulaciones nos permitieron además analizar el cambio en los rendimientos y tiempos de vida de fluorescencia a cambios arbitrarios en las constantes cinéticas, lo que será útil en la optimización de los sensores. En la tabla 5.1 se muestran los valores encontrados para las constantes involucradas en la dinámica de la formación de estados de transferencia de carga y también para la transferencia de energía entre los cromóforos, centrales en el comportamiento de los sensores.

Tabla 5.1. Constantes cinéticas calculadas con la simulación de la dinámica del estado excitado de los BODIPY precursores BB y BN, así como de los sensores BBIR y BNIR, en metanol y butanol.

Molécula	Disolvente	k_{CT} [s^{-1}]	k_{CTR} [s^{-1}]	k_{CD} [s^{-1}]	k_{RET} [s^{-1}]
BB	Metanol	3.96×10^{10}	2.84×10^{10}	6.39×10^9	-
	Butanol	3.96×10^{10}	1.35×10^{11}	9.38×10^9	-
BN	Metanol	3.16×10^{11}	2.84×10^{10}	4.3×10^{10}	-
	Butanol	3.16×10^{11}	2.84×10^{10}	2.5×10^{10}	-
BBIR	Metanol	4.5×10^{11}	2.93×10^9	1.10×10^{10}	5.45×10^{10}
	Butanol	4.5×10^{11}	5.23×10^9	1.49×10^9	5.45×10^{10}
BNIR	Metanol	3.85×10^{11}	2.5×10^9	4.3×10^{10}	5.45×10^{10}
	Butanol	3.85×10^{11}	5×10^9	1.5×10^9	5.45×10^{10}

La razón principal por la que se eligió sintetizar la molécula BNIR fue para comparar las diferencias en el comportamiento de los sensores en función de cambios en el donador de electrones involucrado en la formación de estados de transferencia de carga. Por ejemplo, hay una notoria diferencia en el rendimiento de fluorescencia de ambos BODIPY precursores (0.017 para BB and <0.001 para BN en metanol). Esto puede explicarse teniendo en cuenta que el naftilo debe ser un mejor donador de electrones que el fenilo, por lo que la formación de los estados de transferencia de carga debe estar más favorecida en el caso de la molécula BN, y por tanto presenta un menor rendimiento de fluorescencia. Este comportamiento también puede observarse en los resultados de las simulaciones, en las diferencias en la constante de formación del estado de transferencia de carga k_{CT} entre BB y BN. Sin embargo, el comportamiento de los dos fragmentos BODIPY es muy similar cuando se encuentran unidos a la cianina, como se pudo observar en los experimentos de espectroscopia estática y resuelta en tiempo, y que se confirma con los resultados de las simulaciones. También es importante mencionar que el análisis simultáneo de ambas moléculas fue muy útil durante el desarrollo y análisis del modelo cinético, gracias a que se podía comparar los cambios que ambas moléculas presentaban.

Utilizando los resultados de las simulaciones, se puede graficar la concentración relativa de cada uno de los estados excitados involucrados en el funcionamiento de los sensores, así como la emisión de los dos cromóforos. A tiempo cero, todas las moléculas de encuentran en el estado excitado localizado en el BODIPY B^* , cuya concentración relativa es entonces de uno. Conforme el sistema evoluciona, la población de este estado disminuye conforme se forman los estados de transferencia de carga B^{CT} y el estado excitado localizado en la cianina C^* . La concentración relativa final de la emisión es el número de fotones emitidos en función de la concentración inicial del estado excitado localizado en el BODIPY, en otras palabras, el rendimiento de fluorescencia de ambos fragmentos tras la excitación selectiva del BODIPY.

La simulación de la dinámica del estado excitado de la molécula BBIR se muestra en la Figura 5.17, en donde se pueden comparar los resultados en metanol y butanol. La constante de decaimiento del estado B^{CT} disminuye con la polaridad del disolvente, por lo

que el tiempo de vida de los estados B^{CT} y B^* es mayor en butanol. El aumento en la población de B^* se debe al equilibrio que existe entre éste y el estado B^{CT} . ésto se refleja en un aumento del rendimiento de la transferencia de energía entre los cromóforos, como puede apreciarse en la concentración relativa máxima del estado C^* . La emisión de la cianina presenta además cambios en su constante de decaimiento k_{CD} , dando como resultado la doble dependencia de la emisión de la cianina F_C a la polaridad del medio, que da a los sensores sintetizados un aumento en la sensibilidad a cambios en su medio.

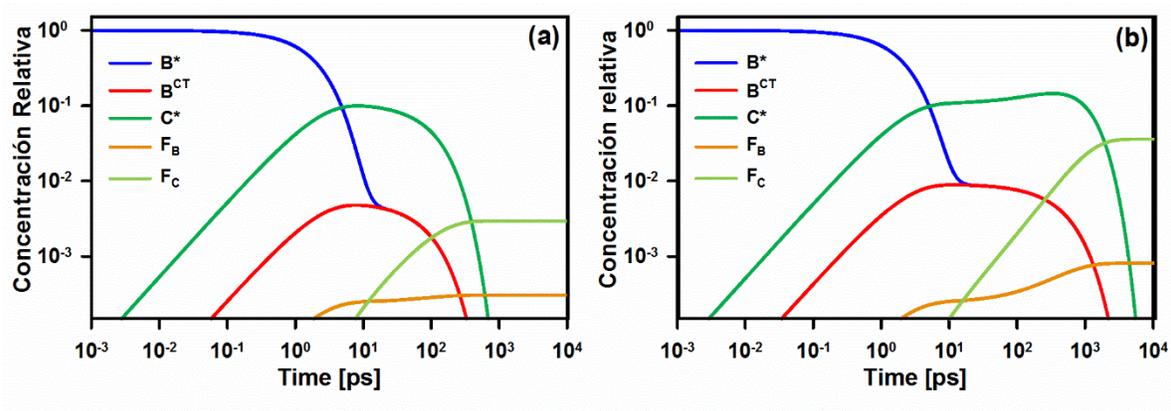


Fig. 5.17. Simulación de la dinámica del estado excitado de BBIR en metanol (izq.) y butanol (der.).

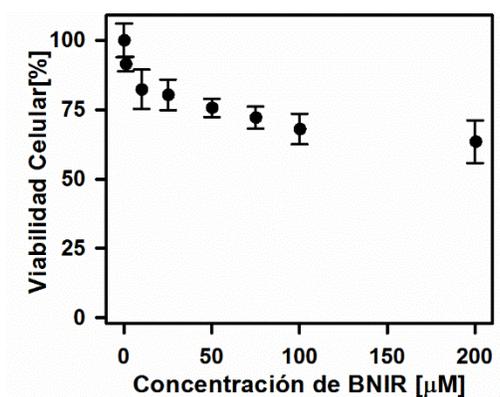
Las simulaciones muestran que el esquema planteado de la dinámica del estado excitado puede reproducir los valores experimentales obtenidos para las moléculas sintetizadas. Este esquema permite explicar el funcionamiento de los sensores sintetizados y analizar los cambios en el rendimiento y el tiempo de vida del estado excitado de las moléculas en función del cambio en las constantes cinéticas en medios de diferente polaridad. De especial importancia es la capacidad de analizar el aumento en la sensibilidad de las moléculas a su medio local en función de la competencia cinética entre los procesos fotofísicos de la molécula, lo que además puede ser utilizado para el diseño de otros sensores que incorporen este comportamiento

Una vez que se demostró y se entiende el comportamiento de estos sensores, el siguiente paso es demostrar su uso en la formación de imágenes de medios biológicos.

5.4 Microscopía en Células Vivas

Tras confirmar que las moléculas sintetizadas son sensibles a cambios en su ambiente utilizado medios bien caracterizados (disolventes puros), se buscó demostrar el uso de los sensores en células. En este contexto, se plantea que los sensores puedan reportar cambios entre organelos y subestructuras celulares, o en células bajo diferentes condiciones, como bajo el tratamiento con medicamentos. Las mediciones basadas en la relación de intensidad de emisión aseguran que las diferencias observadas se deban a cambios en el ambiente local de las moléculas y no a la distribución heterogénea del sensor en organelos y diferentes células.

Se trataron células de cáncer de pulmón SK-LU1 con BNIR, utilizando el método descrito en el capítulo 4. Las imágenes obtenidas con el microscopio confocal demuestran que los sensores son capaces de entrar en las células para teñirlas. Una vez comprobado esto, se llevó a cabo el ensayo de viabilidad celular para medir la toxicidad de los sensores. Los resultados se presentan en la Figura 5.18, en donde se observa que el valor de IC_{50} de la molécula BNIR es mayor a las concentraciones utilizados en el experimento, y más importante aún, mayores que la concentración utilizada para marcar las células para la formación de imágenes (25 y 100 μM), indicando que puede ser utilizada en células vivas.



Figuras 5.18. Ensayo de viabilidad de células SK-LU-1 marcadas con BNIR.

En la Figura 5.19 se pueden observar las imágenes obtenidas de las células teñidas con BNIR en diferentes condiciones. La fluorescencia de la molécula BNIR muestra que la molécula se distribuye en toda la célula. Sin embargo, varios lugares en las células muestran una mayor intensidad de emisión. Esto indica una acumulación preferencial de la molécula en organelos o estructuras específicos (por ejemplo, vesículas o lisosomas). Sin embargo, el resultado importante es que existe una diferencia significativa entre estos puntos de mayor emisión y el resto de la célula al comparar la emisión del BODIPY y de la cianina. La relación entre la intensidad de la emisión de la cianina y el BODIPY (I_C/I_B) en estos puntos es mucho menor que en el resto de la célula, como puede verse en la columna de la derecha de la Figura 5.19. Esto indica que hay cambio importante en el ambiente local de los sensores entre estos puntos de mayor intensidad, y demuestra que la molécula es capaz de reportar estas diferencias en células vivas. Tomando en cuenta el bajo valor de I_C/I_B , es muy probable que la molécula se encuentra en un ambiente más polar comparado al resto de la célula.

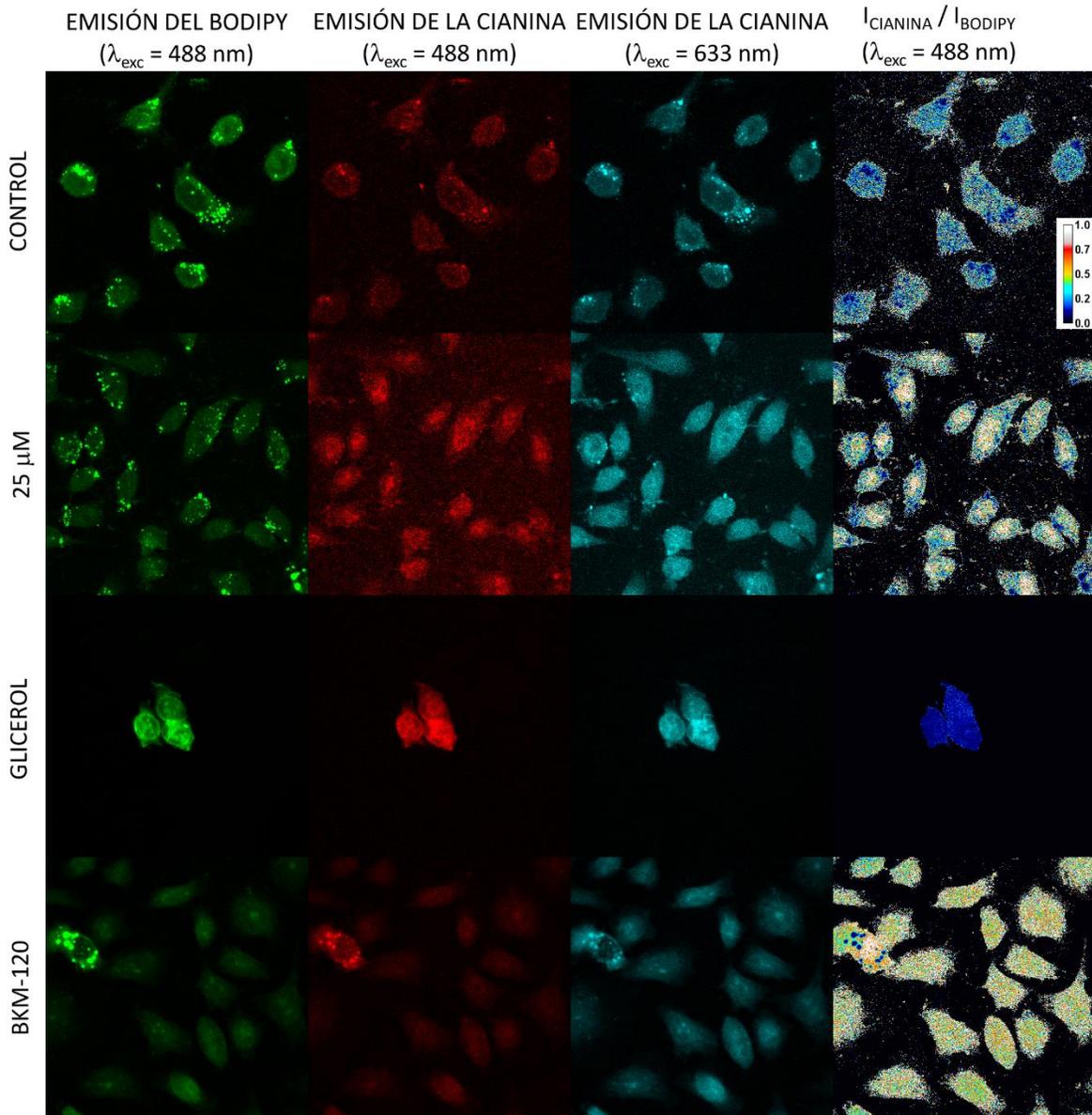


Figura 5.19. Imágenes de células SK-LU-1 teñidas con la molécula BNIR y obtenidas con un microscopio confocal. Las imágenes se muestran en pseudocolor.

Para analizar el efecto de la concentración de los sensores en la tinción de la célula, se realizaron experimentos con soluciones 4 veces más diluidas de BNIR. Entre las células teñidas con una solución 100 μM de BNIR (células control) y las marcadas con la solución 25 μM no se nota un cambio en la distribución de las moléculas en las células, o en la relación de intensidades (I_C/I_B). La única diferencia es una mayor intensidad de emisión en las células control (comparando los histogramas de intensidad de emisión), indicando una mayor cantidad de moléculas dentro de las células por la mayor concentración.

Para complementar los datos obtenidos, se realizaron experimentos con dos agentes externos para inducir cambios en las células y comprobar que los sensores sean capaces de reportar estos cambios en su medio local. El glicerol es capaz de penetrar la membrana celular y es utilizado como agente protector al congelar células,^[40] y fue utilizado para producir cambios en el citoplasma de las células. También se utilizó el fármaco BKM-7 (inhibidor de la fosfatidil-inositol 3-quinasa), un inductor de apoptosis celular.^[41]

La morfología de las células tratadas con glicerol es muy diferente a las células control, Figura 5.20. Las células se ven hinchadas y más redondas, lo que se puede explicar por la presencia de glicerol en el citosol. La fluorescencia del BODIPY y la cianina indica que en las células tratadas con glicerol las moléculas se distribuyen de manera heterogénea en las células. Sin embargo, no se observan los puntos de alta intensidad de emisión presentes en las células control. Es importante notar que la relación I_C/I_B es homogénea en estas células. Esto indica que la estructura observada en la emisión se debe sólo a la concentración de los sensores y no a diferencias en el ambiente local de los sensores, como se ve en las células control. Este es un claro ejemplo del uso de las medidas por relación de emisión para distinguir entre estas dos fuentes de cambio en la intensidad de la emisión.

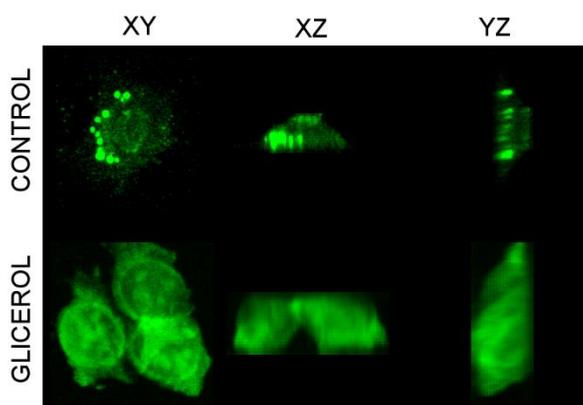


Figura 5.20. Planos XY, XZ y YZ de una célula de la muestra control (distancia entre planos de 0.4 μm) comparada con células de la muestra tratado con glicerol (distancia entre planos de 0.59 μm)

Los experimentos utilizando el fármaco BKM-120 se realizaron para analizar el comportamiento de los sensores en células apoptóticas. Las muestras tratadas con BKM-120 mostraban una menor densidad de células tras 24 horas de incubación con el fármaco. La mayoría de las células observadas con el microscopio en las muestras se encontraban aisladas, pero se podían observar dos tipos de células: unas similares a las células control y otras sin la presencia de los puntos de alta intensidad de emisión. La imagen mostrada en la Figura 5.19 se eligió debido a que muestra ambos tipos de células. La célula más brillante es análoga a las células control. El resto de las células presentan una menor intensidad de emisión, indicando una menor concentración de sensores en su interior, y la relación de intensidad de emisión I_C/I_B presenta una distribución homogénea a pesar de la estructura observada en la emisión del BODIPY y la cianina, indicando que no hay cambios en el ambiente de los sensores en estas células. Adicionalmente, las células con baja fluorescencia estaban separadas del portaobjetos (no se encontraban en el mismo plano en el eje vertical que la célula más fluorescente, Figura 5.21). Estos cambios pueden deberse a la inducción de apoptosis del fármaco BKM-120.^[42] Sin embargo, el resultado más relevante es que los sensores pueden reportar diferencias en las células debido a cambios en su ambiente local, demostrando su uso potencial en microscopía con células vivas.

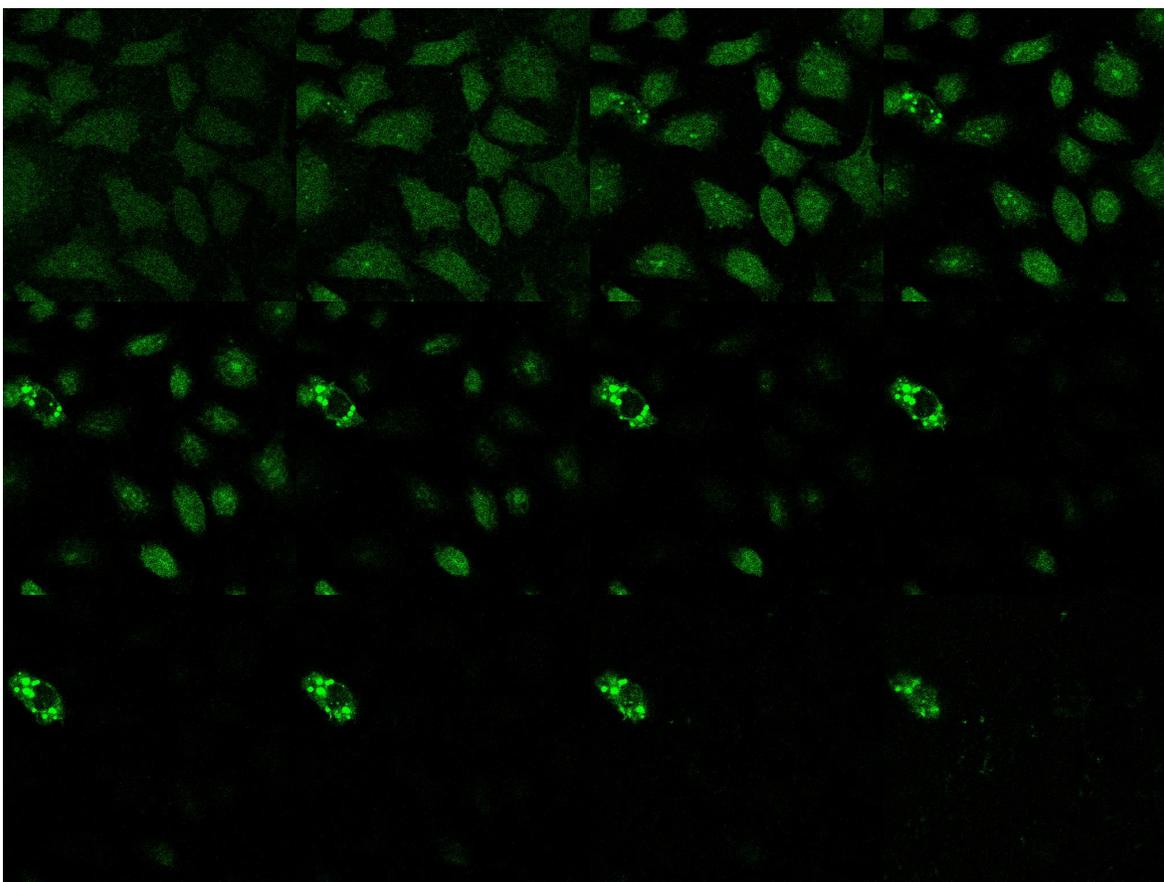


Figura 5.21. Diferentes planos en z de una muestra de células tratadas con BKM-120. Los planos mostrados se encuentran separados $0.8 \mu\text{m}$.

La diferencia en la escala utilizada para la relación en la intensidad de emisión de los sensores entre los experimentos en el fluorímetro y las imágenes obtenidas del microscopio proviene de dos fuentes. Primero, se debe tener en cuenta que los valores en los disolventes puros no representan todo el intervalo posible de valores de la relación de intensidad de emisión, y es posible que se obtengan valores distintos en otros medios, sobre todo medios tan complejos e heterogéneos como lo son las células vivas. En segundo lugar, la diferencia en la sensibilidad de los dos instrumentos en los intervalos de detección (500 y 800 nm). Este último factor puede ser analizado utilizando la misma muestra en ambos instrumentos y comparando los resultados de ambas mediciones, como se puede apreciar en el Apéndice 5. A manera de resumen, se encontró que los valores obtenidos en el microscopio confocal son 2.48 ± 0.18 veces más pequeños que los valores medidos en el fluorímetro. Utilizando este factor de corrección para escalar los

valores medidos en el microscopio, es posible comparar los valores obtenidos en ambos instrumentos.

Las imágenes obtenidas de células vivas y su análisis demuestran que las moléculas BBIR y BNIR pueden reportar diferencias en su ambiente local en medios heterogéneos y que pueden ser herramientas útiles para el estudio de medios biológicos.

6.1 Conclusiones

Las dos moléculas sintetizadas, BBIR y BNIR, muestran cambios en su fluorescencia en función de la polaridad del medio. Ambas pueden medir esta propiedad debido a la formación de estados de transferencia de carga entre un fragmento aromático, que funciona como donador de electrones y cada uno de los cromóforos que constituyen a los sensores. La sensibilidad de las moléculas diseñadas se amplifica por la doble dependencia de la emisión de la cianina con la polaridad cuando se excita selectivamente al fragmento BODIPY: primero en el rendimiento de la transferencia de energía entre los cromóforos y después en el rendimiento de emisión de la cianina.

Las moléculas presentan dos bandas de emisión de fluorescencia, correspondientes a cada uno de los cromóforos que las componen. La relación de intensidad de emisión entre estas dos bandas varía con la polaridad del medio, y muestra una buena correlación con el cambio en el rendimiento de emisión del fragmento cianina tras la excitación del BODIPY. Esto implica que la mediación de esta relación de intensidades puede utilizarse para medir cambios en la polaridad del medio local de los sensores, dando como resultado mediciones que no dependen de la concentración de los mismos en la muestra. La separación de las bandas de emisión de ≈ 280 nm es una de las más grandes reportadas,^{[43],[44]} lo que permite aislar las señales de manera inequívoca y mejora la detección de la señal. Esto es especialmente importante en microscopía, donde suele existir una selección de filtros para la detección de fluorescencia.

También se demostró que existe una buena correlación entre los cambios en el tiempo de vida de fluorescencia del fragmento cianina en medios de distinta polaridad, por lo que la molécula también podría ser utilizada en técnicas de medición de tiempo de fluorescencia, que también son independientes de la concentración de los sensores.

Las propiedades ópticas de las moléculas sintetizadas presentan beneficios adicionales. La excitación de los sensores se realiza con luz visible (480-500 nm), la cual es menos dañina que la luz UV utilizada en otros sensores. Además, las bandas de emisión de

fluorescencia (500-570 nm y 700-900 nm) se encuentran lejos de la región de emisión de la fluorescencia de las células, dando una mejor relación señal a ruido en microscopía.

El modelo cinético propuesto a partir de los datos experimentales obtenidos permite explicar el funcionamiento de los sensores sintetizados. La simulación de la dinámica del estado excitado de las moléculas sintetizadas demuestra que el modelo planteado es capaz de reproducir los rendimientos y tiempo de vida de fluorescencia de las moléculas como función de los cambios en la dinámica de los estados de transferencia de carga en función de la polaridad de los disolventes. Este modelo es importante para entender el funcionamiento de las moléculas y servirá como herramienta para el futuro diseño y desarrollo de otros sensores moleculares.

Los experimentos de microscopía realizados confirman que los sensores son capaces de teñir células vivas y reportar cambios en la polaridad local entre distintas estructuras celulares. También se demostró que la detección de la relación de intensidad de emisión de las dos bandas de emisión de los sensores permite distinguir cambios en medios heterogéneos debido a que las medidas son independientes de la concentración de los cromóforos en cada punto de la muestra.

Referencias

- [1] Z. Yang, J. Cao, Y. He, J. H. Yang, T. Kim, X. Peng, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4563-4601.
- [2] H. R. Petty, *Microsc. Res. Tech.* **2007**, *70*, 687-709.
- [3] J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 906-918.
- [4] T. Ueno, T. Nagano, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 642-645.
- [5] K. Suhling, P. M. W. French, D. Phillips, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 13-22.
- [6] M. A. Haidekker, T. P. Brady, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 398-399.
- [7] A. Pietraszewska-Bogiel, T. W. J. Gadella, *J. Microsc.* **2011**, *241*, 111-118.
- [8] H. Sunahara, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5597-5604.
- [9] M. Cardamone, N. K. Puri, *Biochem. J.* **1992**, *282*, 589.
- [10] J. Jiang, X. Tian, C. Xu, S. Wang, Y. Feng, M. Chen, H. Yu, M. Zhu, X. Meng, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 3645-3648.
- [11] H. Zhu, J. Fan, H. Mu, T. Zhu, Z. Zhang, J. Du, X. Peng, *Sci. Rep.* **2016**, *6*:35627, 1-10.
- [12] Y.-D. Zhuang, P.-Y. Chiang, C.-W. Wang, K.-T. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8124-8128.
- [13] H. Xiao, P. Li, W. Zhang, B. Tang, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 1588-1593.
- [14] A. D. McNaught, A. Wilkinson, *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd Ed.*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1997**.
- [15] E. M. Kosower, *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 259-266.
- [16] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3899-4032.
- [17] S. Hattori, K. Ohkubo, Y. Urano, H. Sunahara, T. Nagano, Y. Wada, N. V. Tkachenko, H. Lemmetyinen, S. Fukuzumi, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 15368-15375.
- [18] M. T. Whited, N. M. Patel, S. T. Roberts, K. Allen, P. I. Djurovich, S. E. Bradforth, M. E. Thompson, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 284-286.

- [19] B. Ozmen, E. U. Akkaya, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9185-9188.
- [20] F. Song, X. Peng, E. Lu, Y. Wang, W. Zhou, J. Fan, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4817-4820.
- [21] A. Requena, J. Zúñiga, *Espectroscopía*, Pearson Prentice Hall, Madrid, **2004**.
- [22] M. Klessinger, J. Michl, *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*, VCH Publishers, USA, **1995**.
- [23] J. R. Lacowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third ed., Springer, New York, **2006**.
- [24] W. W. Parson, *Modern Optical Spectroscopy: With Exercises and Examples from Biophysics and Biochemistry*, Springer, **2007**.
- [25] R. Ghosh, A. Nandi, D. K. Palit, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 7661-7671.
- [26] H. Chong, E. Fron, Z. Liu, S. Boodts, J. Thomas, J. N. Harvey, J. Hofkens, W. Dehaen, M. Van der Auweraer, M. Smet, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 4687-4699.
- [27] S. Saini, H. Singh, B. Bagchi, *J Chem Sci* **2006**, *118*, 23-35.
- [28] D. L. Dexter, *The Journal of Chemical Physics* **1953**, *21*, 836-850.
- [29] J. Rodríguez-Romero, C. A. Guarín, A. Arroyo-Pieck, L. Gutiérrez-Arzaluz, R. López-Arteaga, F. Cortés-Guzmán, P. Navarro, J. Peon, *ChemPhotoChem* **2017**, *1*, 397-407.
- [30] M. Mortimer, P. Taylor, R. S. o. Chemistry, O. University, *Chemical Kinetics and Mechanism*, Royal Society of Chemistry, **2002**.
- [31] D. O'Connor, *Time-correlated single photon counting*, Elsevier Science, **1984**.
- [32] P.-A. Bouit, F. Spänig, G. Kuzmanich, E. Krokos, C. Oelsner, M. A. Garcia-Garibay, J. L. Delgado, N. Martín, D. M. Guldi, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9638-9645.
- [33] E. Zhang, S. Luo, X. Tan, C. Shi, *Biomaterials* **2014**, *35*, 771-778.
- [34] T. Yamane, K. Hanaoka, Y. Muramatsu, K. Tamura, Y. Adachi, Y. Miyashita, Y. Hirata, T. Nagano, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2227-2236.
- [35] M. Kollmannsberger, K. Rurack, U. Resch-Genger, J. Daub, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 10211-10220.
- [36] D. Magde, R. Wong, P. G. Seybold, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 327-334.
- [37] G. Chapman, M. Henary, G. Patonay, *Anal. Chem. Insights* **2011**, *6*, 29-36.

- [38] R. Chib, S. Shah, Z. Gryczynski, R. Fudala, J. Borejdo, B. Zelent, M. G. Corradini, R. D. Ludescher, I. Gryczynski, *Meas. Sci. Technol.* **2016**, *27*, 1-6.
- [39] S. Raut, J. Kimball, R. Fudala, H. Doan, B. Maliwal, N. Sabnis, A. Lacko, I. Gryczynski, S. V. Dzyuba, Z. Gryczynski, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 27037-27042.
- [40] J. E. Lovelock, *Biochem. J.* **1954**, *56*, 265-270.
- [41] M. T. Burger, S. Pecchi, A. Wagman, Z.-J. Ni, M. Knapp, T. Hendrickson, G. Atallah, K. Pfister, Y. Zhang, S. Bartulis, K. Frazier, S. Ng, A. Smith, J. Verhagen, J. Haznedar, K. Huh, E. Iwanowicz, X. Xin, D. Menezes, H. Merritt, I. Lee, M. Wiesmann, S. Kaufman, K. Crawford, M. Chin, D. Bussiere, K. Shoemaker, I. Zaror, S.-M. Maira, C. F. Voliva, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 774-779.
- [42] M.-C. Speranza, M. O. Nowicki, P. Behera, C.-F. Cho, E. A. Chiocca, S. E. Lawler, *Sci. Rep.* **2016**, *6*:20189, 1-9.
- [43] 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, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9181-9185.
- [44] N. Jiang, J. Fan, F. Xu, X. Peng, H. Mu, J. Wang, X. Xiong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2510-2514.

Apéndice 1: Caracterización de las Moléculas.

Datos de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa para los BODIPY precursores BB y BN:

5,5-difluoro-10-(4-hydroxyphenyl)-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide (BB). ^1H NMR (300 MHz, Acetona-d₆) δ 7.97 (s, 2H), 7.59 (d, 2H), 7.09 (m, 4H), 6.65 ppm (d, J = 8.8 Hz 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, Acetona-d₆) δ 161.6, 148.92, 144.1, 135.5, 133.8, 132.2, 125.9, 119.2, 116.6 ppm. HRMS (ESI⁺): *m/z* calculada para C₁₅H₁₁BF₂N₂O⁺: 284.09325, encontrada: 284.09406.

5,5-difluoro-10-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide (BN). ^1H NMR (300 MHz, Acetona-d₆) δ 8.19 (s, 1H), 8.05 – 7.98 (m, 3H), 7.92 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.70 (dd, J = 8.5, 1.9 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.30 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 6.68 ppm (d, J = 4.3 Hz, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, Acetona-d₆) δ 158.2, 144.6, 137.2, 135.8, 132.6, 132.1, 131.8, 129.2, 128.8, 128.5, 127.4, 120.6, 119.5, 109.8 ppm. HRMS (ESI⁺): *m/z* calculada para C₁₉H₁₃BF₂N₂O⁺: 334.10890, encontrada: 334.11006.

Datos de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa para los sensores BBIR y BNIR:

10-(4-(((E)-2-((E)-2-(3,3-dimethyl-1-propyl-3H-indol-1-ium-2-yl)vinyl)-6-((E)-2-(3,3-dimethyl-1-propylindolin-2-ylidene)ethylidene)cyclohex-1-en-1-yl)oxy)phenyl)-5,5-difluoro-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide iodide (BBIR). ^1H NMR (300 MHz, Cloroformo-d) δ 7.91 (s, 2H), 7.86 (d, J = 14.2 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.36 (td, J = 7.4, 1.4 Hz, 2H), 7.33 – 7.14 (m, 6H), 7.12 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.82 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 6.54 (dd, J = 4.3, 1.9 Hz, 2H), 6.20 (d, J = 14.2 Hz, 2H), 4.14 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 2.83 (t, J = 6.1 Hz, 4H), 2.11 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 1.90 (h, J = 7.2, 6.8 Hz, 4H), 1.39 (s, 12H), 1.06 ppm (t, J =

7.4 Hz, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, Cloroformo-d) δ 172.0, 162.7, 161.6, 144, 142.3, 141.4, 140.9, 134.76, 133.1, 130.9, 128.8, 128.0, 125.3, 122.2, 122.0, 118.8, 115.1, 111, 100.7, 100, 49.1, 47, 28, 24.7, 22.7, 20.9, 11.7 ppm. HRMS (ESI⁺): m/z calculada para $\text{C}_{51}\text{H}_{54}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}^+$: 787.43533, encontrada: 787.43699.

10-(6-(((E)-2-((E)-2-(3,3-dimethyl-1-propyl-3H-indol-1-ium-2-yl)vinyl)-6-((E)-2-(3,3-dimethyl-1-propylindolin-2-ylidene)ethylidene)cyclohex-1-en-1-yl)oxy)naphthalen-2-yl)-5,5-difluoro-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide iodide (**BNIR**). ^1H NMR (300 MHz, Cloroformo-d) δ 8.06 – 7.91 (m, 7H), 7.66 (dd, J = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.57 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.33 (td, J = 7.6, 1.5 Hz, 2H), 7.26 – 7.04 (m, 6H), 6.93 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 6.55 (dd, J = 4.2, 1.9 Hz, 2H), 6.18 (d, J = 14.2 Hz, 2H), 4.11 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 2.86 (t, J = 6.1 Hz, 4H), 2.15 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.88 (h, 4H), 1.30 (s, 12H), 1.05 ppm (t, J = 7.4 Hz, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, Cloroformo-d) δ 172.0, 163.6, 159.0, 147.2, 144, 142.3, 141.7, 141, 135.6, 135.0, 131.7, 131.7, 130.7, 130.2, 128.8, 128.6, 127.7, 125.2, 122.4, 122.2, 118.7, 118.1, 110.9, 109.7, 100.6, 99.9, 49.0, 46.3, 28, 24.8, 21.2, 20.9, 11.8 ppm. HRMS (ESI⁺): m/z calculada para $\text{C}_{55}\text{H}_{56}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}^+$: 837.45098, encontrada: 837.45457.

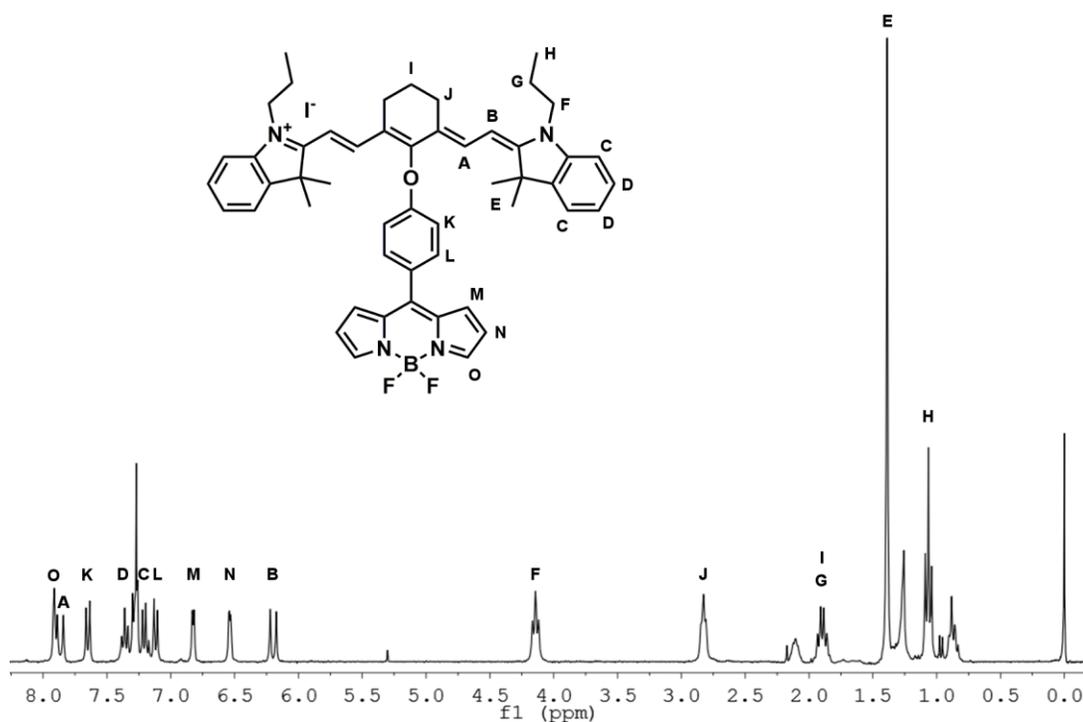


Figura A1.1. Espectro de ^1H NMR (300 MHz, Cloroformo-d) de la molécula BBIR.

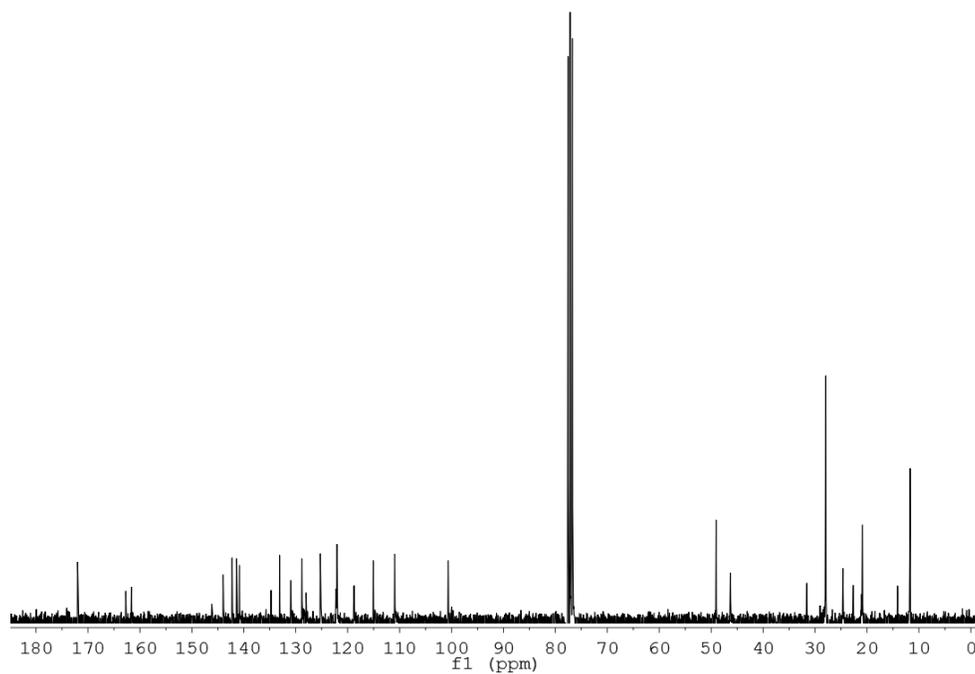


Figura A1.2. Espectro de ^{13}C NMR (75 MHz, Cloroformo-d) de la molécula BBIR.

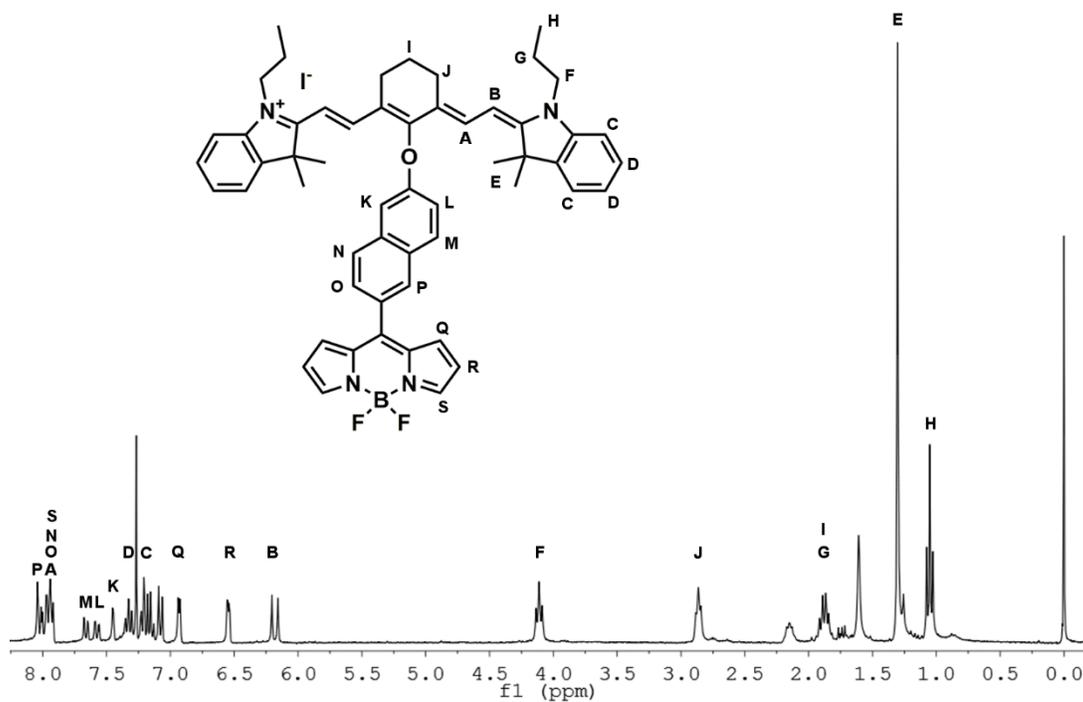


Figura A1.3. Espectro de ^1H NMR (300 MHz, Cloroformo-d) de la molécula BNIR.

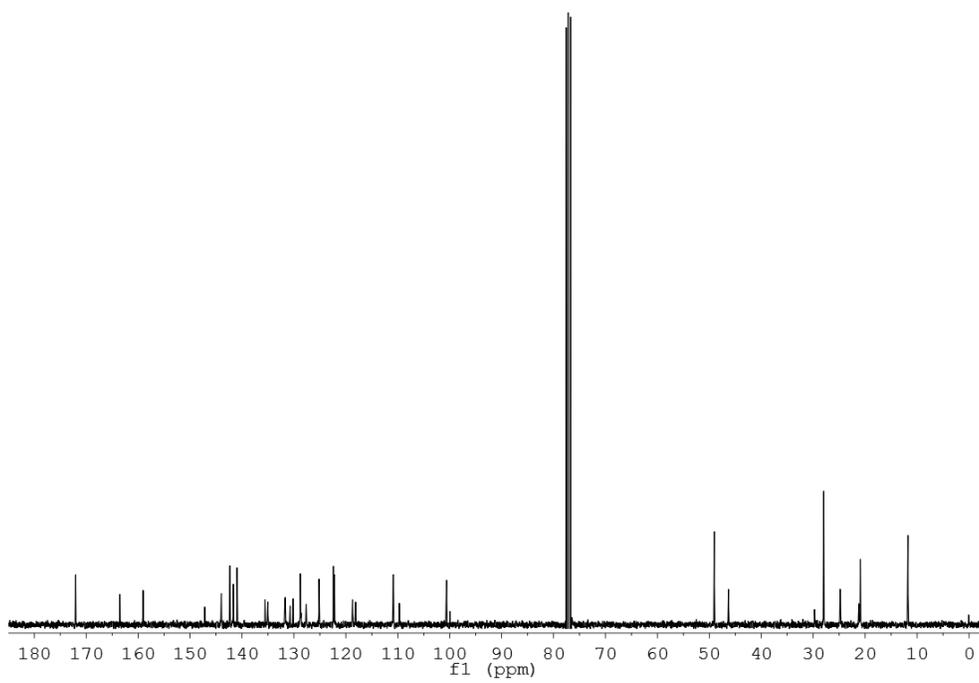


Figura A1.4. Espectro de ^{13}C NMR (75 MHz, Cloroformo-d) de la molécula BNIR.

Apéndice 2: Datos Experimentales de los BODIPY Precursores BB y BN.

El espectro de absorción de los BODIPY precursores BB y BN se midieron en metanol y butanol, en las mismas condiciones mencionadas en la metodología., así como el rendimiento de fluorescencia en ambos disolventes.

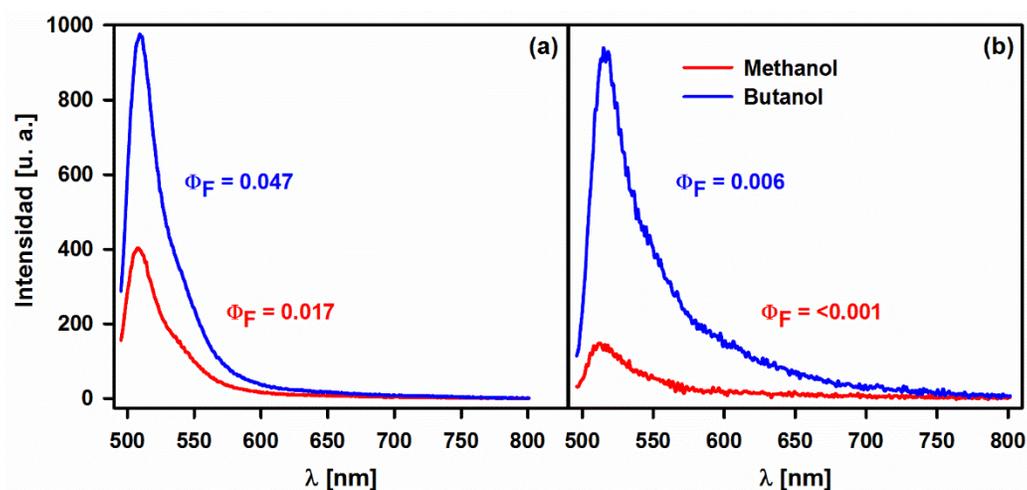


Figura A2.1. Espectros de emisión de BB (a) y BN (b) en metanol y butanol ($\lambda_{ex} = 485$ nm).

Se realizaron experimentos con técnicas de espectroscopia resuelta en tiempo para ambas moléculas, utilizando la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados en tiempo (TCSPC). En ambos casos, el decaimiento fue muy similar a la función de respuesta del equipo. En el caso de la molécula BN sólo podemos decir que el tiempo de decaimiento es menor a 50 ps.

Para el caso de la molécula BB, el primer tiempo también se encuentra por debajo de la resolución del equipo, menor a 50 ps, mientras que el segundo tiempo pudo ser medido en metanol y butanol y es sensible a cambios en el disolvente. En metanol, este tiempo fue de 271 ps, mientras que en butanol fue de 465 ps

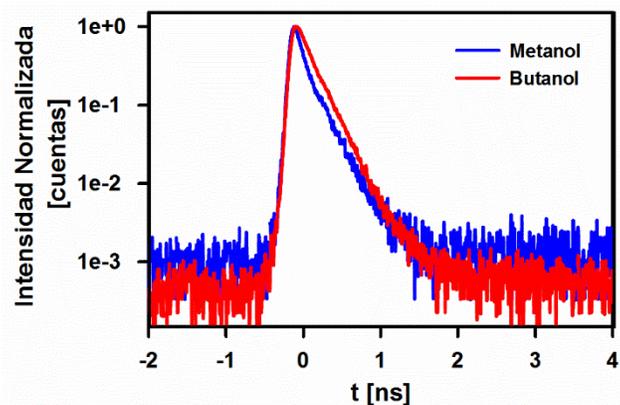


Figura A2.2. Decaimiento de la fluorescencia de BB en metanol y butanol ($\lambda_{ex} = 485$ nm) y detectando a 520 nm.

La emisión del BODIPY BB también se analizó con la técnica de suma de frecuencias para analizar el tiempo corto del decaimiento de su fluorescencia. La instrumentación de esta técnica ya ha sido descrita previamente.^[29] De manera breve, se utiliza un oscilador de titanio zafiro, cuya emisión es amplificada en un amplificador regenerativo para obtener pulsos láser de aprox. 80 fs de duración, 600 mW de potencia promedio, una longitud de onda central de 800 nm y una frecuencia de repetición de 1kHz. Este haz se divide en dos, el haz de bombeo y el haz de prueba. El haz de bombeo pasa por un cristal de óptica no lineal para generar pulsos de 400 nm, con los que se excita a la muestra. La fluorescencia de la muestra se colecta con un espejo parabólico y se enfoca en otro cristal de óptica no lineal. El haz de prueba pasa por una etapa de retraso y se enfoca al mismo cristal que la fluorescencia, en donde se forma un tercer haz por el fenómeno de suma de frecuencias. Al analizar el cambio en la intensidad de este último haz en función del retraso del haz de prueba se puede medir el tiempo de decaimiento de la fluorescencia de la muestra.

Utilizando esta técnica, se puede observar el decaimiento biexponencial de la fluorescencia del BODIPY BB. El tiempo largo es prácticamente el mismo al medido por la técnica anterior, 275 ps. La diferencia es que el tiempo corto puede ser ajustado con esta técnica, dando un tiempo de decaimiento de 12ps.

Como se había mencionado antes, este comportamiento se ha visto en otros BODIPY y resulta del equilibrio entre el estado localmente excitado y el estado de transferencia de

carga en estas moléculas. El tiempo corto observado para el BODIPY BB es similar al medido para otros BODIPY, del orden de 10 ps^[26].

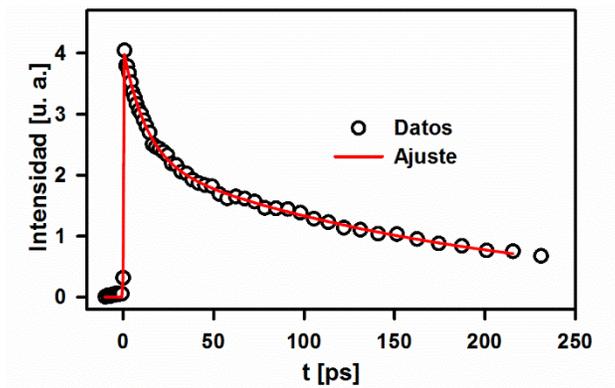


Figura A2.3. Decaimiento de la fluorescencia de BB en metanol ($\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm) y detectando a 500 nm.

Apéndice 3: Integración por Matrices de Ecuaciones Cinéticas.

En esta sección se presenta un resumen del procedimiento para la integración del sistema de ecuaciones diferenciales por matrices de las ecuaciones 5.2 y 5.3. Para esto se consideró el siguiente sistema de dos estados en equilibrio:

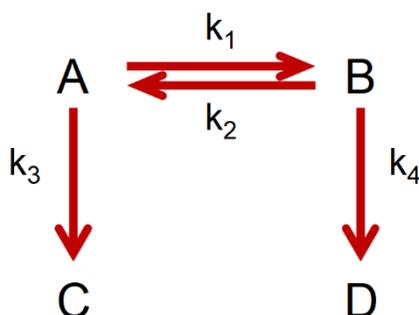


Figura 5.16. Esquema simplificado de un sistema modelo de dos estados en equilibrio.

A partir de este sistema, se obtienen las dos siguientes ecuaciones cinéticas:

$$\begin{aligned}\frac{dA}{dt} &= (-k_1 - k_3)[A] + k_2[B] \\ \frac{dB}{dt} &= k_1[A] + (-k_2 - k_4)[B]\end{aligned}$$

Este sistema de dos ecuaciones se puede escribir en forma matricial como:

$$\begin{bmatrix} [A]' \\ [B]' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -k_1 - k_3 & k_2 \\ k_1 & -k_2 - k_4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} [A] \\ [B] \end{bmatrix}$$

Cuyos eigenvalores (λ) se pueden obtener calculando el siguiente determinante:

$$\det \begin{pmatrix} -k_1 - k_3 - \lambda & k_2 \\ k_1 & -k_2 - k_4 - \lambda \end{pmatrix} = 0$$

El paso anterior da como resultado una ecuación de segundo orden para λ , cuya resolución nos da los dos eigenvalores λ_1 y λ_2 .

$$\lambda^2 + \lambda(k_1 + k_2 + k_3 + k_4) + k_2k_3 + k_3k_4 + k_1k_4 = 0$$

$$\lambda_n = \frac{-(k_1 + k_2 + k_3 + k_4) \pm \sqrt{(k_1 + k_2 + k_3 + k_4)^2 - 4(k_2k_3 + k_3k_4 + k_1k_4)}}{2}$$

Una vez obtenidos estos valores, se obtienen los eigenvectores $\hat{v}_n = \begin{pmatrix} \alpha_n \\ \beta_n \end{pmatrix}$ del sistema para λ_1 y λ_2 .

$$\begin{bmatrix} -k_1 - k_3 & k_2 \\ k_1 & -k_2 - k_4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \alpha_n \\ \beta_n \end{bmatrix} = \lambda_n \begin{bmatrix} \alpha_n \\ \beta_n \end{bmatrix}$$

$$(-k_1 - k_3)\alpha_n + k_2\beta_n = \lambda_n\alpha_n$$

$$k_1\alpha_n + (-k_2 - k_4)\beta_n = \lambda_n\beta_n$$

Para la solución numérica se toma un valor arbitrario de α y se calcula el valor de β , utilizando una de las dos ecuaciones anteriores, para ambos valores de λ .

Una vez obtenidos estos eigenvectores, se escribe la solución general del sistema como:

$$\begin{pmatrix} [A]_t \\ [B]_t \end{pmatrix} = x_1 e^{\lambda_1 t} \hat{v}_1 + x_2 e^{\lambda_2 t} \hat{v}_2 = x_1 e^{\lambda_1 t} \begin{pmatrix} \alpha_1 \\ \beta_1 \end{pmatrix} + x_2 e^{\lambda_2 t} \begin{pmatrix} \alpha_2 \\ \beta_2 \end{pmatrix}$$

$$[A]_t = \alpha_1 x_1 e^{\lambda_1 t} + \alpha_2 x_2 e^{\lambda_2 t}$$

$$[B]_t = \beta_1 x_1 e^{\lambda_1 t} + \beta_2 x_2 e^{\lambda_2 t}$$

Los valores de x_1 y x_2 pueden ser calculados utilizando los valores iniciales del sistema a tiempo cero, los cuales vienen de considerar que todas las moléculas son inicialmente excitadas al estado A, a partir del cual comienza el procesos de desactivación de la molécula a su estado basal ($t = 0$, $[A]_0 = 1$ y $[B]_0 = 0$).

$$[A]_t = \alpha_1 x_1 e^{\lambda_1 t} + \alpha_2 x_2 e^{\lambda_2 t}$$

$$[B]_t = \beta_1 x_1 e^{\lambda_1 t} + \beta_2 x_2 e^{\lambda_2 t}$$

$$1 = \alpha_1 x_1 e^{\lambda_1(0)} + \alpha_2 x_2 e^{\lambda_2(0)}$$

$$0 = \beta_1 x_1 e^{\lambda_1(0)} + \beta_2 x_2 e^{\lambda_2(0)}$$

$$1 = \alpha_1 x_1 + \alpha_2 x_2$$

$$0 = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2$$

$$x_1 = \frac{1 - \alpha_2 x_2}{\alpha_1}$$

$$x_2 = \frac{-\beta_1 x_1}{\beta_2}$$

Utilizando las ecuaciones presentadas en esta sección, se pueden calcular los valores de λ_n , α_n , β_n y x_n para cualquier combinación de valores de las constantes k_1 , k_2 , k_3 y k_4 , resultando en dos ecuaciones biexponenciales que permiten calcular la concentración de las especies A y B a cualquier tiempo.

Apéndice 4: Datos Experimentales Utilizados en las Simulaciones.

Tabla A3.1. Valores experimentales usados en las simulaciones y su valor calculado.

Molécula	Disolvente	$\Phi_{FB}^{[a]}$		$\Phi_{FC490}^{[b]}$		$\Phi_{FC690}^{[c]}$		Φ_{TE}	
		Exp.	Sim.	Exp.	Sim.	Exp.	Sim.	Exp.	Sim.
BBIR	Metanol	< 0.001	0.0003	0.003	0.003	0.022	0.022	0.136	0.136
	Butanol	< 0.001	0.0008	0.036	0.036	0.102	0.102	0.353	0.353
BNIR	Metanol	< 0.001	0.0003	0.005	0.005	0.038	0.038	0.132	0.132
	Butanol	< 0.001	0.0008	0.052	0.052	0.137	0.137	0.380	0.380

[a] Φ_{FB} rendimiento de fluorescencia del fragmento BODIPY. [b] Φ_{FC490} rendimiento de fluorescencia del fragmento cianina al excitar a 490 nm. [c] Φ_{FC690} rendimiento de fluorescencia del fragmento cianina al excitar a 690 nm

Tabla A3.2. Valores experimentales usados en las simulaciones y su valor calculado.

Molécula	Disolvente	Tiempo de decaimiento del fragmento BODIPY (520 nm)				Tiempo de decaimiento del fragmento cianina (>700 nm)	
		Exp.	Sim.	Exp.	Sim.	Exp.	Sim.
BBIR	Metanol	< 50	2	_[a]	89	86	86
	Butanol	< 50	2	490	491	549	549
BNIR	Metanol	< 50	2.9	_[a]	23	212	212
	Butanol	< 50	2.3	488	476	770	770

[a] Amplitud muy baja para ajustarse.

Apéndice 5: Calibración de los Resultados del Microscopio Confocal.

La relación de intensidad de emisión entre la cianina y el BODIPY (I_C/I_B) que se midió en el microscopio confocal no puede ser comparada directamente con la medida en el fluorímetro. Esto se debe a que ambos equipos tienen una diferente sensibilidad en las dos regiones de interés del espectro (500 y 800 nm, para el BODIPY y la cianina respectivamente).

Para conocer el efecto en las mediciones que resulta por la diferencia en la sensibilidad de los equipos, se analizó una solución saturada de BNIR en metanol en ambos. Una parte de la solución se colocó en una celda de cuarzo de 1 mm y se posicionó en el fluorímetro de tal forma que se pudiera observar la emisión de fluorescencia del frente de la celda, donde incide el haz de excitación. Esta se midió en dos posiciones de la celda, como puede verse en la Figura A4.1. Otra parte de la solución se colocó en un portamuestras de 3 pozos, y se observó con el microscopio confocal utilizando los mismos parámetros que los usados para el análisis de las células teñidas con BNIR. Se tomaron varias imágenes, de las que se muestran en donde se puede ver el borde del pozo, con la solución de BNIR de un lado y vidrio del otro, Figura A4.2

Comparando los valores obtenidos en ambos experimentos, se encontró que la relación I_C/I_B medida en el microscopio es **2.48 ± 0.18** veces más chica que la medida en el fluorímetro. Utilizando este parámetro como un factor de corrección para escalar los valores obtenidos en el microscopio, es posible comparar los valores obtenidos con ambos instrumentos.

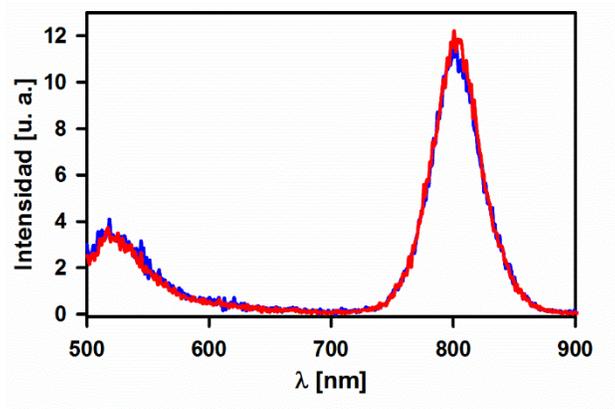


Figura A4.2. Espectro de emisión de una solución saturada de BNIR ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$). La fluorescencia se recolectó del frente de la celda, en dos posiciones diferentes.

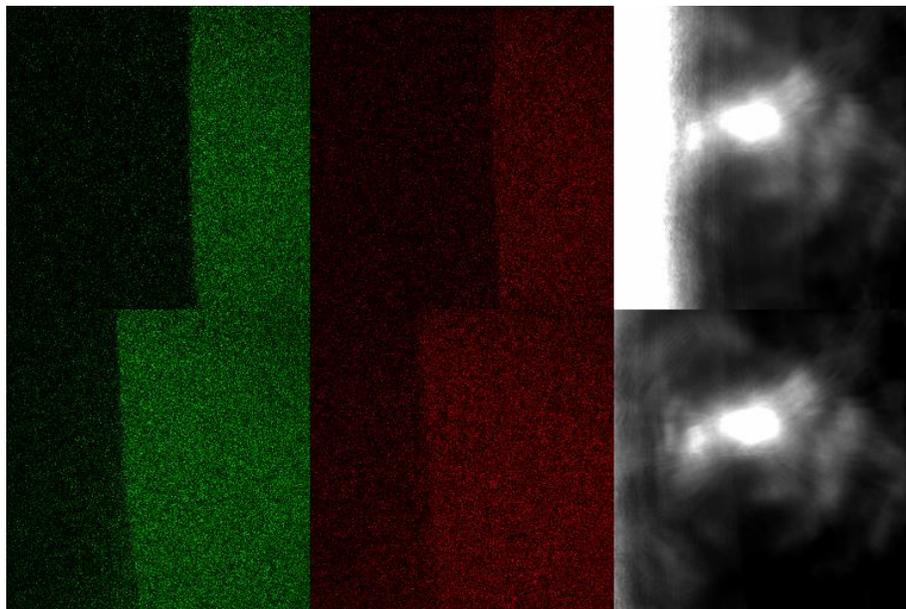


Figura A4.2. Espectro de emisión de una solución saturada de BNIR en un portaobjetos con pozos ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$). Se muestran dos diferentes posiciones dentro del mismo pozo, donde se observa la emisión del BODIPY (verde) la cianina (rojo) y la imagen de campo claro.

Bichromophoric Sensors for Ratiometric Measurements of Molecular Microenvironments through the Interplay of Charge Transfer and Energy Transfer Channels

Andres Arroyo-Pieck,^[a] Daniela Araiza-Olivera,^[b] and Jorge Peon^{*[a]}

A new molecular architecture was designed to amplify the sensitivity of bichromophoric probes, in which two sequential kinetic competitions of photophysical channels were used to define the emission yield of the lower energy chromophore. Additionally, the emission from both chromophores can be used for ratiometric measurements, which are concentration independent. Two sensors were synthesized to demonstrate the concept, coupling a boron-dipyrromethene (BODIPY) dye and a cyanine dye. Both the energy transfer from the BODIPY to the

cyanine and the cyanine radiative channel compete with a charge transfer state formation, giving the cyanine emission intensity a twofold dependence on polarity. This was confirmed with steady state and time-resolved spectroscopies. Also, the large spectral gap between the two emissions (approx. 280 nm) makes the ratiometric measurements crosstalk-free. The use of the sensors in live cells was demonstrated through the staining and imaging of SK-LU-1 lung cells under normal and apoptotic conditions.

Introduction

There is significant interest in the development of fluorescent probes due to their compatibility with live cells under physiological conditions.^[1] The high spatial and temporal resolution of fluorescence microscopy has allowed the study of biochemical processes in real time.^[2] This has led to the development of molecules that are sensitive to their micro-environment and target specific organelles or probe biochemical processes in cells.^[3] Within this area, it is of great importance to use techniques that are independent of the probe's concentration, due to the inhomogeneous media and uneven loadings in cells. Such techniques include the measurement of fluorescence lifetimes^[4] and steady state ratiometric detection at two different wavelengths.^[5] The first technique requires longer acquisition times and more specialized setups and equipment, while the ratiometric detection can be used with any instrument that measures fluorescence intensity and requires less acquisition time, frequently making it better to monitor fast processes.^[6]

The effect of the microenvironment in the behaviour of a molecule involves several parameters, including pH, temperature, viscosity and polarity.^[7] The local polarity, or micro-polarity, is an important parameter in many biochemical processes. Several environment-sensitive fluorescent molecules

have been developed in order to probe membrane polarity,^[8] monitor lysosomal autophagy^[9] and dysfunction,^[10] measure the surface hydrophobicity of proteins,^[11] selective detection^[12] and activation^[7] of proteins, and to study the mitochondrial polarity changes between normal and cancer cells.^[13]

Many polarity sensors are molecules that undergo photo-induced electron transfer after absorbing light,^[14] forming charge transfer (CT) states. The dynamics of CT states, and their dependence on the solvent, have been studied in several model systems,^[15] including boron-dipyrromethene (BODIPY)^[16,17] and cyanine dyes.^[18,19] It has been demonstrated in BODIPYs and other molecules that the locally excited (LE) state and a CT state can be in equilibrium at room temperature due to thermal repopulation.^[20] Due to this equilibrium, the emission from the LE state shows a biexponential decay.^[21] One decay is related to the formation of the equilibrium between the LE and the CT states, while the second depends on the decay channels of both states (LE and CT). Any competing process that involves the LE state, like fluorescence emission or energy transfer, will be affected by both the formation and the decay of the CT state, and thus, by the polarity of the solvent. As we elaborate below, this property was used in the present molecular design.

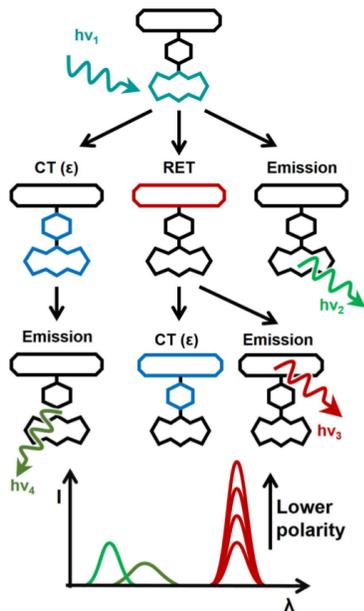
In this contribution, a new type of bichromophoric molecule was designed as a ratiometric microenvironment probe. The central feature of the proposed molecular architecture (Scheme 1) is the enhancement of the sensitivity of the sensors. This is achieved by coupling two different chromophores that form intramolecular CT states and can undergo resonant energy transfer (RET) between them, in our case, a BODIPY and a NIR emitting cyanine dye. Both chromophores absorb and emit light in different regions of the visible spectrum and can be selectively excited.

When selectively exciting the chromophore that absorbs at shorter wavelengths (Scheme 1), these molecules decay by three paths: emission, energy transfer and CT state formation.

[a] A. Arroyo-Pieck, Prof. J. Peon
Departamento de Físicoquímica
Instituto de Química, UNAM
Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510 (México)
E-mail: jpeon@unam.mx

[b] Dr. D. Araiza-Olivera
Departamento de Química de Biomacromoléculas
Instituto de Química, UNAM
Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México 04510 (México)

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cplu.201800333>



Scheme 1. Simplified scheme of the excited state dynamics of the bichromophoric sensors described herein. Light green emission corresponds to fluorescence from the locally excited BODIPY chromophore, dark green to fluorescence from the BODIPY's charge transfer state, and red to fluorescence from the cyanine chromophores, which is a function of the polarity.

Changes in the microenvironment of these molecules will affect the kinetics of the last process, and thus, the yields of the three competing processes. The molecules that underwent the RET process will then have the excitation localized in the second chromophore. The polarity-dependent formation of the CT state in the second chromophore will compete with its locally excited emission. This double dependence on the polarity of the medium gives these systems an enhanced sensitivity to different solvent or cell environments.

Two prototype molecules were synthesized to demonstrate these design principles (see Figure 1). This was achieved by coupling the commercially available IR780 cyanine with a BODIPY dye through a bridge formed by an ether bond and two different aromatic moieties: a phenyl group (BBIR) or a naphthyl group (BNIR). The aromatic moieties were selected to analyse the effect of changing the electron donor in the formation of the CT states and the sensitivity of the sensors while maintaining the distances between the energy transfer donor and the acceptor. The precursor cyanine IR780 was chosen due to its optical properties and because it can be easily functionalized at the meso position. Additionally, the IR780 cyanine has been widely used as a near-IR fluorescent probe due to its low toxicity and facile uptake by cells and tissues.^[22,23] The water-

insoluble cyanines and BODIPYs tend to accumulate in cell and mitochondria membranes.^[8,22]

The BODIPY precursors (BB and BN, Figure S1) were chosen because their absorption bands lie within a wide minimum in the absorption spectra of cyanine IR780 (Figure S2). This allows for the BODIPY chromophores to be selectively excited. The aromatic alcohol of the parent BODIPYs allows the direct coupling with the cyanine through an ether bond, so both moieties behave as independent molecules for optical absorption. According to the aforementioned mechanisms, both chromophores should be able to form charge transfer states with the aromatic moiety of the bridge,^[16,24] making the excited state dynamics of the molecule highly sensitive to the interactions with the medium. In addition to the experiments in pure solvents, the synthesized molecules were used to stain lung cancer cells (SK-LU-1), to demonstrate their potential use as sensors in complex media and analyze their behavior in live cells. Also, glycerol treated and a BKM-120 treated cell samples were used to test the capacity of the sensors to report changes in their local environment. Glycerol has been used as a protective agent against the adverse effect of freezing in cells,^[25] and was used to induce changes in the cellular cytoplasm. BKM-120 (a Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor) has been used to induce apoptosis in cells,^[26] producing changes in their metabolism and morphology.

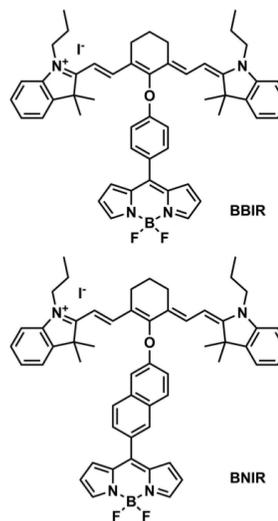


Figure 1. Structure of the two bichromophoric molecules of the present study: BBIR (top) and BNIR (bottom).

Results and Discussion

Steady State Spectroscopy

The BBIR and BNIR molecules were designed as bichromophoric systems capable of probing the interactions with its environment due to its influence on the formation of charge transfer (CT) states, which compete with the radiative and energy transfer decay channels. In this section, it will be shown that the BODIPY and cyanine moieties behave as two independently absorbing chromophores, coupled by resonant energy transfer (RET). When the BODIPY moiety is excited, the molecules show a double emission that can be used for ratiometric measurements.

The absorption spectrum of BBIR (Figure 2) corresponds to the superposition of the spectra from the parent compounds

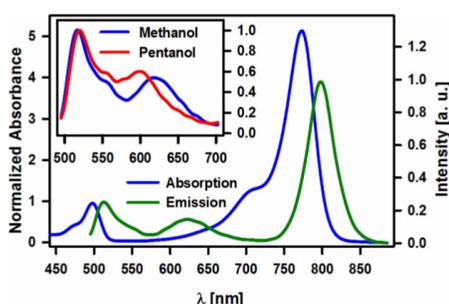


Figure 2. Absorption and emission spectra ($\lambda_{exc} = 490$ nm) of BBIR in methanol. Inset: Change in the charge transfer emission band between methanol and pentanol solutions.

(Figure S3). This demonstrates that the chromophores can be considered as independently conjugated units.

The BODIPY moiety of the BBIR can be selectively excited with light of 470–500 nm, which corresponds to the transition to an excited state localized in the BODIPY chromophore. The resulting emission spectrum (Figure 2) has three distinct bands: The first band (500–600 nm) is the emission from the locally excited (LE) state of the BODIPY moiety. The second band (550–700 nm) has been observed in other BODIPY dyes^[27] and is assigned to the emission from a CT state localized in the BODIPY, involving the aromatic moiety of the bridge. This is confirmed by the strong solvatochromism of the second emission band, as can be seen in the inset of Figure 2. The change in the polarity of the solvent between methanol and pentanol has a negligible effect in the emission maximum of the LE BODIPY band but causes a bathochromic shift of ≈ 20 nm in the CT state band. The third emission band (750–850 nm) corresponds to the emission from the excited state localized in the cyanine moiety. Given the specific initial BODIPY excitation, the NIR emission is the result of RET between the BODIPY and cyanine chromophores.

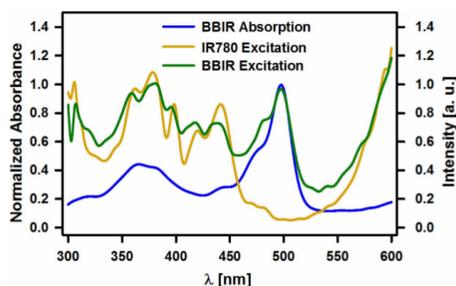


Figure 3. Comparison between the absorption and excitation spectra of BBIR ($\lambda_{exc} = 790$ nm) and the excitation spectra of IR780 ($\lambda_{exc} = 800$ nm), in methanol.

The excitation spectra of BBIR detecting the cyanine emission (790 nm) shows a series of bands in the region of 300–470 nm (Figure 3) several of which correspond with the upper excited states absorption of the cyanine dye, as can be seen by comparison with the excitation spectra of the parent cyanine IR780. The additional band in the 470–520 nm region arises from the absorption of the BODIPY moiety of BBIR, which produces emission from the cyanine chromophore at 790 nm. This observation is consistent with a resonant energy transfer channel from the BODIPY section to the cyanine moiety. The above observations also hold for the BNIR molecule (Figures S3–S5).

The emission spectra of BBIR and BNIR were measured in various solvents, upon excitation of the BODIPY moiety (490 nm). In the series of alcohols from methanol to pentanol (Figure 4) there is a continuous increase in the emission

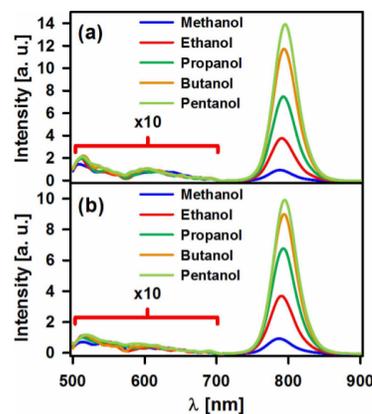


Figure 4. Fluorescence emission of BBIR (a) and BNIR (b) in a series of alcohols from methanol to pentanol, exciting the BODIPY moiety ($\lambda_{exc} = 490$ nm). The 500–700 nm emission was multiplied by 10 to improve the visibility.

intensity of the cyanine band (800 nm) as the solvent polarity decreases, while the changes in the BODIPY LE and CT state bands (500–700 nm region) are nearly negligible in comparison.

The cyanine chromophore of the BBIR and BNIR molecules can be selectively excited with light from 600 nm to 800 nm. Figure 5 shows the emission from solutions of BBIR and cyanine

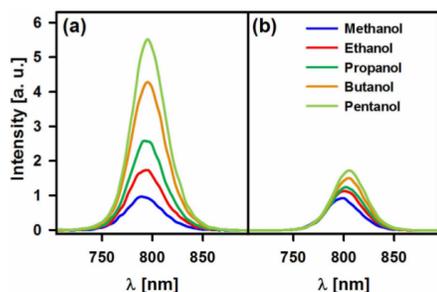


Figure 5. Fluorescence emission of BBIR (a) and IR780 (b) in a series of alcohols upon direct cyanine excitation ($\lambda_{\text{exc}} = 690$ nm). The emission spectra were normalized to the absorption at the excitation wavelength. Both plots have the same intensity scale for direct comparison.

IR780 in the same series of alcohols. These traces were scaled considering the absorption at the excitation wavelength for a direct comparison of the intensities and were acquired in the linear region of the intensity vs absorbance relation of the instrument. While the emission intensity of the IR780 cyanine only changes by a factor of two between methanol and pentanol, the emission of the BBIR solutions changes by a factor of more than five in the series of alcohols. The same trend was observed for BNIR (Figure S6). The negative solvatochromism observed in the cyanine emission has been previously studied in similar cyanines^[28] and merocyanines.^[29] This behaviour is typical of cyanine dyes where the ground state has a larger dipole than the excited state. As the polarity of the solvent increases, the energy of the ground state lowers more than the energy of the excited state, so the energy difference between the two states grows, moving the absorption and emission maxima to shorter wavelengths.

Given that the solvent dependence on the cyanine emission upon direct cyanine excitation ($\lambda_{\text{exc}} = 690$ nm) is much more significant in the BBIR and BNIR solutions than for IR780, these changes are related to the coupling of the cyanine dye with the BODIPY. As we will discuss in more detail below, this last trend is a significant feature in the microenvironment sensing properties of BBIR and BNIR, providing the relative (Cyanine/BODIPY) emission intensity of these molecules with a double dependence with their environment. Along with the previous spectra, we measured the fluorescence quantum yields for BBIR and BNIR in the series of alcohols. The emission from the BODIPY moiety shows minimal changes between the solvents, with its fluorescence quantum yields remaining lower than 0.001. Although the BODIPY yield is low in these systems, preliminary

studies show that this emission has more than enough intensity to be detected and quantified in confocal microscopy (see below).

In the emission measurements of the cyanine moiety, we used two different excitation wavelengths: selective BODIPY excitation ($\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm) and selective cyanine excitation ($\lambda_{\text{exc}} = 690$ nm). With the fluorescence yields measured with both excitation wavelengths, we calculated the energy transfer yield between the chromophores using Equation S1. The results are summarized in Figure 6, and Tables S2 and S3. Both the cyanine

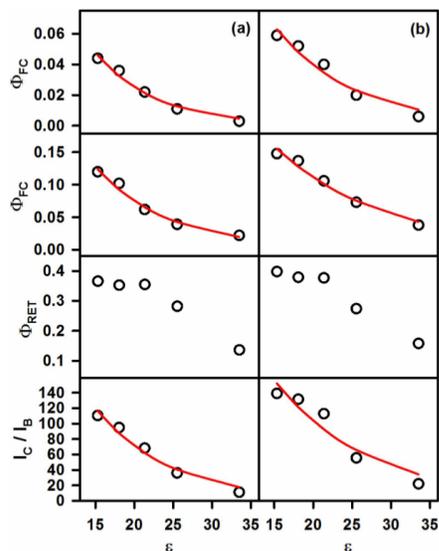


Figure 6. BBIR (a) and BNIR (b) fluorescence quantum yields of the cyanine moiety ($\lambda_{\text{exc}} = 790$ nm) exciting the BODIPY ($\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm, top), and the cyanine ($\lambda_{\text{exc}} = 690$ nm, second row), energy transfer yield (third row) and cyanine to BODIPY emission ratio (bottom) as a function of the dielectric constant of the solvent for the series of alcohols.

fluorescence yield and the energy transfer yield are solvent dependent, and both increase as the polarity of the solvent is lowered. These effects get combined when the BODIPY moiety is excited, enhancing the sensitivity of the molecule to solvent or microenvironment changes in a tandem fashion. It should be noted that the energy transfer yield in BBIR and BNIR has similar values and dependency with polarity, levelling off only for the lowest polarities. The nonlinear trend in the data (Figure 6, red lines) probably arises due to the complexity of the interactions between the sensors and the solvent, and their effect in the excited state dynamics of the sensors.

Furthermore, the ratio between the emission intensity of the cyanine and the BODIPY moieties is also solvent dependent (Figure 6) and grows proportionally to the changes in the emission (Figure S7). This indicates that the ratiometric measure

of the emission intensity of BBIR and BNIR can be used to detect changes in their microenvironment.

The enhancement of the microenvironment sensitivity of the proposed molecules can be quantified using the measured fluorescence quantum yields. For example, the change in the cyanine fluorescence yields of BBIR after BODIPY excitation ($\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm, Table S1) is 14.6 times higher in pentanol than methanol. This can be compared with the change in the cyanine fluorescence yields after cyanine excitation ($\lambda_{\text{exc}} = 690$ nm, Table S1) of only 5.5 times going from methanol to pentanol. This change is roughly the same observer for the emission maxima of the emission spectra of the BBIR molecule (Figures 4 and 5).

By using mixtures of two solvents, we analysed the behaviour of the synthesized molecules as a function of their local environment with a more precise control. In both protic (methanol/butanol) and aprotic (acetone/dichloromethane) solvent mixtures the ratio between the emission intensity of the cyanine and the BODIPY grows as the solvent molar fraction of the less polar solvent increases (Figure S8). This indicates that the molecules can be used in both type of solvents as ratiometric probes. However, we noticed that the energy transfer yield (Figure S9) as function of the solvent proportion show an exponential trend for the protic solvents and a linear trend for aprotic ones. This indicates a change in the solute-solvent interactions, most probably due to hydrogen bond formation in the protic solvents.

Furthermore, for solvents of similar dielectric constants, for example acetone ($\epsilon = 21.1$) and propanol ($\epsilon = 21.3$), the emission of the CT state and the cyanine is more intense in protic solvent than in the aprotic solvents (Figure 7). To further

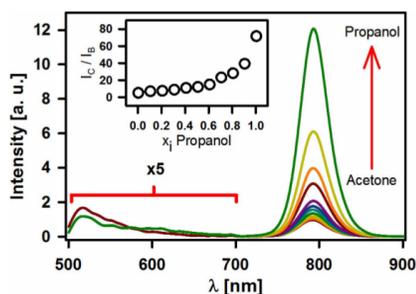


Figure 7. Emission spectra of BNIR in mixtures of acetone/propanol. Inset: Ratio between the emission intensity of the cyanine and the BODIPY as a function of the molar fraction of the propanol. The 500–700 nm emission was multiplied by 5 to improve the visibility.

analyse the difference between these two solvents, we obtained the emission spectra of BNIR in mixtures of acetone/propanol. As the solvent mixture is enriched with propanol, the I_c/I_b ratio sees an important increase when the solution approaches the 100% propanol composition. This is a direct demonstration that the BBIR and BNIR are highly sensitive to the local specific

interactions with the OH groups at the microenvironment around these fluorescent molecules.

In order to explore whether the viscosity of the solvent can have an effect on the relative emissions of the synthesized molecules,^[30] we compared the behaviour of the sensors in methanol and diethylene glycol (DEG). Both solvents have similar dielectric constants (33.4 vs 31.8 respectively) while the viscosity changes drastically from 0.6 cP in methanol to 30 cP in DEG. As can be seen in Figure 8, both the absorption and the

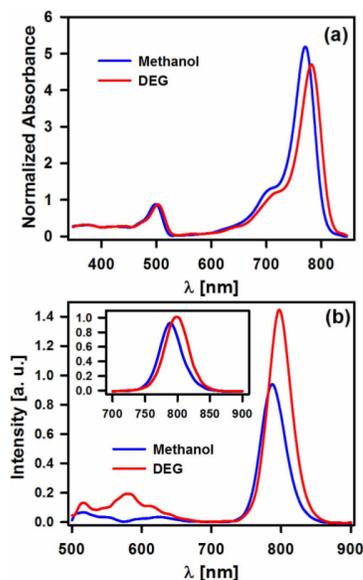


Figure 8. Normalized absorption (a) and emission (b, $\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm) spectra of BNIR in mixtures of methanol and diethylene glycol (DEG). The inset shows the emission spectra when the cyanine moiety is excited directly ($\lambda_{\text{exc}} = 690$ nm).

emission bands of the cyanine moiety present a bathochromic shift in DEG compared to methanol. The BODIPY and the cyanine emissions show changes with the viscosity, both in the fluorescence quantum yield and the energy transfer yield. The emission from the BODIPY CT state, around 580 nm, is also enhanced by the larger viscosity of DEG.

The emission intensity of the cyanine moiety, after excitation of the BODIPY moiety ($\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm), is approximately 40% larger in DEG than in methanol (50-fold increase in viscosity, with little change in polarity). However, this is much smaller than the 980% change in the emission intensity between methanol and pentanol (Figure 4). This indicates that although the emission of the molecules is sensitive to the viscosity, the local polarity has a much greater effect on the behaviour of the sensors. It should be noted that the change in the relative emission intensity between the BODIPY and cyanine

emission (I_c/I_b) changes less than 5% between the methanol and DEG solutions. The small effect of viscosity in the emission of BBIR and BNIR was confirmed in methanol/glycerol mixtures, where the viscosity changes by four orders of magnitude but the relative emissions only change by 220% (this is discussed in more detail in the Supporting Information, Figure S10 and Table S4).

The elevated sensitivity of the relative fluorescence yields to changes in the molecular environment can be explained by taking into consideration that the sensors have a double dependence on the solute-solvent interactions: first, in the energy transfer step from the BODIPY to the cyanine dye, and then, in the cyanine emission (both due to kinetic competitions with charge transfer channels). Importantly, the excellent correlation between the emission quantum yield of the cyanine moiety after BODIPY excitation, and the ratio between the emission intensities of the cyanine and BODIPY moieties indicates that these molecules can be used as ratiometric probes for the microenvironment around them.^[5]

Time-Resolved Spectroscopy

To obtain more insights about the processes involved in the photophysics of these molecules, we measured the excited states lifetimes of BBIR and BNIR after selective BODIPY excitation. We followed the spontaneous emission as a function of time for the three bands observed in the static spectroscopy: 520 nm, associated to the BODIPY LE state; 600 nm, from the BODIPY CT state; and > 700 nm for the cyanine emission.

For the series of alcohols, the 520 nm emission from the BODIPY LE state shows two decay times (Figure S11). The first decay accounts for more than 99% of the amplitude, and has a time constant below the resolution of the TCSPC setup of 50 ps. This agrees with previously reported values of the order of 10 ps for the formation of CT states in similar BODIPYs.^[21] The second decay is solvent dependent, Table S5, with both the amplitudes and the decay times increasing as the solvent polarity decreases. Given that previous studies have shown that the LE and CT states are in thermal equilibrium in BODIPY chromophores,^[20] the first time can be assigned to the formation of the CT state until the equilibrium is reached, while the second can be assigned to the population decay once the equilibrium has been reached.

Just like the decay of the BODIPY LE state emission, the rise time for the emission from the BODIPY CT state and the cyanine moiety were below the time resolution of our setup. Considering that the excitation wavelength (485 nm) selectively forms the BODIPY-localized excited state, the sub-50 ps accumulation of the 600 nm and 790 nm signals is consistent with an initial population of the BODIPY CT state and the cyanine-localized excited state from the BODIPY LE state.

The emission in the CT region (600 nm) also shows a biexponential decay (Figure S12). The short decay time (Table S6) increases as the polarity of the solvent decreases. This dependency with the polarity indicates that this decay is related to the relaxation of the CT state to the ground state. The

second decay time is similar for both molecules in the five alcohols and does not seem to depend on the solvent.

The excited state lifetime of the cyanine moiety grows as the solvent polarity decreases, as can be seen in Figure 9 and

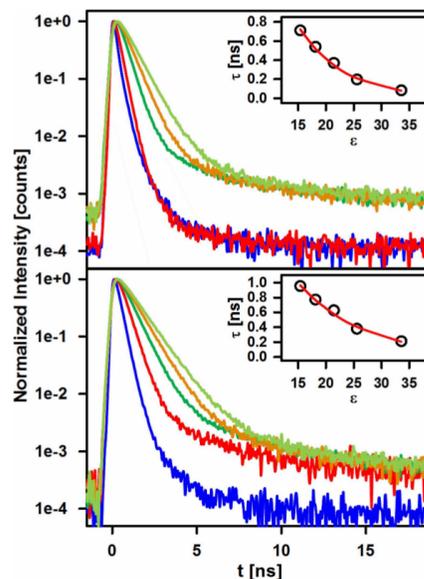


Figure 9. Time traces for BBIR (top) and BNIR (bottom) detecting the cyanine emission (> 700 nm) in a series of alcohols (methanol blue, ethanol red, propanol green, butanol orange, pentanol light green). The inset shows the cyanine emission lifetime vs. the dielectric constant of the alcohols.

Table S7. This is consistent with the fluorescence quantum yields measured with the steady state spectroscopy. There is a very good correlation between the excited state lifetime of the cyanine moiety and the solvent polarity (insets of Figure 9) so the molecule can be used as a sensor in fluorescence lifetime measurements and life-time microscopies (FLIM) upon excitation with readily available pulsed excitation sources.

The excited state lifetimes of the synthesized molecules were also obtained in acetone to compare with the results in propanol (Figure S13). The most important feature is that the CT state decay times in acetone (115 ± 8 ps and 302 ± 7 ps) are smaller than the ones measured in propanol (Table S6). A mention earlier, the slower decay of the CT states in protic solvents could be due to hydrogen bond formation between the sensors and the solvent. If the electron donor section of the molecule forms hydrogen bonds with the solvent, these have to break after the electron transfer to the acceptor, due to the donor becoming positively charged^[31]. These hydrogen bond dynamics could slow the CT state formation and relaxation. This could explain the longer emission times of the sensors in protic solvents (see Figure S13), considering that both the BODIPY and

the cyanine moieties form CT states with the same electron donor, the aromatic moiety of the bridge. This also indicates that it is possible to consider these sensors with regards to their sensitivity to the formation of hydrogen bonds.

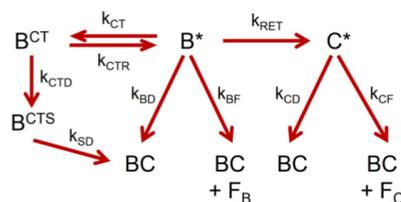
The instrument response function, and typical residuals for the exponential fit of the time traces can be found in Figures S14 and S15.

Kinetic Model for the Excited State Evolution of BBIR and BNIR

The experimental observations can be summarized by a simplified kinetic model for the photophysical processes occurring in BBIR and BNIR, together with the general solvent dependencies. The kinetic model considers the following experimental observations:

1. The BODIPY and cyanine emission intensities are solvent dependent, indicating that the formation of CT states are in kinetic competition with the energy transfer and radiative decay channels.
2. The two chromophoric units are coupled by resonant energy transfer. The yield of this process increases as the polarity of the solvent decreases due to changes in the rate constant of the main competing channel: formation of a CT state in the originally excited chromophore (BODIPY).
3. The BODIPY locally excited and charge transfer states can be in thermal equilibrium at room temperature as has been observed previously in a number of BODIPY molecules.
4. The BODIPY CT state is formed from the BODIPY LE state, and thus must have isoenergetic vibrational states. Due to the high dipole of the CT state, the solvent rearranges around the molecule in different timescales, lowering the energy of the CT state, as can be seen in the difference between the emission maxima of the LE state (510 nm) and the CT state (around 570–620 nm, solvent dependent).
5. When the systems have evolved into the cyanine excited state due to energy transfer, the radiative channel also competes with a solvent dependent quenching associated to a cyanine CT type state. This provides a tandem micro-environment dependence for the BBIR and BNIR probes upon BODIPY excitation (first, CT vs energy transfer, then the cyanine CT vs radiative channels).

The relaxation of the solvent is an important factor in the yield of the different photophysical channels, as has been previously observed.^[32] This is especially important for the alcohols, which have the longest solvent relaxation times. Due to the fact that the equilibrium of the of the LE and CT states in BODIPY is thermal, the CT to LE backreaction depends on the energy difference between the two states, which changes dynamically as the solvent relaxes, making this process and its kinetic constant also time dependent. This time dependency is taken into account in a simplified way in the proposed kinetic model as the formation of a solvated CT state that is not in equilibrium with the CT state, which would contribute to the emission band around 600 nm.



Scheme 2. Proposed kinetic model of the excited state dynamics of BBIR and BNIR. BC: ground state; B*: BODIPY LE state; B^{CT}: BODIPY CT state; B^{CTS}: solvated CT state; F_B: BODIPY fluorescence emission; C*: cyanine LE state; F_C: cyanine fluorescence emission.

In the proposed kinetic model shown in Scheme 2, the BODIPY moiety is selectively excited to the BODIPY LE state (B*), which has three decay paths: formation of a CT state (B^{CT}), fluorescence emission (F_B) and energy transfer to the cyanine moiety (C*). The B^{CT} state, in the initial molecular and solvent configuration, is in equilibrium with the B* state. After the formation of the B^{CT} state, the solute-solvent system rearranges to a new configuration, forming a solvated CT state (B^{CTS}) that is not in equilibrium with the B* state due to its lower energy. As mentioned previously, the cyanine-localized excited state (C*) can also form a CT state, a process that competes with its fluorescence emission (F_C) and is considered in the nonradiative decay constant (k_{CD}).

The rate equations derived from this model, and their integrated form can be found in the Supporting Information, in Figures S16 and S17. They were used to simulate the excited state dynamics of the molecules.

We first simulated the excited state dynamics of the parent BODIPYs (BB and BN), using the experimental values for its excited state decay lifetimes and fluorescence quantum yield (Figures S18–S21). The known values for the kinetics constants involved in its decay (k_{BF}, k_{BD}, k_{CT}, k_{CTR}, k_{CTD}) were used as a starting point for the simulation of the BBIR and BNIR molecules. The fluorescence quantum yields obtained from the selective excitation of the cyanine moiety (λ_{exc} = 690 nm) and the decay lifetimes obtained from the time-resolved measurements were used to determine the constants involved in the photophysics of the respective fragment (k_{CD}, k_{CF}).

Our hypothesis is that the changes in the emission of the synthesized molecules in different solvents depends only in the change in the rates for the formation and decay of the CT states. This means that we should be able to reproduce the changes observed experimentally by adjusting only the kinetic constants of those processes: k_{CT}, k_{CTR}, and k_{CTD}. The energy transfer constant is considered to be nearly constant between the solvents, so a first approximation is to use the calculated value in methanol for the other alcohols.

Using the proposed kinetic model and the rate equations derived from it, we were able to reproduce the fluorescence quantum yields and decay lifetimes obtained experimentally with high precision due to the number of degrees of freedom (the kinetic constants) compared to the number of fitted values.

Table 1. Kinetic constants for the parent BODIPYs BB and for BBIR and BNIR in methanol and butanol, calculated using the proposed excited state dynamics model to reproduce their experimental fluorescence yields and lifetimes.

Molecule	Solvent	k_{CT} [s^{-1}]	k_{CTR} [s^{-1}]	k_{CD} [s^{-1}]	k_{RET} [s^{-1}]
BB	methanol	3.96×10^{10}	2.84×10^{10}	6.39×10^9	–
	butanol	3.96×10^{10}	1.35×10^{11}	9.38×10^9	–
BN	methanol	3.16×10^{11}	2.84×10^{10}	4.3×10^{10}	–
	butanol	3.16×10^{11}	2.84×10^{10}	2.5×10^{10}	–
BBIR	methanol	4.5×10^{11}	2.93×10^9	1.10×10^{10}	5.45×10^{10}
	butanol	4.5×10^{11}	5.23×10^9	1.49×10^9	5.45×10^{10}
BNIR	methanol	3.85×10^{11}	2.5×10^9	4.3×10^{10}	5.45×10^{10}
	butanol	3.85×10^{11}	5×10^9	1.5×10^9	5.45×10^{10}

A comparison between the target values and the obtained from the model is shown in Table S8. The simulation allowed us to analyse the change in the quantum yield and decay times as a function of changes in the kinetic constants. Table 1 shows the values found for the constants involved in the CT states kinetics and also the energy transfer process, central in the behaviour of the sensors, for methanol and butanol.

There is a notorious difference in the fluorescence quantum yields of both parent BODIPYs (0.017 for BB and <0.001 for BN in methanol). This can be easily explained by taking into account that the naphthyl moiety of BN should be a better electron donor than the phenyl ring of BB, so the formation and decay of the CT state should be favoured. This was also confirmed in the simulations, as can be seen in the difference in k_{CT} between BB and BN. It should be noted that despite this change, both BODIPYs show very similar behaviour when coupled with the cyanine dye, as can be seen in both the experiments (Figure 6) and the simulation results. Furthermore, having two molecules and their data sets was useful during the development and analysis of the kinetic model, as changes in both molecules could be compared between them.

From the proposed kinetic model, we plotted the relative concentration of each state, and the two emissions, as a function of time in order to visualize the time evolution of the excited states of the molecules. At time zero, all the molecules are in the BODIPY LE state (B^*), with a relative concentration of one. The final relative concentration of the emissions is the number of photons emitted given the initial concentration of the locally excited state, in other words, the fluorescence quantum yield.

In Figure 10, we show the simulated excited state dynamics of BBIR, and compare the results between methanol and butanol. As the polarity of the solvent decreases, so does the decay constant of the B^{CT} state, and the excited state lifetime of both the B^{CT} and B^* is increased, due to the thermal equilibrium between the two. This in turn increases the energy transfer yield from the BODIPY to the cyanine moiety, as can be seen in the higher maximum relative concentration of C^* . The cyanine emission is further increased from the change in its non-radiative decay (k_{CD}), which includes the formation of a CT state in the cyanine. The simulation reproduces the biexponential decay of the BODIPY localized excited state, the establishment of the equilibrium between the LE and CT state (B^* and B^{CT} , Figure 10) and the tendency of the longer lifetime to increase as the solvent polarity decreases, both in amplitude and time.

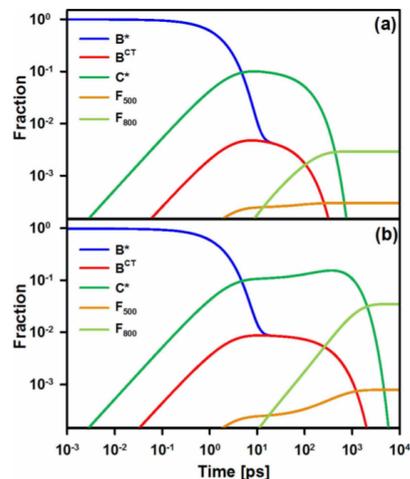


Figure 10. Simulation of the excited states dynamics of BBIR in (a) methanol and (b) butanol.

The excited state lifetime of the cyanine shows a longer lifetime in less polar solvents. All these changes are in accordance with the experimental results.

The simulation of the excited dynamics indicates that the proposed model can be used to explain the experimental results and to analyse the changes in the fluorescence emission yield and lifetime of the molecules as a function of the kinetic constants of the processes involved in the excited state dynamics of the probe. This is useful for both the understanding of the behaviour of the sensors and can be used in the design of other molecules.

As with other microenvironment sensors, the actual use of molecules like BBIR and BNIR will require a specific calibration for each individual application. Herein we have shown that both molecules are highly sensitive to their local environment due to the kinetic competition between the energy transfer channel and the charge transfer channel in the BODIPY moiety. This effect is amplified by a second kinetic competition once the excitation is localized at the cyanine section, between the formation of a non-radiative CT state and the cyanine emission. The BODIPY-cyanine design allows both for the energy transfer

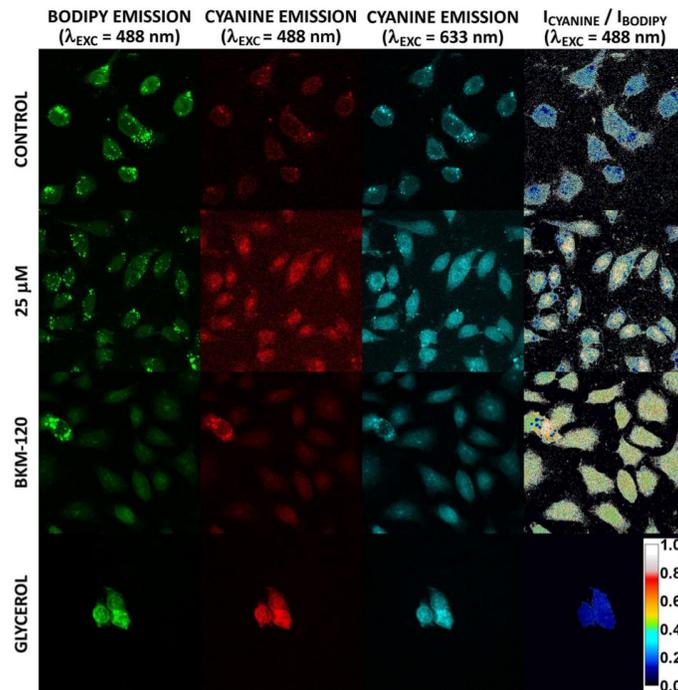


Figure 11. Confocal images of SK-LU-1 cells stained with the BNIR molecule, shown in pseudocolour. The first three columns are the Z-projections of the Z-stacks obtained. The rightmost column shows the emission intensity ratio between the first two columns (Cyanine/BODIPY).

interplay, and for a record setting spectral separation between the two emission bands than compose the ratiometric scheme.

Confocal Microscopy

After confirming the property of the molecules to report changes in their environment in well characterized media (pure solvents), our goal was to demonstrate the potential use of the designed molecules as sensors in cells. Changes in the emission of the molecules in cells are meant to be related to similar measurements, for example, between organelles in the same cell or between cells treated with different drugs. The ratiometric measure ensures that differences due to the inhomogeneous load in organelles and different cells has no impact in the result.

The SK-LU-1 lung cancer cells were successfully stained with the BNIR molecule (Figure 11). The cell viability test (see Figure S22) shows that the BNIR IC_{50} value is larger than 200 μ M, a significantly higher concentration than the ones used to stain the samples (25 and a 100 μ M), indicating that the molecules can be used in live cell imaging. The fluorescence of both the BODIPY and the cyanine moiety shows that the

molecule distributes in the whole cell. Nevertheless, there are several places in the cells that exhibit a much greater emission intensity. This suggests that the molecule is accumulated more in specific organelles or structures (vesicles, lysosomes, etc). More importantly, there is a significant difference between the fluorescence intensity in these points and the rest of the cell when comparing the BODIPY and the cyanine emission. The relation between the emission of the cyanine and the BODIPY moieties (I_C/I_B) in these points is much lower than in the rest of the cell, as can be seen in the rightmost part of Figure 11. This indicates an important change in the local environment of the sensors, and demonstrates that the molecules can be used to probe differences in live cells. Taking into account the low I_C/I_B value, it is highly probable that the cyanine moiety is in a more polar environment in these points than the rest of the cells, thus having a lower emission intensity compared to the BODIPY moiety.

Comparing the cell images using different dye concentrations, we observed that there is no change in the distribution of the molecule in the cells nor the emission intensity relation (I_C/I_B) between cells stained either with a 100 μ M (control cells) or a 25 μ M BNIR. The only difference is a higher overall intensity measured in the control cells (compared using the

image intensity histograms), indicating a higher sensor intake in cells using the more concentrated solution.

The cells treated with glycerol had a different morphology than the control cells (Figure S23). They are swollen and rounded, which may be explained by the intake of glycerol into the cytoplasm. The fluorescence distribution in the glycerol treated cells indicate a heterogeneous distribution on the whole cells, in both the BODIPY and the cyanine emission, but does not present the same high intensity points as the control cells. It should be noted that the emission intensity relation (I_c/I_b) is very homogeneous in these cells. This indicates that the changes of the structure observed in the emission is only due to the concentration of the sensors, and not to differences in their local environment, as opposed to what is seen in the control cells. This is a clear example of the use of the ratiometric measurements to distinguish between both sources of emission intensity change.

Additional experiments were made through the use of the BKM-120, an apoptosis inducer compound, used to analyse the behaviour of the sensors in the intracellular media upon the onset of apoptosis. The sample treated with BKM-120 had a much lower cell density 24 hrs after the addition of the drug. Most cells in the sample were isolated, but we observed two types of cells: some similar to the control cells while the others lacked the high emission intensity spots. The image shown in Figure 11 was chosen due to the presence of the two types of stained cells. The brightest cell is analogous to the cells observed in the control sample. The rest of the cells present an overall lower emission intensity, indicating a lower sensor intake, and the high emission intensity points are absent. As in the case of the glycerol treated cells, the emission intensity relation (I_c/I_b) is homogeneous, despite the presence of structure in the BODIPY and cyanine emission intensity, indicating similar local polarities in the cell structures observed.

The lower intensity cells were loosely fixed to the coverslip (not in the same Z plane as the bright cell, Figure S24). We believe the changes observed in these cells are due to the reported^[33] apoptotic inducing effect of the BKM-120 molecule. However, the most relevant result is that the sensors can report differences in the cells by probing their local environment, demonstrating the potential use of the molecular design in live cell imaging.

The changes in the emission intensity ratio (I_c/I_b) scales between the spectra obtained in the fluorometer and the microscope images comes from two sources. The first one is the difference in the detection sensitivity of the two instruments in the spectral intervals used in the experiments (550 and 800 nm). The I_c/I_b values obtained in the microscope must be multiplied by a factor of 2.48 (Figures S26–S27) to be compared with values obtained in the fluorometer. Furthermore, the values observed in pure solvents do not represent the whole range of possible values of the I_c/I_b ratio, and it is possible to have different values in other media, especially in the complex cell environments.

Further work using liposomes as cell membrane models is currently under way in our laboratory, which will help in the

analysis of the behaviour and calibration of the sensors in biological samples.

Conclusion

The two prototype molecules, BBIR and BNIR, show solvent dependent fluorescence emissions. Both can be used to measure changes in their microenvironment due to the formation of charge transfer states between the BODIPY or cyanine moieties with an aromatic fragment that works as electron donor. The sensitivity of the designed molecules is enhanced by the double dependence of the cyanine emission on the polarity after selective excitation of the BODIPY moiety: first in the energy transfer yield between the chromophores and second by modifying the cyanine emission yield.

Furthermore, the observed change in the fluorescence yield as a function of the solvent has a very good correlation with the ratio between the emission intensity of the BODIPY and the cyanine moieties, so the molecules can be used as ratiometric sensors. The emission bands have a spectral separation of around 280 nm, probably the largest reported to date,^[34,35] which makes the two bands easy to isolate, improving the ratiometric measurement because of the avoided crosstalk in the detection compared with other sensors. The emission lifetime of the cyanine moiety also shows a good correlation with the changes in solvent polarity, so the molecule can be used as a sensor by measuring its fluorescence lifetime.

BBIR and BNIR dependency on their microenvironment can be explained with the proposed kinetic model of the excited state dynamics of the sensors. This model was also tested by simulating the behaviour of the molecules in different solvents, demonstrating that it can reproduce the experimental values of fluorescence and energy transfer yields, as well as excited states lifetimes, by changing the dynamics of the CT states of both moieties, following the expected trend with the changes in polarity, that is, a higher formation and decay of the CT states in more polar environments. This model is important for the understanding of the synthesized molecules and for the future design and development of other molecular sensors.

As additional benefits, the BODIPY moiety of the BBIR and BNIR molecules can be excited with visible light of 480–500 nm, less harmful to the media than the UV light used with other sensors. Also, both detection wavelengths (500–570 nm and 700–900 nm) are far from the intrinsic fluorescence of cells, which would be useful in microscopy due to the lower background signal in the detection.

The proof of principle experiments in live cells indicate that the synthesized molecules can permeate cell membranes and can be used to stain cell structures. Furthermore, the relation between the emission intensity between the two chromophores (I_c/I_b) can be used to distinguish differences in the cells' microenvironments despite the heterogeneous distribution of the sensors in the cells. These results indicate that the proposed molecular design can be used in ratiometric measurements of live cells, and will be useful in the design of similar sensors.

Experimental Section

2-Hydroxy-6-napthaldehyde was purchased from Accela ChemBio; 4-hydroxybenzaldehyde, IR780, BF₃O(Et)₂, Et₃N and pyrrole were purchased from Sigma Aldrich, and were used for the synthesis without further purification. DMF, pyrrole and dichloromethane used in the synthesis were distilled before use. Methanol, ethanol, propanol, butanol, pentanol, acetone and dichloromethane used in the spectroscopic measurements were HPLC grade or equivalent. ¹H, ¹³C and two-dimensional NMR spectra were recorded in Jeol Eclipse 300 MHz, using adequate deuterated solvents. Mass spectra were obtained with a Jeol AX505HA (EI-MS) and Jeol AccuTOF JMS-T100LC (DART-MS) spectrometers.

Both BODIPY molecules, with hydroxyphenyl (BB) and hydroxynaphthyl (BN) moieties, were synthesized following a reported one-pot method. In a typical synthesis, 4 mmol of the aromatic aldehyde and 20 eq. of pyrrole were mixed in a round flask under argon atmosphere. One drop of trifluoroacetic acid was added, and the reaction was stirred at room temperature and monitored with TLC. The reaction was concentrated under vacuum and diluted with 30 ml of dichloromethane before a solution of DDQ (2, 3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone, 1.2 eq.) in 125 ml of dichloromethane was added slowly. After stirring for 4 hours, 10 eq. of Et₃N and BF₃O(Et)₂ were added and stirred overnight. The reaction was washed with water (3 × 50 ml), filtered over Na₂SO₄ and dried under vacuum. The product is purified by column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂) to obtain a metallic orange film in the flask, with a yield of 32%.

5,5-Difluoro-10-(4-hydroxyphenyl)-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide (BB): ¹H NMR (300 MHz, Acetone-d₆) δ 7.97 (s, 2H), 7.59 (d, 2H), 7.09 (dd, 4H), 6.65 ppm (d, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, Acetone -d₆) δ 161.6, 148.92, 144.1, 135.5, 133.8, 132.2, 125.9, 119.2, 116.6 ppm. HRMS (ESI⁺): m/z calculated for C₁₅H₁₁BF₂N₂O⁺: 284.09325, found: 284.09406.

5,5-Difluoro-10-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide (BN): ¹H NMR (300 MHz, Acetone-d₆) δ 8.19 (s, 1H), 8.05–7.98 (m, 3H), 7.92 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.70 (dd, J = 8.5, 1.9 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.30 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 6.68 ppm (d, J = 4.3 Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, Acetone-d₆) δ 158.2, 144.6, 137.2, 135.8, 132.6, 132.1, 131.8, 129.2, 128.8, 128.5, 127.4, 120.6, 119.5, 109.8 ppm. HRMS (ESI⁺): m/z calculated for C₁₉H₁₃BF₂N₂O⁺: 334.10890, found: 334.11006.

For the synthesis of the BBIR and BNIR molecules, 500 mg of IR780 and 1.2 eq. of the corresponding BODIPY were dissolved in a round flask with 150 ml of DMF. 10 equiv. of triethylamine was added and the reaction was left at 40 °C for 8 hrs. The mixture was concentrated under vacuum and the product was purified by column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH 99:1), and dried under vacuum to obtain a black powder, with a yield of 65%.

10-(4-(((E)-2-((E)-2-(3,3-Dimethyl-1-propyl-3H-indol-1-ium-2-yl)vinyloxy)-2-(3,3-dimethyl-1-propylindolin-2-ylidene)ethylidene)cyclohex-1-en-1-yl)oxy)phenyl)-5,5-difluoro-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide iodide (BBIR): ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 7.91 (s, 2H), 7.86 (d, J = 14.2 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.36 (td, J = 7.4, 1.4 Hz, 2H), 7.33–7.14 (m, 6H), 7.12 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 6.82 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 6.54 (dd, J = 4.3, 1.9 Hz, 2H), 6.20 (d, J = 14.2 Hz, 2H), 4.14 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 2.83 (t, J = 6.1 Hz, 4H), 2.11 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 1.90 (h, J = 7.2, 6.8 Hz, 4H), 1.39 (s, 12H), 1.06 ppm (t, J = 7.4 Hz, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-d) δ 172.0, 162.7, 161.6, 144, 142.3, 141.4, 140.9, 134.76, 133.1, 130.9, 128.8, 128.0, 125.3, 122.2, 122.0, 118.8, 115.1, 111, 100.7, 100, 49.1, 47, 28, 24.7, 22.7, 20.9, 11.7 ppm. HRMS (ESI⁺): m/z calculated for C₅₁H₅₄BF₂N₄O⁺: 787.43533, found: 787.43699.

10-(6-(((E)-2-((E)-2-(3,3-Dimethyl-1-propyl-3H-indol-1-ium-2-yl)vinyloxy)-2-(3,3-dimethyl-1-propylindolin-2-ylidene)ethylidene)cyclohex-1-en-1-yl)oxy)naphthalen-2-yl)-5,5-difluoro-5H-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-4-ium-5-uide iodide (BNIR): ¹H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 8.06–7.91 (m, 7H), 7.66 (dd, J = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.57 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.33 (td, J = 7.6, 1.5 Hz, 2H), 7.26–7.04 (m, 6H), 6.93 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 6.55 (dd, J = 4.2, 1.9 Hz, 2H), 6.18 (d, J = 14.2 Hz, 2H), 4.11 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 2.86 (t, J = 6.1 Hz, 4H), 2.15 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.88 (h, 4H), 1.30 (s, 12H), 1.05 ppm (t, J = 7.4 Hz, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, Chloroform-d) δ 172.0, 163.6, 159.0, 147.2, 144, 142.3, 141.7, 141, 135.6, 135.0, 131.7, 131.7, 130.7, 130.2, 128.8, 128.6, 127.7, 125.2, 122.4, 122.2, 118.7, 118.1, 110.9, 109.7, 100.6, 99.9, 49.0, 46.3, 28, 24.8, 21.2, 20.9, 11.8 ppm. HRMS (ESI⁺): m/z calculated for C₅₅H₅₈BF₂N₄O⁺: 837.45098, found: 837.45457.

UV-Vis absorption and fluorescence spectra were measured in a CARY 50 BIO (Varian) spectrophotometer and a CARY Eclipse (Varian) Fluorescence spectrophotometer respectively. All the samples were measured in a 1 cm quartz cell at 20 ± 1 °C. Sample concentrations in the order of 10⁻⁷ M were used to ensure the absorbance was below 0.08 and minimize fluorescence reabsorption. Emission quantum yields were measured using rhodamine 6G in methanol (φ = 0.93)³⁶ as standard for the emission of the BODIPY, and the precursor cyanine IR780 in methanol (φ = 0.076)³⁷ for the emission of the cyanine moiety. Measurements were done in triplicate, with standard deviations around 6 × 10⁻⁴. A smoothing algorithm (polynomial regression with Gaussian density function weights) was used to improve the visibility of the low intensity emissions. All smoothed functions were compared with the originals to ensure that the form and intensity of the spectra were conserved. The raw data was used for all calculations. The fluorescence quantum yield of the molecules was calculated with Equation (1)

$$\phi_M = (\phi_S * I_M * A_S) / (A_M * I_S) (n_M^2 / n_S^2) \quad (1)$$

where the subscript *M* denotes the sample and the subscript *S* denotes the standard, φ is the fluorescence quantum yield, *I* is the integrated fluorescence emission, *A* is the sample absorbance and *n* is the refractive index of the solvents used.

Fluorescence lifetimes were measured using the time correlated single photon counting (TCSPC) method. A picosecond laser (LDH-D-C-485, 482 nm, PicoQuant) was used to irradiate the samples in a 1 cm quartz cell, using a microscope objective (NA = 0.25). The fluorescence was collected through the same objective and focused in a single photon avalanche diode (PD-050-CTE, Micro Photon Devices) connected to a TCSPC system (PicoHarp 300, PicoQuant), synchronized with the laser repetition rate. The traces were obtained using time bins of 16 picoseconds. A long pass filter was used to eliminate residual excitation photons and a second filter was used to isolate the detection region. The intensity of the pulses was adjusted to ensure that less than 1% of the excitation events resulted in detection of a fluorescence photon. No signal was detected with blank solutions.

The time traces were analyzed with the SymphoTime 64 software (PicoQuant), using the Levenberg-Marquardt iteration algorithm. The experiments were carried out with concentrations in the order of 10⁻⁷ M, using band pass filters (NewPort) of 520 nm for the emission of the BODIPY and 600 nm for the emission of the charge transfer state. The cyanine emission was measured using a 700 nm long pass filter. The instrument response function was measured using Allura Red in methanol (τ ≈ 10 ps).³⁸

Human lung adenocarcinoma (SK-LU-1) cells were provided by the National Cancer Institute (USA). Cells were seeded onto glass

coverslips coated with poly-L-lysine, cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 μM L-glutamine, 100 U/mL penicillin G, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin sulfate and were maintained at 37 °C in CO₂ (5%, v/v) for 48 hrs. The control and 25 μM cells were stained without further treatment. A second group of cells were treated with a 50/50 mix of glycerol and culture medium for 30 min prior to staining. The third group were treated with BKM-120 (150 μM) for 24 hrs prior to staining to induce apoptosis.

The staining was done just before the imaging. The cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), incubated with 1.5 mL of a freshly prepared solution of BNIR in DMSO for 30 min, rinsed with the PBS solution and mounted in a glass slide. Control cells, glycerol and BKM-120 treated cells were stained with a 100 μM solution of BNIR. A second group of non-treated cells were stained with a 25 μM solution of BNIR.

The images were obtained with a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), with a size of 1024 × 1024 pixels and a 12-bit depth. A 63x oil immersion objective was used. The software was programmed to take four images in tandem: two using a 488 nm excitation and detecting first at 500–550 nm and second at 750–800 nm; the third image was obtained using a 633 nm excitation and detecting at 750–800 nm; the fourth was the brightfield image. The image processing and analysis were done using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). The Image Calculator option was used to calculate the emission intensity ratio images.

Acknowledgements

This work was supported by CONACyT (Grants Fronteras de la Ciencia 179, CB 220392 and PhD scholarship 273459). We thank I.Q. Luis Velasco Ibarra and Dr. María del Carmen García González for their support in the characterization of the molecules. We also thank the Unidad de Imagenología, IFC, UNAM and Dr. Ruth Rincon Heredia for help with the microscopy images.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: charge transfer · energy transfer · fluorescence spectroscopy · fluorescent probes · photophysics

- [1] H. R. Petty, *Microsc. Res. Tech.* **2007**, *70*, 687–709.
- [2] J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 906–918.
- [3] T. Ueno, T. Nagano, *Nat. Methods* **2011**, *8*, 642–645.
- [4] K. Sühling, P. M. W. French, D. Phillips, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 13–22.
- [5] M. A. Haidekker, T. P. Brady, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 398–399.
- [6] A. Pietraszewska-Bogiel, T. W. J. Gadella, *J. Microsc.* **2011**, *241*, 111–118.
- [7] Z. Yang, J. Cao, Y. He, J. H. Yang, T. Kim, X. Peng, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4563–4601.

- [8] H. Sunahara, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5597–5604.
- [9] J. Jiang, X. Tian, C. Xu, S. Wang, Y. Feng, M. Chen, H. Yu, M. Zhu, X. Meng, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 3645–3648.
- [10] H. Zhu, J. Fan, H. Mu, T. Zhu, Z. Zhang, J. Du, X. Peng, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35627, 1–10.
- [11] M. Cardamone, N. K. Puri, *Biochem. J.* **1992**, *282*, 589.
- [12] Y.-D. Zhuang, P.-Y. Chiang, C.-W. Wang, K.-T. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8124–8128; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 8282–8286.
- [13] H. Xiao, P. Li, W. Zhang, B. Tang, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 1588–1593.
- [14] E. M. Kosower, *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 259–266.
- [15] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3899–4032.
- [16] S. Hattori, K. Ohkubo, Y. Urano, H. Sunahara, T. Nagano, Y. Wada, N. V. Tkachenko, H. Lemmetyinen, S. Fukuzumi, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 15368–15375.
- [17] M. T. Whited, N. M. Patel, S. T. Roberts, K. Allen, P. I. Djurovich, S. E. Bradforth, M. E. Thompson, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 284–286.
- [18] F. Song, X. Peng, E. Lu, Y. Wang, W. Zhou, J. Fan, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4817–4820.
- [19] B. Ozmen, E. U. Akkaya, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9185–9188.
- [20] R. Ghosh, A. Nandi, D. K. Palit, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 7661–7671.
- [21] H. Chong, E. Fron, Z. Liu, S. Boodts, J. Thomas, J. N. Harvey, J. Hofkens, W. Dehaen, M. Van der Auweraer, M. Smet, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 4687–4699.
- [22] T. Yamane, K. Hanaoka, Y. Muramatsu, K. Tamura, Y. Adachi, Y. Miyashita, Y. Hirata, T. Nagano, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2227–2236.
- [23] E. Zhang, S. Luo, X. Tan, C. Shi, *Biomaterials* **2014**, *35*, 771–778.
- [24] P.-A. Bouit, F. Spänig, G. Kuzmanich, E. Krokos, C. Oelsner, M. A. Garcia-Garibay, J. L. Delgado, N. Martin, D. M. Guldi, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9638–9645.
- [25] J. E. Lovelock, *Biochem. J.* **1954**, *56*, 265–270.
- [26] M. T. Burger, S. Pecchi, A. Wagman, Z.-J. Ni, M. Knapp, T. Hendrickson, G. Atallah, K. Pfister, Y. Zhang, S. Bartulis, K. Frazier, S. Ng, A. Smith, J. Verhagen, J. Haznedar, K. Huh, E. Iwanowicz, X. Xin, D. Menezes, H. Merritt, I. Lee, M. Wiesmann, S. Kaufman, K. Crawford, M. Chin, D. Bussiere, K. Shoemaker, I. Zaror, S.-M. Maira, C. F. Voliva, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 774–779.
- [27] M. Kollmannsberger, K. Rurack, U. Resch-Genger, J. Daub, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 10211–10220.
- [28] A. Yu, C. A. Tolbert, D. A. Farrow, D. M. Jonas, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 9407–9419.
- [29] M. C. Rezende, *Journal of Physical Organic Chemistry* **2016**, *29*, 460–467.
- [30] S. Raut, J. Kimball, R. Fudala, H. Doan, B. Malwal, N. Sabnis, A. Lacko, I. Gryczynski, S. V. Dzyuba, Z. Gryczynski, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 27037–27042.
- [31] F. A. S. Chipem, A. Mishra, G. Krishnamoorthy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 8775–8790.
- [32] M. L. Horng, J. A. Gardecki, A. Papazyan, M. Maroncelli, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17311–17337.
- [33] M.-C. Speranza, M. O. Nowicki, P. Behera, C.-F. Cho, E. A. Chiocca, S. E. Lawler, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20189, 1–9.
- [34] 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, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9181–9185.
- [35] N. Jiang, J. Fan, F. Xu, X. Peng, H. Mu, J. Wang, X. Xiong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2510–2514; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 2540–2544.
- [36] D. Magde, R. Wong, P. G. Seybold, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 327–334.
- [37] G. Chapman, M. Henary, G. Patonay, *Anal. Chem. Insights* **2011**, *6*, 29–36.
- [38] R. Chib, S. Shah, Z. Gryczynski, R. Fudala, J. Borejdo, B. Zelent, M. G. Corradini, R. D. Ludescher, I. Gryczynski, *Meas. Sci. Technol.* **2016**, *27*, 1–6.

Manuscript received: June 27, 2018

Accepted manuscript online: October 3, 2018