



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

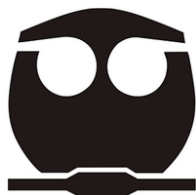
**“SÍNTESIS Y ANÁLISIS DE SONDAS FLUORESCENTES PARA
MICROSCOPIA DE IMAGEN”**

T E S I S

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

PRESENTA

PALACIOS SERRATO EVA GUADALUPE



Ciudad Universitaria, CD.MX.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: JOSÉ LUZ GONZÁLEZ CHÁVEZ
VOCAL: JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA
SECRETARIO: ARTURO JIMÉNEZ SÁNCHEZ
1er. SUPLENTE: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
2° SUPLENTE: BRAULIO VÍCTOR RODRÍGUEZ MOLINA

**EL PROYECTO SE DESARROLLÓ EN EL INSTITUTO DE QUÍMICA.
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA. UNAM.**

ASESOR DEL TEMA: ARTURO JIMÉNEZ SÁNCHEZ

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: RICARDO DAVID FLORES CRUZ

(nombre y firma)

SUSTENTANTE: EVA GUADALUPE PALACIOS SERRATO

(nombre y firma)

Contenido

Abreviaturas	III
Resumen	1
1.-Introducción	2
2.-Antecedentes	
2.1.-Fluorescencia.....	4
2.1.1.-Procesos fotofísicos y fotoquímicos.....	8
2.2.-Sondas fluorescentes.....	9
2.2.1.-Sondas de microambiente local.....	14
2.3.-Microscopía de fluorescencia.....	17
3.-Hipótesis	18
4.-Objetivos	
4.1.-Objetivo general.....	18
4.2.-Objetivos particulares.....	18
5.-Discusión de resultados	
5.1.-Síntesis y caracterización	25
5.2.-Caracterización óptica por espectroscopía de estado basal	32
5.3.-Bioimagen por microscopía confocal	41
6.-Conclusiones	42
7.-Sección experimental	
7.1.-Reactivos e instrumentación	43

7.2.-Procedimiento

Ácido 2-(4-dimetilamino-2-hidroxibenzoil) benzoico (Pr1)	44
Perclorato de 9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo (Pr2)	45
Perclorato de 9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-4-(3-(4-(dimetilamino) fenil) aliliden)-1,2,3,4-tetrahidroxixantilo (RCin)	45
6-amino-2-(2-aminoetil)-4 <i>H</i> -benzoisoquinolina-1,3(2 <i>H</i>)-diona (Naph).....	46
Perclorato de 9-(2-((2-(6-amino-1,3-dioxo-1 <i>H</i> -benzo[de]isoquinolin-2(3 <i>H</i>)- il)etil)carbamoil)fenil)-6-(dimetilamino)-4-(3-(4-(dimetilamino)fenil)aliliden)- 1,2,3,4-tetrahidroxantilo (RCN)	46

8.-Metodología analítica

8.1.-Espectroscopía óptica.....	47
8.2.-Microscopía confocal	47
Anexo I	74
Anexo II	75

Abreviaturas

δ	Desplazamiento
μ	Momento dipolar
λ	Longitud de onda
a.u.	Unidades arbitrarias
CDCl_3	Cloroformo deuterado
d	Señal doble
DCM	Diclorometano
dd	Señal doble de dobles
DMF	<i>N,N'</i> -Dimetilformamida
$\text{DMSO-}d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
ESI+	Ionización por electrospray
ESIPT	Transferencia inter-/intramolecular de protón en el estado excitado
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier.
g	Gramo
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
m	Señal múltiple
m/z	Relación entre masa y carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
mL	Mililitro
ms	Milisegundos
ns	Nanosegundos
ppm	Partes por millón
ps	Picosegundos

RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Señal simple
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina
UV	Ultravioleta

Resumen

La búsqueda de nuevas aplicaciones de sondas fluorescentes en el marcaje celular, así como la optimización de su síntesis y propiedades fotofísicas, constituyen un reto en la actualidad. Debido a la heterogeneidad de los sistemas vivos, se busca que esas sondas sean específicas, estables, de baja toxicidad, sensibles al medio y con respuesta independiente de la concentración de las mismas en las muestras.

En este proyecto se realizó la síntesis de una sonda fluorescente a partir de dos fluoróforos. Mediante una reacción de condensación¹ entre un anhídrido naftálico y etilendiamina se obtuvo un fluoróforo de alto rendimiento cuántico de fluorescencia (**Naph**). Por medio una reacción tipo Wittig entre un derivado de rodamina y cinamaldehído se consiguió un segundo fluoróforo de propiedades fotofísicas modulables (**RCin**). Estos dos fluoróforos se conjugaron mediante una reacción de sustitución con el fin de obtener un derivado fluorescente que conserve las propiedades de cada uno en una misma estructura (**RCN**).

Se realizó la caracterización de cada molécula por medio de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C, espectrometría de masas, espectrofotometría de infrarrojo por transformada de Fourier y espectroscopía de absorción y emisión. Se realizaron experimentos en células de adenocarcinoma de pulmón humano (SK-LU-1) para demostrar su funcionalidad como sondas fluorescentes en el marcaje de este tipo de muestras.

1.- Introducción

La importancia de monitorear la dinámica molecular y organelar a nivel subcelular radica en que la célula es la unidad estructural y funcional básica de la vida² y, por ende, todo el microambiente en esta determinará la funcionalidad del cuerpo al que pertenece.

¹ Smith, M. and March, J. March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanism, and Structure. 6th ed. Wiley- Interscience a John Wiley & Sons, Inc., USA, **2007**, 1429.

² Saladin, S. La unidad entre forma y función. Anatomía y fisiología. 6th ed. Mc Graw Hill Education. México, **2013**, 79.

La célula está delimitada, al igual que sus organelos, por una membrana compuesta de proteínas, glúcidos y lípidos diversos. La principal función de dicha membrana es seleccionar las moléculas que deben entrar y salir de la célula, es por eso que para lograr un monitoreo u observación de un cambio dentro de ella, se requieren sensores sensibles, específicos, con respuestas rápidas y de fácil manejo. En este contexto, el uso, así como el desarrollo de sondas fluorescentes ha experimentado un gran avance e impacto en las últimas décadas.³

Las sondas fluorescentes pueden proporcionar mucha información acerca de las membranas biológicas, como la fluidez, interacciones proteínas-lípidos, difusión traslacional, permeabilidad, cambios estructurales y potencial de membrana; además de proveer información acerca del pH, viscosidad, concentración iónica, dinámica y estado de oxidación-reducción interno de vesículas y organelos, adicionalmente, permiten su visualización óptica y diferenciación.⁴

Dentro de la célula, la mitocondria junto con el núcleo, son organelos indispensables para su equilibrio y supervivencia. La mitocondria es la responsable de producir ATP como generador de energía, del metabolismo central y de la apoptosis. Por ello, nuestro enfoque va encaminado a la síntesis de moléculas que se dirijan a mitocondria, ya sea para diferenciarla o para monitorear cambios en dicho organelo.

Disminuir la toxicidad, aumentar la fotoestabilidad, no emitir en longitudes de onda menores a 400 nm (con el fin de evitar interacciones con la fluorescencia propia de la célula), emitir en el infrarrojo cercano y tener larga vida de fluorescencia representan aún un reto para el desarrollo de las sondas fluorescentes mitocondriales. Otro factor importante para desarrollar sondas fluorescentes es el rendimiento cuántico de fluorescencia que se define como la fracción de moléculas excitadas que fluorescen y es dependiente de las condiciones de su entorno.

³ Zhu, H.; Fan, J.; Du, J. and Peng, X. Fluorescent Probes for Sensing and Imaging within Specific Cellular Organelles. *Acc. Chem. Rev.* **2016**, 49, 2115-2126.

⁴ Valeur, B. *Molecular Fluorescence. Principles and applications.* 2th ed. WILEY-VCH.Germany. **2002**, 12.

2.- Antecedentes

2.1.- Fluorescencia

En términos concretos, la palabra “fluorescencia” se refiere a un proceso de emisión de un fotón de un estado electrónicamente excitado, siendo una transición permitida por espín. La fluorescencia, así como la fosforescencia, son casos particulares de luminiscencia; la cual es una emisión de fotones en la región electromagnética de ultravioleta, visible o infrarrojo, provenientes de especies en estado electrónicamente excitado y a diferencia de la incandescencia, no está promovida por temperatura.⁵

Dependiendo del tipo de excitación, la luminiscencia se clasifica en:

- Fotoluminiscencia: Se divide en fluorescencia y fosforescencia y es causada por absorción de luz.
- Radioluminiscencia: Mecanismo de emisión de fotones al emplear radiación ionizante como método de excitación.
- Electroluminiscencia: Inducción de campo eléctrico para excitar una molécula y que ésta emita fotones.
- Termoluminiscencia: Luminiscencia obtenida por un calentamiento previo de la molécula a la administración de energía.
- Químio-luminiscencia: Obtención de luminiscencia mediante un proceso químico.
- Bioluminiscencia: La emisión de fotones implica un proceso bioquímico.
- Triboluminiscencia: Las fuerzas electrostáticas y de fricción son las causantes de la radiación
- Sonoluminiscencia: Proceso de emisión de fotones mediante el empleo de ultrasonidos.⁶

En particular, la fotoluminiscencia es la emisión de fotones resultante de la interacción de la luz con la materia y se presenta como fosforescencia, fluorescencia o fluorescencia tardía. La manera más común de reconocer

⁵ Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and applications. 2th ed. WILEY-VCH.Germany. **2002**, 3.

⁶ Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and applications. 2th ed. WILEY-VCH.Germany. **2002**, 4.

físicamente la diferencia entre fosforescencia y fluorescencia son los tiempos de vida de los estados excitados, pues las emisiones de fluorescencia tienen tiempos de vida de ca. 10^{-7} a 10^{-9} segundos, mientras que las emisiones de fosforescencia tienen vidas útiles relativamente largas, ca. 10^{-3} a 10 segundos.⁷

Específicamente, la fluorescencia es la emisión de fotones acompañada de la relajación de un estado excitado singulete a un estado singulete de menor energía ($S_1 \rightarrow S_0$), que al producirse a partir de S_1 , sus características no dependen de la longitud de onda de excitación (excepto polarización) y de acuerdo con la Regla de Stokes, la longitud de onda de una emisión de fluorescencia debe ser mayor que la de absorción. La fosforescencia, por su parte, es la transición de un estado triplete T_1 a un estado singulete de menor energía S_0 y su espectro es localizado a longitudes de onda mayores que el espectro de fluorescencia, porque la energía de los niveles vibracionales más bajos del estado triplete T_1 es menor que la del estado singulete S_1 .⁸

Para que una molécula pueda emitir es necesario que ocurra una excitación a través de la absorción de luz para generar los subsecuentes procesos fotoquímicos y/o fotofísicos. La absorción de luz, en un proceso fisicoquímico, es la transición de un fotón de un estado de energía basal o fundamental (S_0) a un estado excitado ($S_{n>0}$), es decir, la molécula aumenta su energía. Es preciso entender que sólo se absorberá la energía necesaria para que ocurra el cambio de estado fundamental a estado excitado, pero que cada molécula al poseer estados excitados particulares presentará un espectro de absorción específico a una longitud de onda.⁹

Si la excitación electrónica tiene lugar en cualquier estado por encima del primer singulete excitado, el decaimiento se producirá, generalmente, en el estado de singulete excitado más bajo, sin embargo, la energía que ha sido absorbida, no siempre va a regresar al estado basal en forma de emisión de fluorescencia.

⁷ Narayanaswamy, R. Some studies using molecular fluorescence and fluorescence techniques in trace analysis. *Imperial College of Science and Technology*. London. **1972**, 2.

⁸ Valeur, B. *Molecular Fluorescence. Principles and applications*. 2th ed. WILEY-VCH. Germany. **2002**, 41.

⁹ Harris, D. *Quantitative Chemical Analysis*. 8th ed. W. H. Freeman and Company. USA. **2010**, 413.

Existen otras posibles rutas de decaimiento donde la energía absorbida es empleada o se ve interrumpida por interacciones con otras moléculas en el estado excitado (figura 1),¹⁰ originando que la energía absorbida sea mayor que la energía de emisión. Adicional a esto, existen parámetros ambientales físicos y químicos que pueden afectar la fluorescencia de una molécula, como son los puentes de hidrógeno, el pH, la presión, la viscosidad, la temperatura, los apagadores como oxígeno molecular (atmosférico), el potencial eléctrico, los iones y la polaridad.

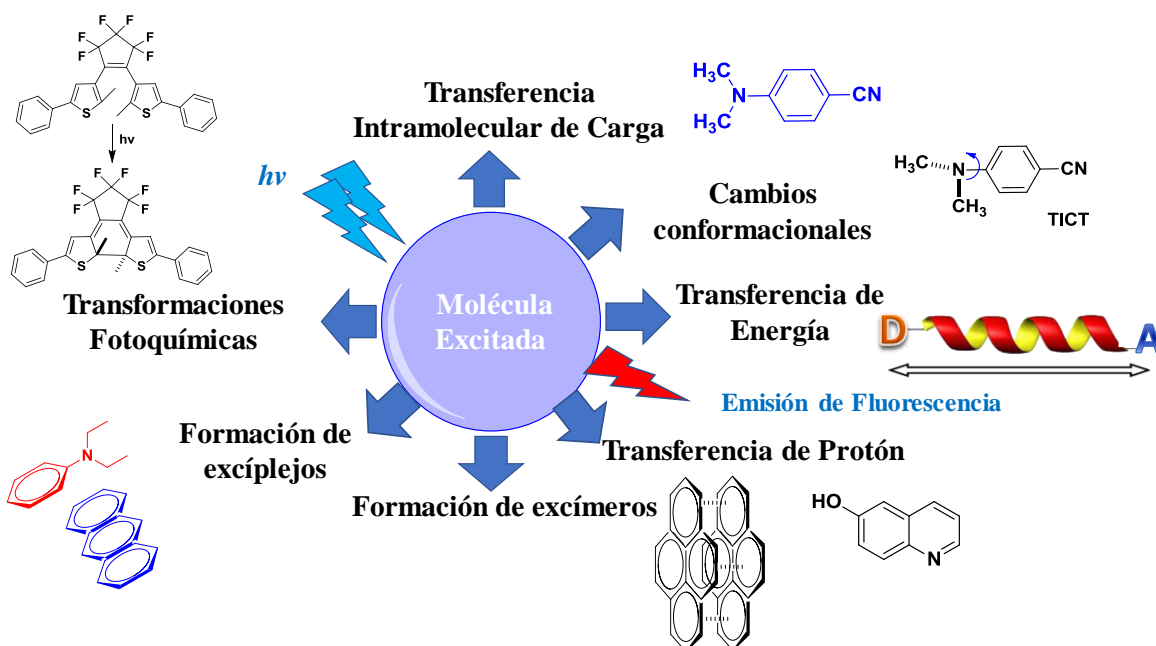


Figura 1.-Posibles procesos de decaimiento para moléculas excitadas.

2.1.1.-Procesos fotofísicos y fotoquímicos

Los electrones pueden moverse de un estado de energía basal o fundamental (S_0) a un estado excitado (S_1) o de mayor energía, si se suministra energía en forma de luz, descrita por la ecuación $E = h\nu$, entonces está sucediendo un proceso de absorción. Los niveles de energía de una molécula son cuantizados, así que la cantidad de energía requerida para pasar de un nivel a otro es específica para cada molécula y sólo la luz con longitud de onda correspondiente a esta cantidad

¹⁰ Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and applications. 2th ed. WILEY-VCH.Germany. 2002, 12.

de energía provocará que los electrones se promuevan a un nivel de mayor energía.¹¹

La longitud de onda de la luz UV absorbida por una molécula es determinada por la diferencia de energía electrónica entre los orbitales de la molécula; dicha energía y movimiento electrónico están determinados por dos tipos de orbitales, el orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO por sus siglas en inglés) y el orbital molecular no ocupado de menor energía (LUMO por sus siglas en inglés).¹² En los fenómenos de absorción, la energía de transición electrónica de un orbital de no enlace a un orbital de antienlace es en el orden de $n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$, donde $n \rightarrow \pi^*$ es la transición de un electrón desde el orbital HOMO a LUMO y los electrones conservan el spin de estado basal.¹³ La transición de un electrón a un orbital molecular de antienlace frente a la excitación es de aproximadamente 10^{-15} segundos en comparación con las vibraciones moleculares (del orden de 10^{-10} a 10^{-12} segundos).¹⁴

De acuerdo con el principio de Franck-Condon, la transición ocurre cuando las distancias entre los núcleos son iguales a las longitudes de enlace de la molécula en estado basal al equilibrio, finalizando donde la línea vertical cruza la curva de energía potencial del estado excitado más bajo. Tan pronto como la transición se completa, la molécula excitada comienza a vibrar (*figura 2*).¹⁵ Las transiciones electrónicas son rápidas, relativas al movimiento nuclear, por lo que cada átomo tiene casi la misma posición y momento antes y después de una transición.

En general, la diferencia que existe entre los niveles vibracionales es similar tanto para el estado basal como para el excitado, por lo que el espectro de fluorescencia a menudo se asemeja a la primera banda de absorción. La brecha

¹¹ Smith, M. and March, J. March's advanced organic chemistry. Reactions, mechanisms and structure. 6th ed Wiley-Interscience a John Wiley & Sons, Inc., Publication. USA. **2007**, 329.

¹² Wade, L. Organic Chemistry. 8th ed. Pearson Education. USA. **2013**, 696.

¹³ Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and applications. 2th ed. WILEY-VCH.Germany. **2002**, 21.

¹⁴ Kariuki, P. Some studies in analytical luminiscence spectrometry. Imperial College of Science and Technology. London. **1977**, 11.

¹⁵ Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and applications. 2th ed. WILEY-VCH.Germany. **2002**, 30.

entre el máximo de la primera banda de absorción y el máximo de fluorescencia es llamada “desplazamiento de Stokes”, *figura 2.*¹⁶

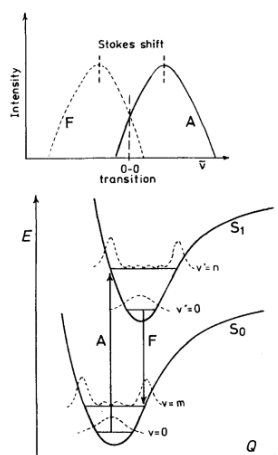


Figura 2.-Diagramas de energía potencial con transición vertical; Principio de Franck-Condon.

Una transición electrónica tiene mayor probabilidad de ocurrir sin cambios en las posiciones de los núcleos en la entidad molecular y su entorno, generando un “estado de Franck-Condon” dando lugar a la denominada “transición vertical”. En el diagrama de la *figura 2*¹⁷ la distancia internuclear (en una molécula diatómica) está representada como una curva de energía potencial en función de la configuración nuclear; la forma de dichas curvas va a repercutir en la intensidad de las múltiples transiciones vibrónicas, al igual que en la posición relativa de las mismas y como consecuencia, en el ancho de banda del espectro de absorción de un cromóforo ubicado en un microentorno específico debido a la existencia de un conjunto continuo de subniveles vibracionales en cada estado electrónico, resultantes de las fluctuaciones de la estructura de la capa de solvatación que rodea al cromóforo.¹⁸

Cuando al irradiar una molécula con luz sucede un cambio en el estado cuántico de la molécula sin haber un cambio en su naturaleza química se habla de un proceso fotofísico, en contraste, al ocurrir un proceso fotoquímico la molécula

¹⁶ Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and applications. 2th ed. WILEY-VCH.Germany. **2002**, 38.

¹⁷ Klessinger, M. and Michl J. Excited States and photochemistry of organic molecules. VCH. USA. **1995**, 260.

¹⁸ Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and applications. 2th ed. WILEY-VCH.Germany. **2002**, 32.

sufre un cambio en su naturaleza química al ser excitada con luz, pero su estado cuántico no se modifica.

Las vías de decaimiento de una molécula excitada son varias y dependen principalmente del tipo de molécula y de la naturaleza de los estados implicados. Se pueden clasificar en tres procesos principales: procesos radiativos, que implican la emisión de radiación electromagnética desde el estado electrónicamente excitado para regresar al estado fundamental; procesos no radiativos, donde electrones en un estado excitado inicial se transfieren a otro estado sin emitir, y procesos de apagamiento, que implican la transferencia de energía de una molécula excitada inicialmente a otras partículas mediante choques inelásticos.

En la *figura 3* se muestran en color rojo las transiciones electrónicas de absorción (numerales 1 a 4), involucrando estados basales de multiplicidad singulete (S_0) y triplete (T_0) y los correspondientes estados excitados de mayor energía. Las transiciones radiativas se encuentran en azul, implicando estados excitados de multiplicidad singulete (S_1 o S_p) y su correspondiente estado basal (S_0) o estado excitado de menor energía (S_1) y estados excitados de multiplicidad triplete (T_1 o T_q) y su correspondiente estado basal (T_0), o bien, su estado excitado de menor energía (T_1). En color verde se observan las transiciones no radiativas, donde se ven implicados estados basales de multiplicidad singulete (S_p) y triplete en estado excitado (T_q) y los estados basales (S_0 o T_0), estados excitados de menor energía (S_1 o T_1) o entre estados con nivel de energía similar pero diferente multiplicidad.¹⁹

En la absorción de S_0-S_1 y S_0-S_p la transición es permitida y corresponde al principal espectro de absorción electrónica, la transición $S_0 - T_1$ y $S_0 - T_q$ es prohibida, pero puede ser observada mediante fuentes de luz intensa u otros métodos de perturbación, por otro lado, las transiciones $T_1 - T_q$ se presentan comúnmente por fotólisis flash y la transición de absorción $S_0 - S_p$ es observada por fotólisis flash de nanosegundos, donde S_1 es inicialmente poblada por un flash

¹⁹ Birks, J. *Photophysics of Aromatic Molecules*. WILEY-VCH. London. **1970**, 31-32.

de luz intenso de muy baja duración y la absorción transitoria es observada durante el tiempo de vida de excitación de S_1 .

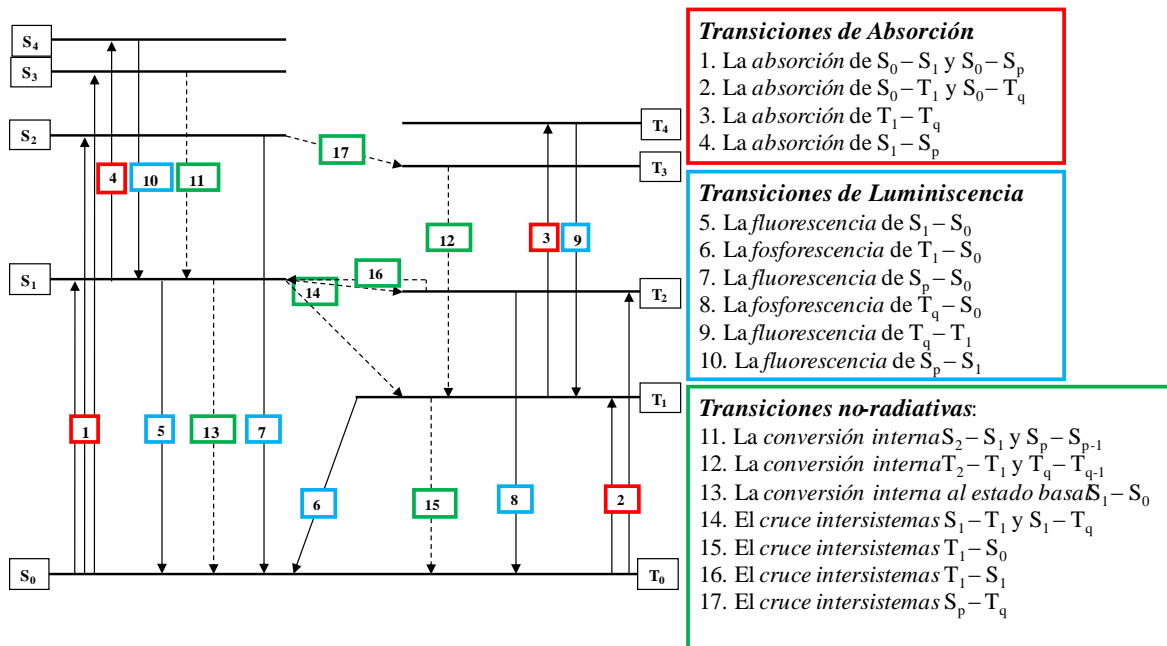


Figura 3.-Diagrama de Jablonsky simplificado; Diagrama de nivel de energía de estado: S es singulete y T es triplete. El estado S_0 y T_0 es el estado fundamental y los números de subíndices identifican estados individuales.

En procesos radiativos, la transición de $S_1 - S_0$ corresponde a un proceso normal de emisión de fluorescencia y es de corta duración ($\sim 1 \cdot 10^3$ ns), la fosforescencia ocurre en la transición de $T_1 - S_0$ y generalmente es de mayor duración ($\sim 1 \cdot 10^4$ ms) que la fluorescencia porque es una transición prohibida. La fluorescencia $S_p - S_0$ ha sido observada sólo en algunos compuestos como el azuleno, la fosforescencia $T_q - S_0$ ha sido reportada en fluoranteno, pero es un suceso muy improbable. La fluorescencia $T_q - T_1$ corresponde a la absorción inversa $T_1 - T_q$ y ha sido reportada en azuleno y naftaleno y la fluorescencia $S_p - S_1$ es un proceso posible pero no ha sido observado.

Las conversiones internas $S_2 - S_1$ y $S_p - S_{p-1}$ generalmente suceden muy rápido y por lo tanto el rendimiento de fluorescencia es muy bajo, esta misma situación se presenta en la conversión interna de fosforescencia de $T - T_1$ y $T_q - T_{q-1}$. La conversión interna al estado basal $S_1 - S_0$ y el cruce de intersistemas $S_1 - T_1$ y $S_1 - T_q$

constituyen la extinción de S_1 que compite con la fluorescencia normal, mientras que el cruce de intersistemas T_1-S_0 compite con el proceso normal de fosforescencia. El cruce de intersistemas T_1-S_1 podría ocurrir por activación térmica de T_1 durante el tiempo de vida de excitación a un nivel vibracional isoenergético S_1 y el cruce intersistema S_p-T_q de estados singuletes excitados de mayor energía han sido observados en algunos compuestos.²⁰

En la *figura 4* se presentan las formas de radiación electromagnética ordenadas de acuerdo a su longitud de onda en cm^{-1} y energía en kJ/mol , observándose que a mayor longitud de onda la radiación es menos energética y de menor frecuencia. Las radiaciones de mayor frecuencia y energía son ionizantes, ya que cuando interactúan con la materia generan partículas con carga, mientras que las radiaciones no ionizantes conducen a transiciones electrónicas, en el caso de la radiación ultravioleta, a vibraciones moleculares por radiación infrarrojo, movimiento rotacional por microondas o transiciones de espín nuclear por ondas de radio. El espectro visible de luz para el ojo humano va desde 400 a 700 nm, estas longitudes las percibimos como colores, donde cada longitud de onda corresponde a un color, el rojo es el de mayor longitud de onda y el violeta el de menor longitud, la luz blanca es observada cuando todas las ondas se ven juntas.²¹

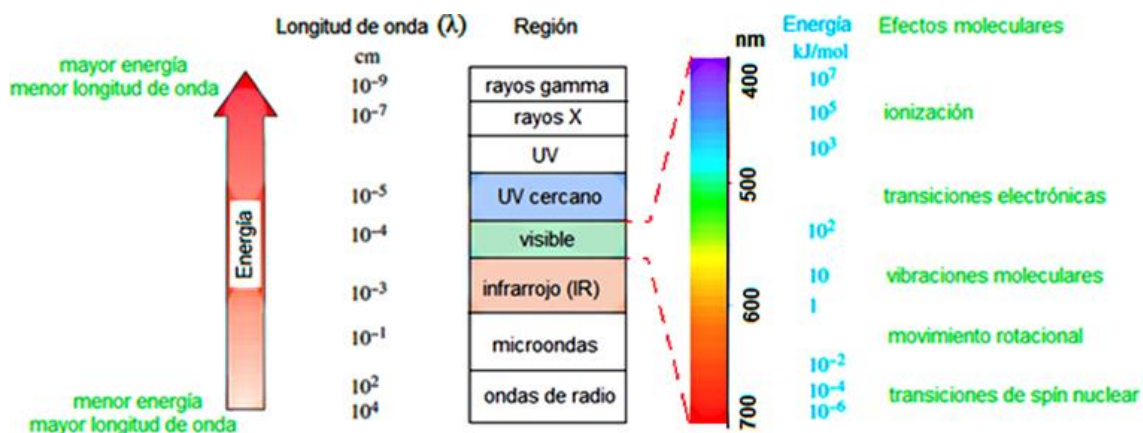


Figura 4.- Espectro electromagnético.

²⁰ Birks, J. Photophysics of Aromatic Molecules. WILEY-VCH. London. 1970, 32.

²¹ Wade, L. Organic Chemistry. 8th ed. Pearson Education. USA. 2013, 515.

2.2.-Sondas fluorescentes

Debido a la gran cantidad de variables proporcionadas por el ambiente en la emisión de fluorescencia, las moléculas fluorescentes son empleadas como sondas en diversas áreas de estudio. En términos generales, una sonda es una herramienta para monitoreo y exploración de un material, objeto o superficies desconocidas y/o los cambios en éstos. Las moléculas también conocidas como “fluoróforos” (figura 5)²² se pueden unir a una molécula diana y actuar como un marcador para el análisis con microscopía de fluorescencia,²³ o bien, tras modificaciones estructurales, reconocer cambios en el entorno en el que se encuentran, presentando así la capacidad de tener una respuesta ante un estímulo y responder a condiciones dinámicas en un ambiente controlado.

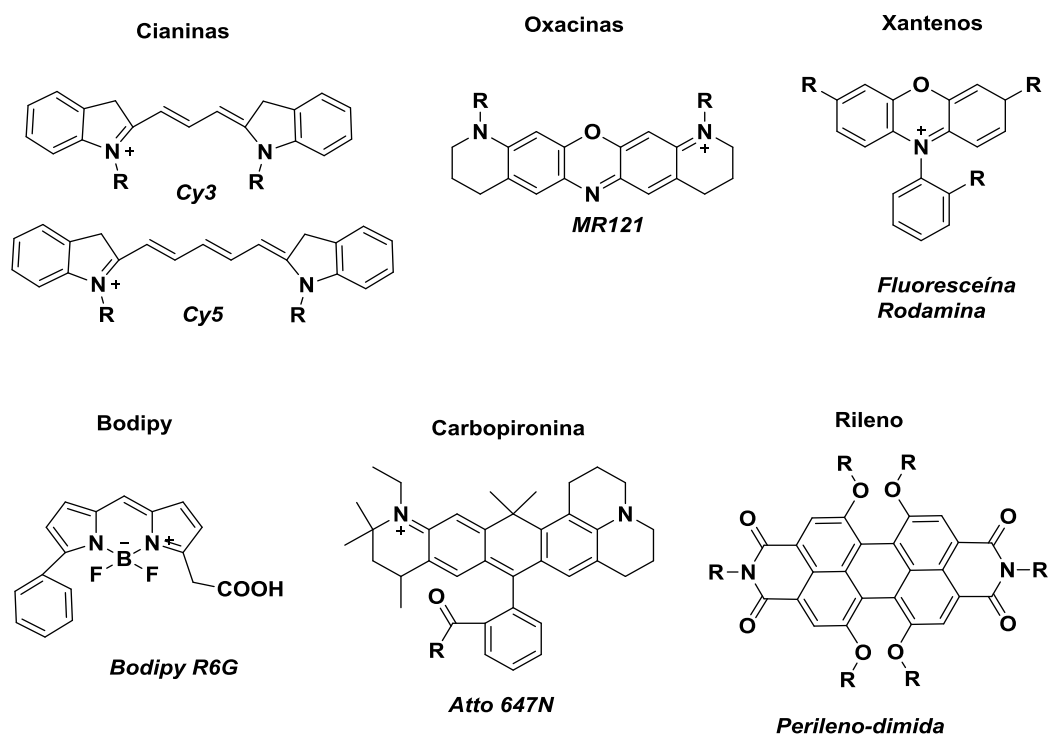


Figura 5.-Estructura química de algunas familias de compuestos fluorescentes.

²² Birk, U. Super-resolution microscopy. A practical guide. 1st ed. Weinheim, Germany:WILEY-VCH. 2017,45.

²³ Punganuru, S.; Madnala H.; Arutla, V.; Zhang, R. and Srivenugopal. Characterization of highly specific NQO1-activated near-infrared fluorescent probe and its application for in vivo tumor imaging. *Sci. Rep. Nature*. 2019, 9:8577.

Para que un fluoróforo pueda ser empleado como sonda fluorescente para imágenes de alta resolución debe ser fotoestable y brillante. El brillo de un fluoróforo se define como el producto del coeficiente de extinción y el rendimiento cuántico de fluorescencia, en microscopía de imagen un fluoróforo brillante favorece la detección y en general aumenta la relación señal a ruido, disminuyendo el tiempo de adquisición.

El rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_f) se define como la fracción de moléculas excitadas que emiten fluorescencia y que al ser una constante física depende de la temperatura y las condiciones del entorno de las moléculas excitadas, describe cuantitativamente la capacidad de un fluoróforo para volver a emitir luz de fluorescencia después de la excitación, esperando que no tenga ningún mecanismo de desconexión competitiva como enfriamiento, relajación de disolvente o transferencia de energía por resonancia.²⁴

2.2.1.-Sondas de microambiente local: polaridad

La emisión de fluorescencia ocurre a longitudes de onda mayores que las de absorción debido a una pérdida de energía, que como ya se había discutido con anterioridad, se ve modificada por varios factores, entre ellos la polaridad. Cuando el soluto está rodeado de moléculas de disolvente, su estado basal y su estado excitado están medianamente estabilizados por las interacciones, generalmente fuerzas débiles o de Van Der Waals soluto-disolvente, dependiendo de la naturaleza química tanto del soluto como del disolvente. En disolución, estas interacciones son resultado de los momentos dipolo permanentes de las moléculas del disolvente o del soluto y de su capacidad de polarizarse o polarizabilidad.²⁵

Las energías de interacción entre la molécula de soluto y las moléculas de disolvente que la rodean son diferentes en el estado fundamental y en el estado excitado, esa diferencia de energías conduce al desplazamiento por disolvente entre los espectros de absorción y emisión. De acuerdo con el principio de Franck-

²⁴ Birk, U. Super-resolution microscopy. A practical guide. 1st ed. Weinheim, Germany:WILEY-VCH. **2017**, 49.

²⁵ Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and applications. 2th ed. WILEY-VCH. Germany. **2002**, 202.

Condon, la configuración de las moléculas de disolvente alrededor de la molécula de soluto no cambia durante la absorción de luz, y la diferencia mencionada anteriormente de la energía de interacción, se refiere a este estado excitado de Franck-Condon y al estado basal de equilibrio. Sin embargo, el estado excitado de Franck-Condon no es en general, el estado de equilibrio más estable para la molécula de soluto excitada. La configuración excitada de equilibrio sólo se alcanza, por ejemplo, por reorientación de las moléculas de disolvente, situación que requiere al menos un tiempo del orden de 10^{-11} s, correspondiente al tiempo de relajación de la rotación molecular.²⁶

Cuando la localización del espectro de absorción y emisión de un compuesto depende de la polaridad del disolvente, la molécula presenta propiedades solvatocrómicas, caracterizadas por el momento dipolar de transición que resulta de la migración de cargas eléctricas durante una transición electrónica.

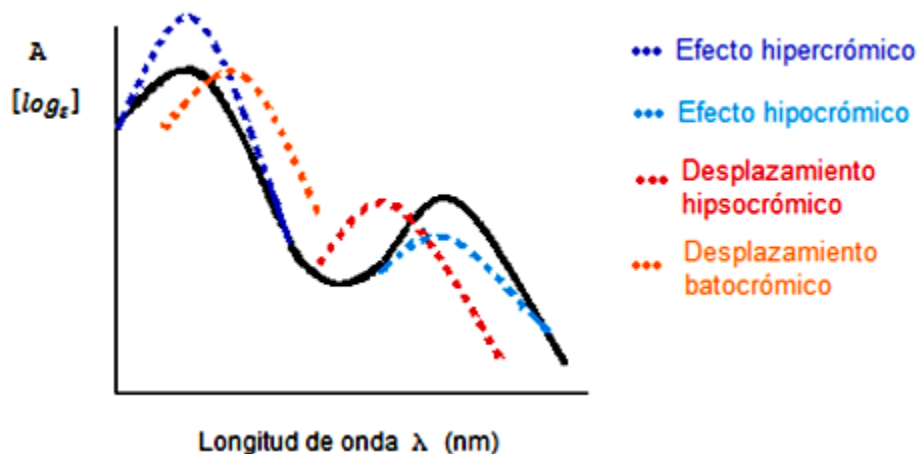


Figura 6.-Tipos de desplazamientos en un espectro de absorción.

Como se observa en la *figura 6*, los desplazamientos más comunes en un diagrama de absorción o emisión respecto a la longitud de onda pueden ser: batocrómico, hacia longitudes de onda mayores (hacia rojo lejano), hipsocrómico, hacia longitudes de onda menores (hacia el azul), hiperocrómico, cuando hay un aumento en la intensidad de señal o hipocrómico, cuando es una disminución de

²⁶ Mataga, N.; Kaifu, Y. and Koizumi, M. Solvent Effects upon Fluorescence Spectra and the Dipolemoments of Excited Molecules. *BCSJ*. **1956**, 29:4, 465-470.

la intensidad de señal. Un cambio batocrómico y un cambio hipsocrómico con aumento de la polaridad del disolvente pertenecen al solvatocromismo positivo y negativo, respectivamente.

Cuando un fluoróforo es excitado, el exceso de energía vibracional es rápidamente cedido al disolvente, si se excita al segundo estado singulete S_2 , y se descompone rápidamente al estado S_1 en 10^{-12} s debido a la conversión interna, los efectos del disolvente cambian esta emisión a niveles de energía aún más bajos a causa de la estabilización del estado excitado por las moléculas polares del disolvente.

Típicamente el fluoróforo tiene un momento dipolo más grande en el estado excitado μ_ϵ que en el estado basal μ_G , después de la excitación los dipolos del disolvente pueden reorientar o relajar alrededor de μ_ϵ , lo cual baja la energía del estado excitado, resultando así, en el aumento de la polaridad del disolvente y en la emisión a longitudes de onda mayores con menor energía, como se representa en la *figura 7*.²⁷

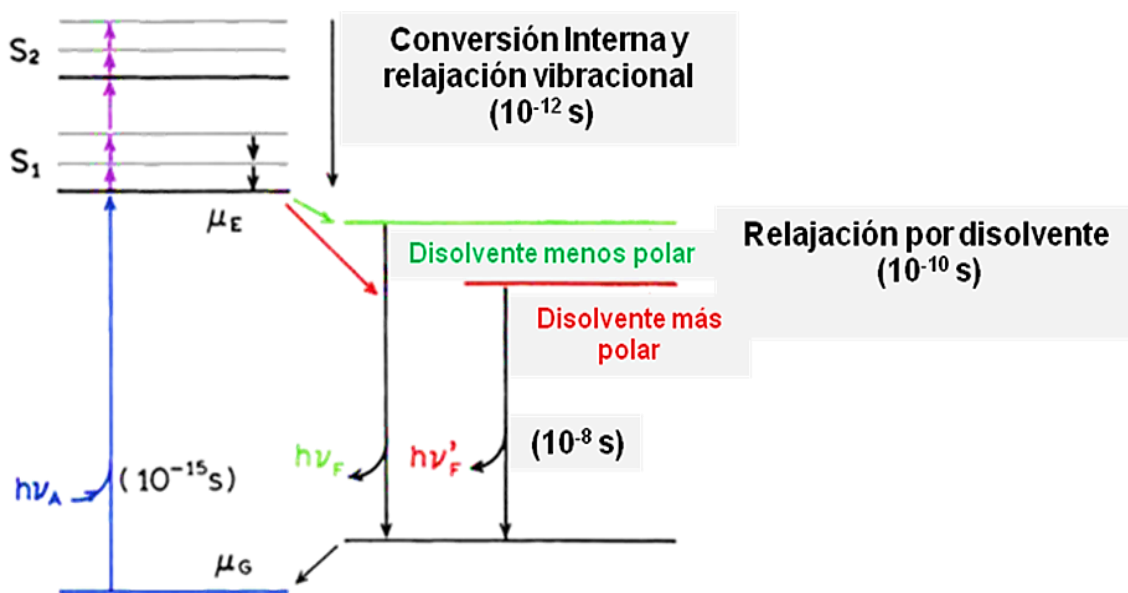


Figura 7.-Diagrama de Jablonski para un proceso de relajación de fluorescencia por efecto del disolvente.

²⁷ Lakowicz, J. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed.; Singapore; Springer . 2006,205

Como se observa en la *figura 7*, la absorción de luz se produce en aproximadamente 10^{-15} segundos, un tiempo muy corto para el movimiento del fluoróforo o disolvente, la molécula está expuesta al mismo ambiente local en los estados basal y excitado y el fluoróforo en estado excitado está expuesto al ambiente relajado, que contiene moléculas de disolvente orientadas alrededor del momento dipolar, es por eso que los espectros de absorción son menos sensibles a la polaridad del disolvente que los espectros de emisión.²⁸ Otro factor a considerar en los fenómenos de solvatación son los enlaces de hidrógeno que se pueden formar ocasionando cambios drásticos en los espectros de absorción de fluorescencia. La densidad electrónica de un heteroátomo, en el caso de las transiciones $n \rightarrow \pi^*$, disminuye la excitación y como consecuencia también la capacidad de formar puentes de hidrógeno. El efecto en absorción debería ser similar al resultante de una disminución en el momento dipolar tras la excitación y un desplazamiento a longitudes de onda menores en el espectro, esperando que a mayor fuerza de los enlaces de hidrógeno, mayor sea el desplazamiento.

Comúnmente la vida útil de fluorescencia es mucho mayor (1 a 10 ns) que el tiempo requerido para la relajación por disolvente, el cual es de 10 a 100 ps para disolventes fluidos a temperatura ambiente, por este motivo los espectros de emisión de los fluoróforos son representativos del disolvente en estado relajado.

La fluorescencia emitida desde un estado singulete siempre será menos sensible a la habilidad de un disolvente a formar puentes de hidrógeno en fenómenos de absorción. Por otro lado, en las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ ha sido observado que el heteroátomo de un heterociclo es más básico en el estado excitado que en el estado basal, ocasionando que el hidrógeno se enlace con mayor fuerza a la molécula excitada que en el estado basal.²⁹

El tiempo de vida de fluorescencia de un fluoróforo es mayor en disolventes apróticos, de alrededor de 14 a 15 ns, en comparación con disolventes próticos, menores a 1 ns. Un cambio en la habilidad del disolvente para formar puentes de hidrógeno, puede afectar la naturaleza del estado singulete más bajo $n \rightarrow \pi^*$ contra

²⁸ Lakowicz, J. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed.; Singapore; Springe . 2006,206.

²⁹ Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and applications. 2th ed. WILLEY-VCH.Germany. 2002, 218.

$\pi \rightarrow \pi^*$, la inversión de estos estados se puede observar cuando en los disolventes la polaridad y la fuerza de los enlaces de hidrógeno aumenta, porque el estado $n \rightarrow \pi^*$ cambia a una energía más alta, mientras que el estado $\pi \rightarrow \pi^*$ cambia a una energía más baja, dando como resultado un aumento en el rendimiento cuántico de fluorescencia y un desplazamiento del espectro hacia longitudes de onda mayores, pues como ya se ha discutido con anterioridad, la emisión radiativa de los estados $n \rightarrow \pi^*$ es menos eficiente que la de los estados $\pi \rightarrow \pi^*$.³⁰

La polaridad del disolvente puede tener un efecto muy drástico en la emisión de espectros, en la *figura 8* imagen A) se observa la emisión de la molécula Prodan en disolventes de polaridad creciente, el color cambió de azul ($\lambda_{\text{máx}}=440-470$ nm) en tolueno, a verde amarillento en acetona ($\lambda_{\text{máx}}=520-550$ nm) y a naranja en metanol ($\lambda_{\text{máx}}=600$ nm); esta molécula presenta todos los requisitos espectroscópicos deseados para aplicaciones biológicas; absorción en el espectro visible (> 400 nm) alto coeficiente de absorción, alto rendimiento cuántico de fluorescencia, fotoestabilidad y además un solvatocromismo fuerte, la imagen D) de la misma figura presenta las estructuras de los derivados estructurales de Prodan, los cuales exhiben un solvatocromismo y coeficiente de absorción dos veces mayor que su análogo, una absorción de dos fotones dos veces más grande, absorción y emisión de desplazamiento al rojo y mayor fotoestabilidad, en B) se presenta la ecuación lineal que describe el cambio del momento dipolar en el estado excitado, donde v_ϵ es la energía de emisión máxima y v_a la energía de absorción, la pendiente es Δf que involucra a la constante dieléctrica ϵ y al índice refractario del medio n , al momento dipolo de la molécula excitada (μ_ϵ), al momento dipolo de la molécula en estado basal (μ_g/g) con la constante de Planck (h), la velocidad de la luz (c) y el volumen de una esfera con radio a y una constante C . En C) de la misma imagen se observa el aumento de los desplazamientos de Stock en los derivados estructurales de Prodan (FR0 y FR8) respecto a la polarizabilidad, empleando disolventes apróticos.³¹

³⁰ Valeur, B. *Molecular Fluorescence. Principles and applications*. 2th ed. WILEY-VCH, Germany. **2002**, 221.

³¹ Kucherak, O.; Didier, P.; Mély, Y. and Klymchenko, A. „Fluorene analogues of prodan fluorescence brightness and solvatochromism. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 1, 616–620.

Debido al complejo acoplamiento de muchas interacciones y procesos dinámicos, el fenómeno de solvatochromismo sigue siendo en parte desconocido. Con el estudio de la molécula Prodan se ha podido correlacionar este fenómeno con modificaciones estructurales inducidas por disolventes, efectos de polarización, solubilidad, interacciones de enlaces de hidrógeno soluto-disolvente y agregación de solutos. La interacción compleja entre disolvente-solvente y los fuertes efectos de la formación de puentes de hidrógeno no sólo pueden conducir a grandes cambios solvatoacrómicos, también pueden afectar la naturaleza de las especies fluorescentes reduciendo su rendimiento cuántico de fluorescencia.³²

Los sitios de solubilización de las sondas extrínsecas son determinados por su identidad química y las interacciones específicas resultantes que pueden ser estabilizadas dentro la región o sistema a explorar.³³

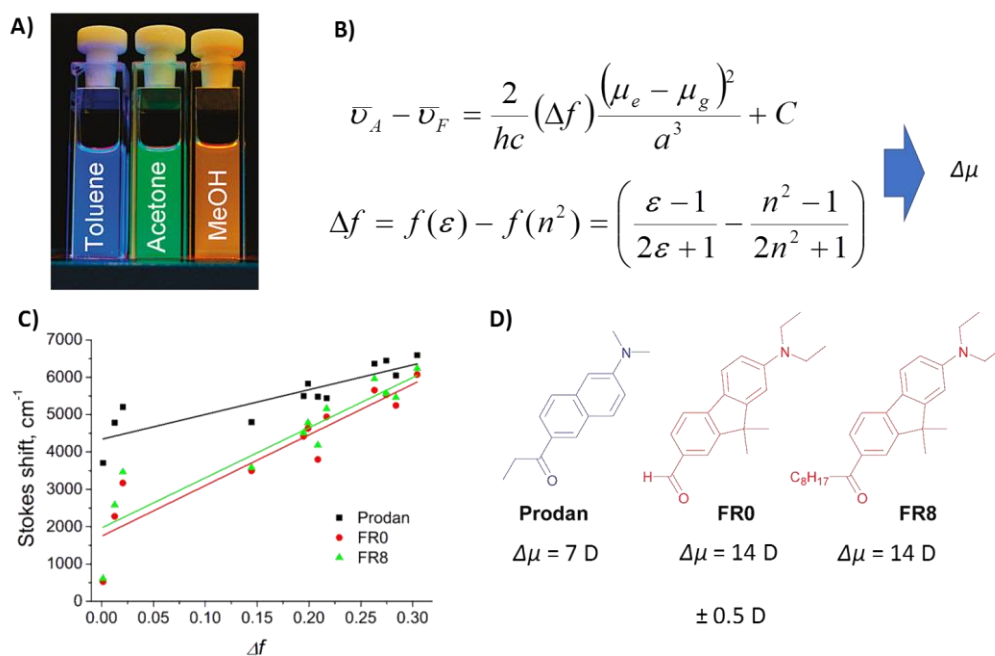


Figura 8.-A) Solvatochromismo de Prodan en tres disolventes, **B)** Ecuación de Lippert para el cálculo de momento dipolar de una molécula en estado excitado, **C)** Gráfica de desplazamiento de Stokes contra la función de orientación de polarizabilidad de Prodan, FR0 y FR8 en disolventes apróticos y **D)** Estructuras de Prodan y los dos derivados sintetizados por Kucherak y colaboradores³¹

³² Marini, A.; Muñoz, L.; Biancardi, A. and Menucci, B. What is solvatochromism?. *J. Phys. Chem. B.* **2010**, 114, 51.

³³ Valeur, B. *Molecular Fluorescence. Principles and applications.* 2th ed. WILEY-VCH. Germany. **2002**, 14

2.5.-Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es un método eficaz y útil cuando se requiere lograr la localización específica de una estructura y un contraste al medio en el que se encuentra, además de ser una herramienta que facilita significativamente las aplicaciones de bioimagen de compartimentos celulares. El empleo de sondas fluorescentes es crucial en esta técnica por su alta sensibilidad, especificidad, rápida respuesta y fácil uso, además de su amplia versatilidad, pues pueden proporcionar visualización directa e información dinámica relativa a la localización y cantidad de biomoléculas de interés³⁴, haciendo uso de nanocristales semiconductores, proteínas fluorescentes o moléculas orgánicas.

Los fluoróforos orgánicos pueden formar enlaces covalentes o no covalentes con la muestra a ser analizada, produciendo los respectivos conjugados o complejos que pueden mostrar fluorescencia de longitudes de onda cortas hasta longitudes muy largas, dependiendo del marcador usado.³⁵

Se han propuesto diferentes técnicas para la discriminación de sondas fluorescentes en microscopía de fluorescencia, como son la fotoactivación por isomerización *cis-trans* de fluoróforos o saturación de transiciones electrónicas como por agotamiento de la emisión estimulada (STED). En estas técnicas el fluoróforo presenta un estado en el que ya no puede ser excitado o puede serlo, pero no emite fluorescencia en el canal de detección.³⁶ Por medio de este análisis se pretende obtener sondas fluorescentes con rendimiento cuántico de fluorescencia de 1.0.

Un problema común con la microscopía de fluorescencia convencional y confocal es el fotoblanqueo de los fluoróforos. Un fluoróforo blanqueado puede provocar fototoxicidad y reacciones químicas adicionales, además de limitar el tiempo de grabación ocasionando daño irreversible a las células vivas y afectando las observaciones microscópicas.

³⁴ Zhu ,H.; Fan, J.; Du, J. and Peng X. Fluorescent Probes for sensing and imaging within specific cellular organelles. *Acc. Chem. Res.* **2016**, 49, 2115-2126.

³⁵ Samerio, M. Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chemical Reviews*, **2009**, 109:1.

³⁶ Birk, U. Super-resolution microscopy. A practical guide. 1st ed. Weinheim, Germany:WILEY-VCH. **2017**, 12.

Un gran número de parámetros influyen en la actividad de la fluorescencia y en principio cualquier proceso que tenga un efecto en la emisión de fluorescencia puede aplicarse como mecanismo de contraste. La sección transversal de absorción donde los fluoróforos generalmente se optimizan para producir máxima intensidad de fluorescencia, depende de la configuración de los electrones en la molécula, pero también de su orientación con respecto al estado de polarización con respecto a la luz incidente.

La excitación del fluoróforo está dada por su rendimiento cuántico de fluorescencia, un cambio en éste es observado en dos esquemas de contraste de decaimiento de emisión: el apagamiento y la energía de transferencia de energía. El apagamiento sucede cuando un fluoróforo puede colocarse en una configuración química o estructural, de tal manera que la configuración electrónica sea desfavorable para la emisión de fluorescencia, mientras que la transferencia de energía ocurre cuando la configuración estructural se da cuando un fluoróforo forma un sistema electrónico conjunto con un fluoróforo vecino, este fenómeno es altamente improbable cuando la distancia entre las dos moléculas es del orden de nanómetros, lo cual resulta en el apagamiento de la fluorescencia y la banda de emisión que se observa corresponde a otro tipo de molécula.

La emisión de fluorescencia es un proceso mecánico cuántico, de naturaleza estocástica y que puede ser cuantizada donde el número de fotones de fluorescencia detectados sigue una distribución de Poisson. La vida útil de una partícula capaz de convertir la luz absorbida en fluorescencia es finita, como la molécula sufre una serie de transiciones entre el estado excitado y el estado basal, existe la probabilidad de que aquella se disocie, sufra cambios electrónicos (ionización) o reacciones químicas alternas, es decir, la molécula tiende a perder la intensidad de fluorescencia por un proceso conocido como blanqueamiento (*figura 9*), que a menudo es inducido por la iluminación de una muestra con excitación de luz o bien, por la adición de fluoróforos en un ambiente químico adecuado, cuando las moléculas sufren una descomposición química por la excitación con luz, entonces sucede la fotólisis.

El tiempo de vida útil de fluorescencia, el tiempo de vida del estado triplete y el tiempo de estado radical, son factores que caracterizan la emisión de fluorescencia y que son empleados como mecanismos de contraste en microscopía de fluorescencia.³⁷

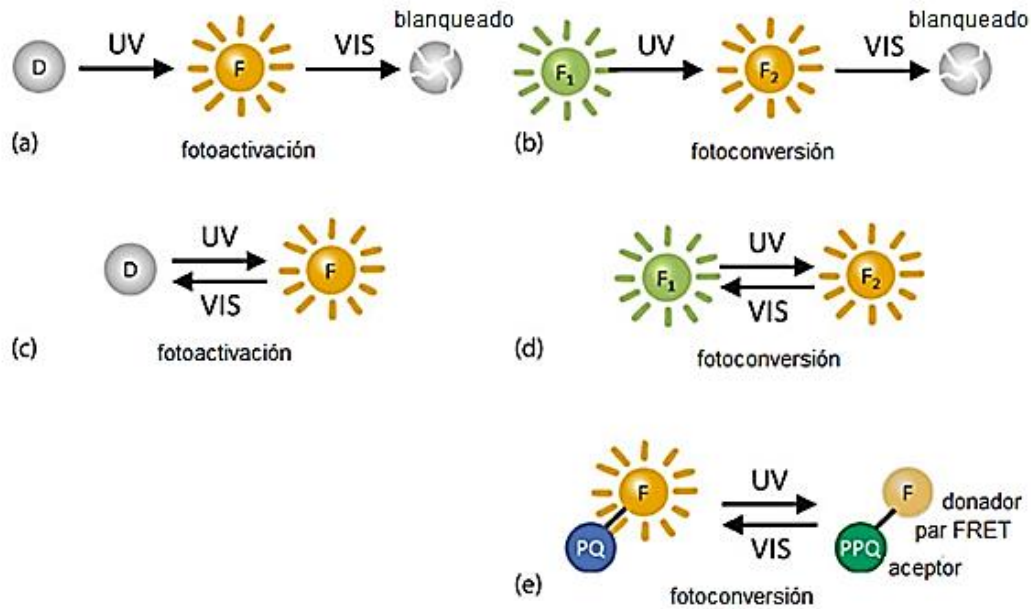


Figura 9.- Mecanismos de fotointerrupción más comunes.

Los mecanismos de fotointerrupción pueden o no inducir a un blanqueamiento de la molécula fluorescente,³⁸ en la *figura 9* se observan distintos mecanismos de intercambio de fotones empleados en microscopía de fluorescencia de super resolución; (a) representa la fotoactivación por medio de radiación ultravioleta de una molécula no fluorescente en estado oscuro (D) a un estado fluorescente (F), que al ser irradiado con luz visible conduce a su blanqueamiento, (b) es el cambio de un estado fluorescente F₁ a un estado fluorescente F₂, que al ser estimulado con luz visible se blanquea, este proceso es conocido como fotoconversión. En la imagen (c) y (d) ocurren la fotoactivación y fotoconversión reversibles, respectivamente, lo que significa que al irradiar el estado fluorescente F₁ o F₂ no ocurrirá blanqueamiento de la molécula.

³⁷ Birk, U. Super-resolution microscopy. A practical guide. 1st ed. Weinheim, Germany:WILEY-VCH. 2017, 38-42.

³⁸ Birk, U. Super-resolution microscopy. A practical guide. 1st ed. Weinheim, Germany:WILEY-VCH. 2017, 67.

En (e) de la misma figura se presenta otro tipo de fotoconversión, haciendo uso de fotointerruptores en un sistema FRET, por ejemplo, los fluoróforos en estrecha proximidad a un extintor fotocromico (PQ) pueden ser apagados o “prendidos” mediante la formación de un fotoproducto (PPQ) con desplazamiento al rojo, generado por la iluminación con luz UV.

Los fluoróforos empleados en técnicas microscópicas que dependen de fluorescencia, deben estar protegidos de las reacciones químicas que pueden destruir o descomponer al compuesto. Los fluoróforos en estado excitado presentan mayor inclinación en su estructura con el fin de reaccionar con otras moléculas biológicas, por lo tanto, el proceso de blanqueamiento es más probable que afecte a los fluoróforos en su estado excitado que en su estado basal.

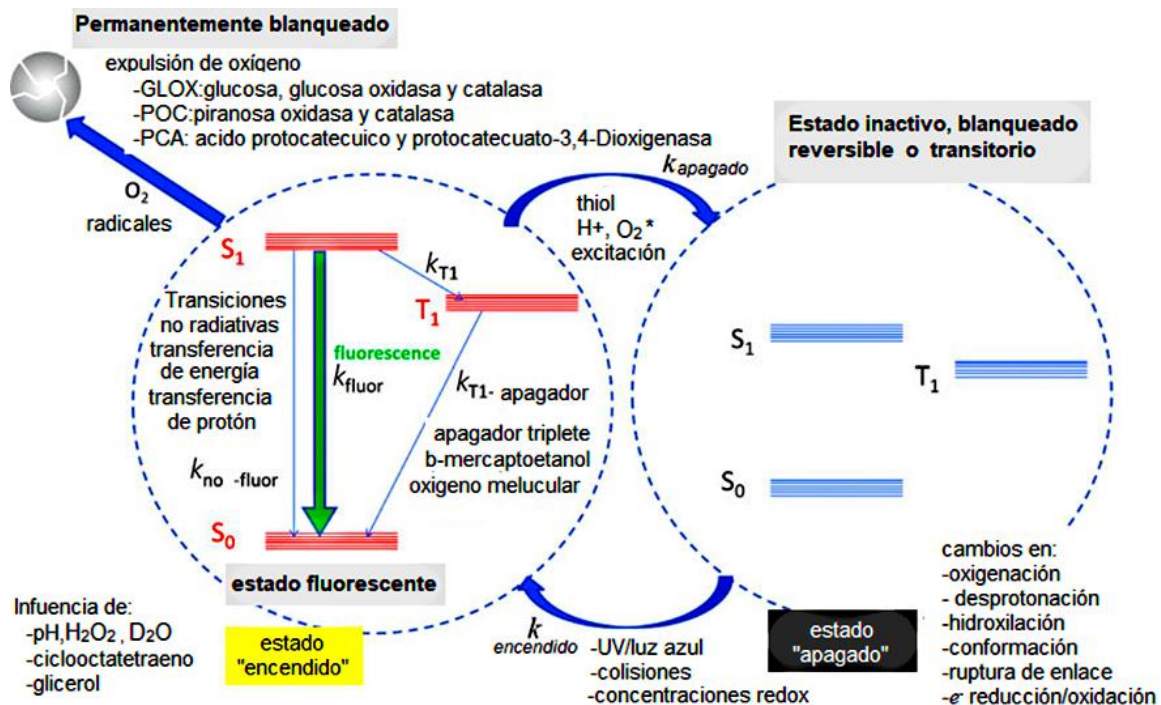


Figura 10.-Esquema simplificado de la transición de un fluoróforo de su estado encendido a su estado apagado por intervención del microambiente.

Los principales causantes del fotoblanqueo son el oxígeno molecular y radicales libres, no obstante, el cambio de una molécula fluorescente de su estado encendido a inactivo o apagado puede ser el resultado de un cambio conformacional o el efecto de una asociación o disociación de un grupo funcional

químico, como una desprotonación, oxigenación o hidroxilación del fluoróforo, dando como resultado una molécula no fluorescente o con cambios en su absorción o espectro de emisión, siendo así que la transición puede ir acompañada de un cambio en los niveles de energía electrónica o de un cambio relativo en las constantes de velocidad de las tasas de transición (*figura 10*).³⁹

³⁹ Birk, U. Super-resolution microscopy. A practical guide. 1st ed. Weinheim, Germany:WILEY-VCH. **2017**, 45.

3.- Hipótesis

Es posible desarrollar sondas fluorescentes para cuantificar el estatus de salud mitocondrial y su comunicación interorganelar mediante observables fisicoquímicos como la polaridad.

4.- Objetivos

4.1.- Objetivo general

Realizar la síntesis y caracterización química de sistemas moleculares fluorescentes de diseño fotofísico.

4.2.- Objetivos particulares

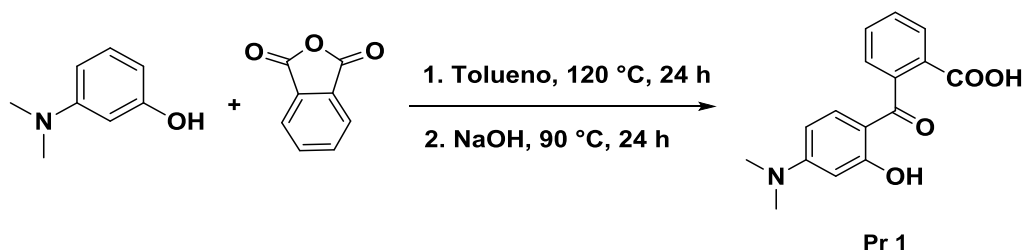
- Llevar a cabo la síntesis y caracterización de un fluoróforo de alto rendimiento cuántico de fluorescencia.
- Sintetizar un derivado fluorescente con propiedades fotofísicas modulables, es decir, altamente dependiente de las propiedades del medio local, como polaridad o microviscosidad.
- Llevar a cabo la conjugación de ambos fluoróforos y estudiar las propiedades fotofísicas de dicho conjugado, tales como absorción UV-Vis y fluorescencia.
- Caracterizar el conjugado fluorescente.
- Realizar un estudio *in vitro* mediante microscopía confocal en líneas celulares bajo diferentes estímulos de alteración de membranas subcelulares.

5.- Discusión de Resultados

5.1.- Síntesis y caracterización

La síntesis de un primer fluoróforo se realizó a partir de dos compuestos previos, conocidos en este escrito como **Pr1** (precursor 1) y **Pr2** (precursor 2).

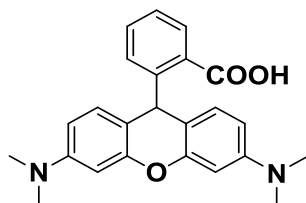
Se sintetizó inicialmente el ácido 2-(4-(dimetilamino)-2-hidroxibenzoil)-benzoico (**Pr1**) mediante una modificación a la reacción de acilación de Friedel-Crafts entre 3-(dimetilamino) fenol y 2-benzofuran-1,3-diona (anhídrido ftálico).



Esquema 1.-Síntesis de ácido 2-(4-dimetilamino-2-hidroxibenzoil) benzoico (Pr1)

La síntesis de dicho producto se realizó en dos fases. En la primera fase de reacción se obtuvo un intermediario cargado y la posible formación de un derivado de rodamina color morado (*esquema 1.1*). En la segunda fase de reacción, una vez evaporado el tolueno, se realizó la hidrólisis del intermediario, así como de la rodamina formada, empleando hidróxido de sodio al 35 % m/m. El avance de reacción se monitoreó por cromatografía de capa fina (TLC) y una vez terminada, se neutralizó por adición de ácido clorhídrico hasta llegar al punto de precipitación máxima. El producto crudo se purificó mediante recristalización por par de disolventes MeOH: H₂O, obteniendo un sólido cristalino color violeta.

La zona aromática del espectro de RMN ¹H (*espectro 1.1*) de **Pr1** mostró dos pares de dobletes a 6.90 y 6.08 ppm y a 8.10 y 7.36 ppm atribuibles a los hidrógenos 5 y 6 del anillo trisustituido y a los hidrógenos 3 y 6 del ácido benzoico respectivamente, un par de tripletes en 7.63 y en 7.53 ppm, correspondientes a los hidrógenos en la posición 5 y 4 del ácido benzoico y un singulete a 12.44 ppm, señal del hidrógeno del grupo ácido, la zona alifática del mismo espectro mostró un singulete a 3.03 ppm que corresponde a los metilos del grupo amino.



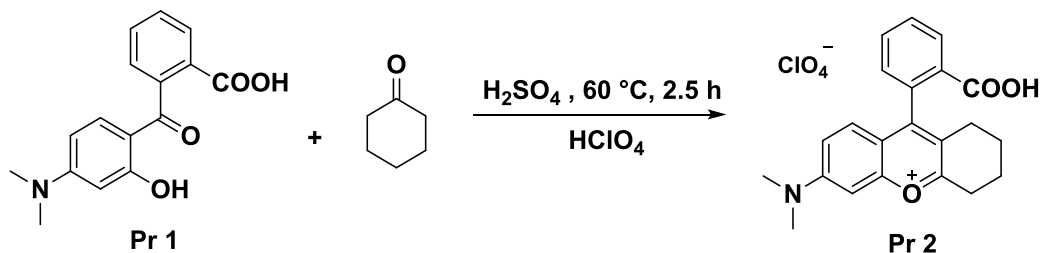
Esquema 1.1.-Posible rodamina formada en la primera fase de la reacción de síntesis de **Pr1**.

El espectro de RMN ^{13}C , (*espectro 1.2*) puso en evidencia los 16 carbonos que presenta la molécula **Pr1**, observándose que los carbonos alifáticos de los metilos del grupo amino proporcionaron señales a frecuencias de 39.98 ppm, los carbonos del grupo carbonilo a 198.25 y 170.24 ppm y los metinos de los anillos aromáticos presentaron desplazamientos desde 97.78 hasta 165.61 ppm. En el espectro de IR (*espectro 1.3*) se observó una banda ensanchada a 3195.67 cm^{-1} característica del grupo OH, cercana a ésta se identificó la señal correspondiente al enlace N-CH₃ atribuible al grupo amino trisustituido del grupo benzoilo de la molécula. La masa exacta calculada para C₁₆H₁₅NO₄ fue de 285.1001, mientras que el espectro de masas (ESI m/z) evidenció la masa de 286.1298 (*espectro 1.4*), por lo anterior se asumió que el producto obtenido era igual que el esperado. Como análisis complementario se realizó RMN de dos dimensiones para comprobar la asociación de los protones entre si y los protones con los carbonos correspondientes.

Se observó que **Pr1** presenta propiedades colorimétricas y de solubilidad en función del pH, pues al disminuir el pH se encuentra en su forma ácida, y el compuesto resultante es color café y al aumentar el pH se encuentra en su forma ionizada (color violeta), además de los cambios de color observados se presentan fenómenos de equilibrios simultáneos entre pH y solubilidad.

Mediante una reacción de condensación aldólica de **Pr1** con ciclohexanona se sintetizó perclorato de 9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo (**Pr2**), como se muestra en el *esquema 2*, la reacción se montó a 0 °C para evitar que sucedieran reacciones de condensación cetona-cetona entre la ciclohexanona, además de añadir en el orden específico los reactivos, primero **Pr1** y por último la ciclohexanona, fue monitoreada cada hora mediante TLC y se determinó un tiempo de reacción de 2.5 horas, pues los reactivos se habían consumido por completo. El producto se obtuvo mediante precipitación con ácido

perclórico y se purificó mediante cristalización con acetona, obteniendo así un sólido iridiscente rojo-verde (*espectro 2.1*). Se observó la esterificación de **Pr2** si el precipitado se recristalizaba en metanol (*espectro 2.2*).



Esquema 2.-Síntesis de perclorato de 9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo (Pr2)

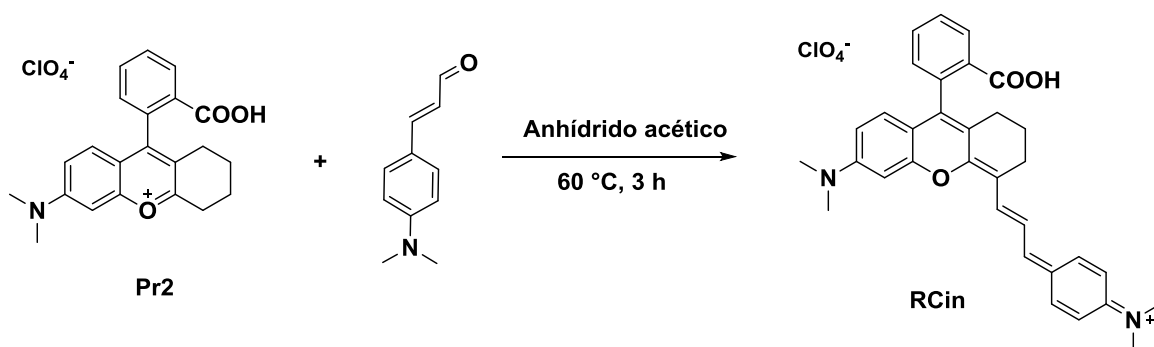
El espectro de RMN ^1H (*espectro 2.1*) de **Pr2** presentó dos pares de multipletes de 1.79 a 1.75 ppm y de 2.00 a 1.95 ppm atribuibles a los hidrógenos 3 y 2 de los metilenos del ciclohexeno, dos tripletes a 3.13 y 2.29 ppm, correspondientes a los hidrógenos de los metilenos 1 y 4 del mismo anillo, además se aprecian señales muy parecidas a las observadas en RMN ^1H de **Pr1** con ligeros desplazamientos, debido a la presencia del grupo oxonio y el hexano en la estructura de **Pr2**.

Por medio del espectro de RMN ^{13}C (*espectro 2.3*) se observaron 22 señales, unas de ellas muy cercanas debido a la similitud del entorno químico del carbono desde 134.12 a 117.24 ppm, se observó la señal característica del carbono del ácido alrededor de los 170 ppm y a diferencia del espectro de RMN ^{13}C de **Pr1**, ya no se observa la señal de un grupo cetona. El espectro de IR pone en evidencia los grupos COOH y amina terciaria a longitudes desde 2800 hasta 3570 cm^{-1} , además de presentar una banda a 1278.91 cm^{-1} atribuible al enlace de C-O-C del grupo oxonio en la molécula, los resultados por medio de espectrometría de masas de (ESI m/z) calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_3^+$ 348.1599, se encontró en 348.1862.

Como se discutió con anterioridad, el fenómeno del color se produce cuando una especie química posee en su estructura grupos funcionales o átomos con

capacidad de absorber luz a longitudes de onda específicas.⁴⁰ Cuando la superficie de un objeto presenta irregularidades en magnitudes microscópicas cercanas a las longitudes de onda de la luz, se producen redes de difracción, al pasar la luz por estas redes es dispersada en todas direcciones, que al interferir entre sí, dependiendo del ángulo de incidencia de los rayos, estas se suman produciendo una nueva longitud de onda,⁴¹ lo que conduce al fenómeno de iridiscencia observado en **Pr2**, el cual posee una estructura macroscópica compleja y limitante para la formación de cristales.

En el *esquema 3* se presenta la síntesis planteada para perclorato de 9-(2-carboxifenil)-6(dimetilamino)-4-(3-(4-(dimetilamino)fenil)aliliden)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo (**RCin**). **Pr2** se hizo reaccionar con (*E*)-3-(4-dimetilaminofenil)acrilaldehído mediante una reacción tipo Wittig, en dicha reacción ocurre la formación de un carbanión en la posición alfa al enlace carbonilo en el anillo xanteno y posteriormente un ataque nucleofílico. Ésta reacción se montó en baño de hielo y en atmósfera de argón para aumentar la selectividad, y se observó mediante TLC que al cabo de 3 h la materia prima ya se había consumido en su totalidad. Para purificar el producto se realizó cromatografía en columna empleando mezcla de DCM:MeOH como eluyente, de la cual se obtuvo un sólido de coloración azul-dorada.



Esquema 3.-Síntesis de Perclorato de 9-(2-carboxifenil)-6(dimetilamino)-4-(3-(4-(dimetilamino)fenil) aliliden)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo (**RCin**)

⁴⁰ Contreras, R. El Origen del color en la naturaleza. Una introducción a la química del color. 1° ed. Venezuela. Publicaciones Vicerrectorado Académico CODEPRE **2007**, 27

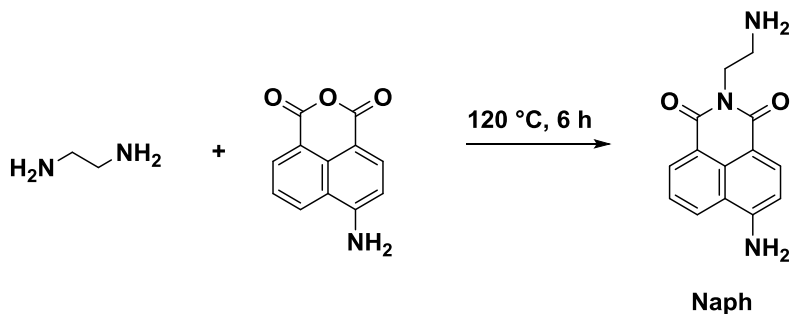
⁴¹ Fenómeno iridiscente, una chispa al futuro **Sin fecha** Recuperado de https://www.feriadelasciencias.unam.mx/antiores/feria22/feria011_02_fenomeno_iridiscente_una_chiospa_al_futuro.pdf

La caracterización por RMN ^1H de **RCin** (*espectro 3.1*) presenta dos tripletes en 7.80 y 7.68 ppm, correspondientes a los protones del carbono 5 y 6 del ácido benzoico respectivamente, además del singulete a 7.05 ppm, atribuible al protón que se encuentra en medio de los grupos oxonio y amino, se presentan también dos dobletes que integran para dos hidrógenos cada uno, con un desplazamiento de 7.43 ppm para los protones 2 y 6 y un desplazamiento de 6.71 ppm para los protones en la posición 3 y 5, correspondientes al anillo bencénico derivado tipo cinnamaldehído, los cuales presentan similitud en su ambiente electrónico y son reconocidos como simétricos por el espectrofotómetro.

Se observan dos singuletes que integran para seis protones cada uno, con un desplazamiento de 2.94 y 2.93 que corresponden a los metilos de los grupos amino en la molécula y tres multipletes que integran para dos protones cada uno y corresponden al hexano vecino al ion oxonio.

En el espectro de RMN ^{13}C (*espectro 3.3*) se observó la señal del carbono del grupo ácido carboxílico a 165.7 ppm, mientras que las señales proporcionadas por los carbonos de los grupos metilo de las aminas sustituidas se observan desde 20 hasta 40 ppm, de 135 a 112 ppm los metilenos de los anillos aromáticos y el enlace C-O-C aromático cercano a 150 ppm. Por su parte, el espectro de IR (*espectro 3.4*) presenta una banda en 1084.64 cm^{-1} particular de los enlaces C-O-C, una señal en 3535.57 cm^{-1} correspondiente al grupo ácido y la banda en 2808.48 cm^{-1} correspondiente al enlace N-CH₃. Por espectrometría de masas (ESI m/z) calculada para $\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_3^+$ 505.2569 y encontrada de 505.2482. Se observó la formación de la especie esterificada de **RCin** durante la reacción (*ver espectro 3.2*), resultando en sólido azul.

El segundo fluoróforo 6-amino-2-(2-aminoetil)-4*H*-benzoisoquinolina-1,3(2*H*)-diona (**Naph**) se sintetizó siguiendo las especificaciones del *esquema 4*. La purificación de este producto se realizó mediante cromatografía en columna obteniendo un sólido naranja-rojizo que al solubilizarse se observaba un color amarillo muy luminoso.



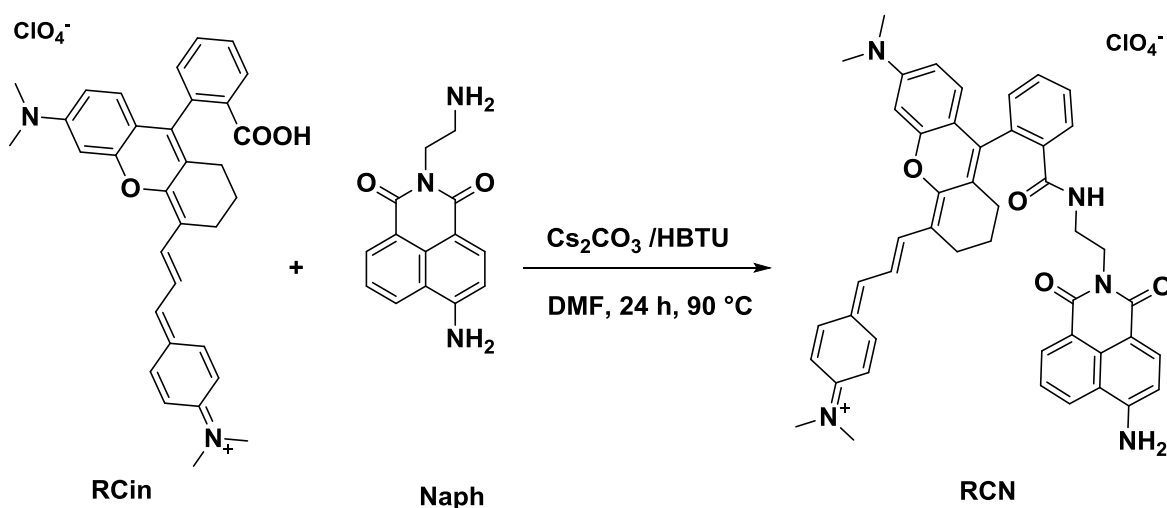
Esquema 4.-Síntesis de fluoróforo 6-amino-2-(2-aminoetil)-4H-benzoisoquinolina-1,3(2H)-diona (Naph)

El espectro de RMN ^1H (*espectro 4.1*) presenta dos tripletes a 2.76 y 4.02 ppm, correspondientes a los protones del carbono 1 y 2 de la cadena alifática de la molécula, además de un tercer triplete con desplazamiento de 7.66 ppm que se atribuye al protón del carbono en la posición 6 del anillo naftálico, las señales atribuibles a los protones vecinos a éste se observan a 8.61 ppm y 8.42 ppm, se presentan también dos dobletes a 6.84 y 8.19 ppm, correspondientes a los protones de los carbonos 1 y 2 del anillo naftálico y una señal en 7.41 ppm correspondiente a los protones de la amina primaria. En el espectro de RMN ^{13}C (*Espectro 4.2*) se observaron 13 señales, las señales en 164.46 y 163.59 ppm corresponden a los carbonos C=O, la señal en 153.09 ppm es atribuible al enlace C-N vecino a los enlaces C=O, las señales correspondientes a los carbonos aromáticos se observaron desde 134.35 hasta 108.14 ppm y a 42.74 ppm el desplazamiento de la señal del carbono unido a una amida.

El espectro de IR (*Espectro 4.3*) pone en evidencia los grupos imida a 1675.40 cm^{-1} y amina primaria a 3495.23 cm^{-1} . El espectro de masas (ESI m/z) mostró una masa calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$, 255.28 y encontrada de 256.108.

La síntesis de perclorato de 9-(2-(2-(6-amino-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-il)etil)carbamoil)fenil)-6-(dimetilamino)-4-(-3-(4-(dimetilamino)fenil)alilideno)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo (**RCN**) se realizó a partir del acoplamiento de **RCin** y **Naph** explorando diversas metodologías propuestas en la bibliografía (*Ver tabla 1*) para finalmente seguir el *Esquema 5* de síntesis, el cual proporcionó mayor rendimiento (40 %). La reacción se monitoreo por TLC y se determinó un tiempo de reacción de 24 horas, donde los reactivos se consumieron en su totalidad. La

purificación del producto crudo se realizó mediante columna cromatográfica DCM:MeOH, obteniendo un sólido café amarillento.



Esquema 5.- Síntesis de perclorato de 9-(2-(2-(6-amino-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-il)etil)carbamoil)fenil)-6-(dimetilamino)-4-(-3-(4-(dimetilamino)fenil)aliliden)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo (**RCN**)

El espectro de RMN ^1H de **RCN** presenta dos tripletes en 7.60 y 7.56 ppm, correspondientes a los protones del carbono 5 y 6 del ácido benzoico, la señal en 7.56 ppm integra para dos protones atribuidos al carbono en la posición 6 del anillo naftálico, también se observa la señal singulete del protón que se encuentra en medio de los grupos oxonio y amino, con un desplazamiento en 6.97 ppm, una señal en 7.41 ppm correspondiente a los protones de la amina primaria unida al anillo aromático de **Naph**, dos dobletes en 7.56 ppm para los protones 2 y 6 y en 6.72 ppm para los protones 3 y 5 correspondientes a los carbonos simétricos del anillo bencénico proveniente del cinnamaldehído, dos tripletes en 3.43 y 2.98 ppm, correspondientes a los protones derivados de la cadena alifática de **Naph**, dos singuletes a 2.94 y 2.61 ppm que integran para 6 protones cada uno y que corresponden a los metilos de los grupos amino provenientes de **RCin**. El espectro de RMN ^{13}C presentó a 169.30 ppm la señal del carbono del ácido benzoico, las señales en 164.90 y 163.91 ppm se atribuyen a los carbonos C=O del grupo imida, mientras que el enlace C-N de este grupo presenta la señal en 152.70 ppm, las señales correspondientes a los metilenos de los anillos aromáticos se observaron

desde 134.93 ppm hasta 105.99 ppm, las señales proporcionadas por los carbonos de los grupos metilo se observan alrededor de 40 a 20 ppm.

El espectro de IR pone en evidencia los grupos COOH (1719.10 cm^{-1}), amina terciaria (3249.27 cm^{-1}), enlace amida (3443.88 cm^{-1}), imida O=C-N-C=O (1687.06 cm^{-1}), C=N (1638.73 cm^{-1}), amina unida a anillo aromático (1377.25 cm^{-1}) y C-O-C (1126.03 cm^{-1}). El espectro de masas (ESI+, m/z) evidenció una masa calculada para $\text{C}_{47}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_4$ de 742.34 y encontrada de 742.3413.

Base	Agente de acoplamiento	Medio de reacción	Condiciones
DIPEA	HBTU	DMF	2 h, T ambiente
DIPEA	HBTU	DMF	1 h, T ambiente
DIPEA	HBTU	DMF	20 h, T ambiente
DIPEA	HBTU	CH_2Cl_2	24 h, T ambiente
Ca_2CO_3	HBTU	DMF	1 h, T amb, 6 h, 90 °C, 13 h, 6 °C
CaCO_3	---	DMF	90 °C, 24 h
DIPEA	EDCI	DMF	90 °C, 24 h

Tabla 1.-Condiciones de reacciones exploradas para la síntesis de 9-(2-(2-(6-amino-1,3-dioxo-1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-il)etil)carbamoil)fenil)-6-(dimetilamino)-4-(-3-(4-(dimetilamino)fenil)aliliden)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo (**RCN**).

En general, la formación de amidas a partir de aminas y ácidos carboxílicos implica la activación del grupo carboxilo, ya sea por la conversión previa a un agente acilante más reactivo, tales como el cloruro de acilo, anhídridos o ésteres activos, o activación *in situ* por el uso de agentes de acoplamiento, tales como el DCC, HBTU o HOBt.⁴²

⁴² Wade, L. and College, W. Organic Chemistry. 8th ed. Pearson Education. USA. 2013, 960.

5.2.-Caracterización óptica por espectroscopía estática

Los compuestos sintetizados presentaron emisión de fluorescencia en disolución al ser irradiados con luz UV, en este sentido, **Naph** fue el compuesto que evidenció mayor fluorescencia. Con el fin de determinar el espectro de absorción y emisión de los compuestos sintetizados, así como el comportamiento del conjugado fluorescente (**RCN**) ante diversos cambios en el medio, se procedió a realizar pruebas de fluorescencia.

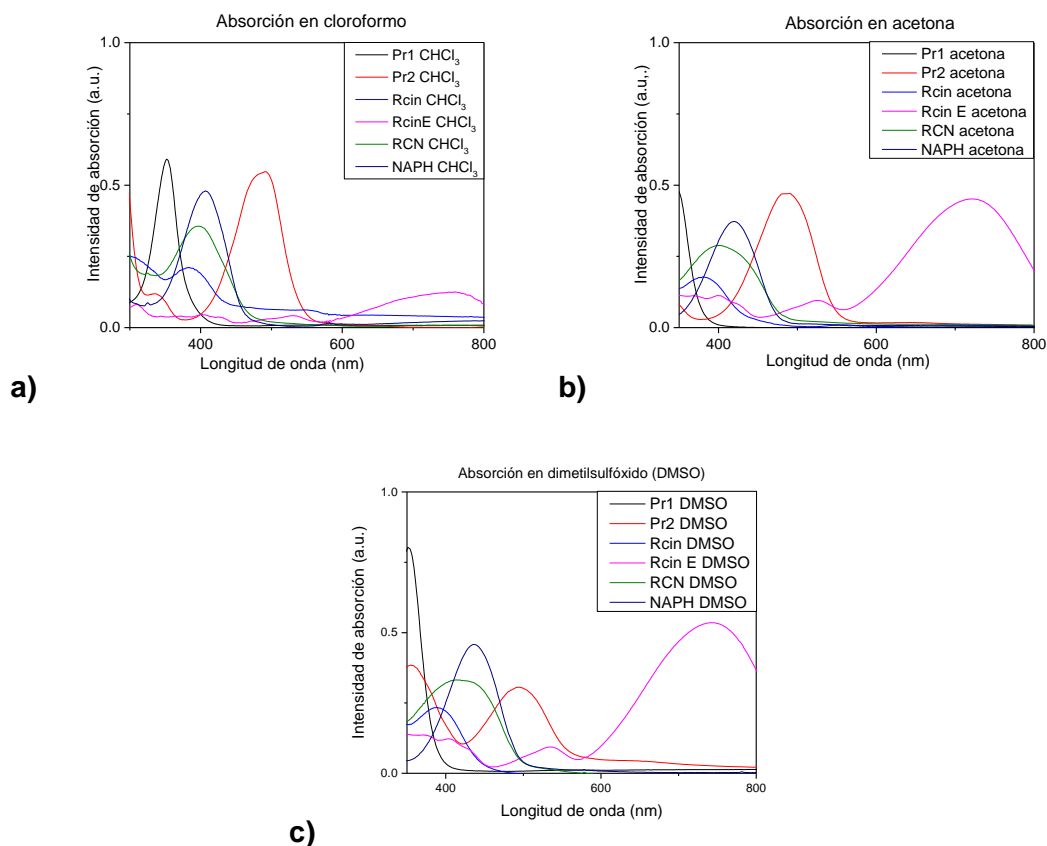


Figura 11.-Espectros de absorción UV-Vis de los **precursores 1 y 2**, **RCin**, **RCin** esterificado, **Naph** y **RCN** en a) Cloroformo b) acetona y c) DMSO

En la *figura 11* se presentan los espectros de absorción en disolución de los compuestos sintetizados en un disolvente no polar (cloroformo) y en dos disolventes polares apróticos (DMSO y acetona). En los espectros de los **precursores 1 y 2**, **Naph**, **RCin** y **RCN** se observa un ligero ensanchamiento y desplazamiento mínimo de la banda espectral hacia longitudes de onda mayores a medida que aumenta la polaridad del medio.

Una molécula en su estado electrónico fundamental S_0 exhibe cierta geometría y solvatación, pero una vez excitada, estas características cambian rápidamente a formas o valores favorables para el estado S_1 , esta reestructuración debe disminuir la energía de la molécula ya excitada, resultando en el desplazamiento de las bandas de absorción a una longitud de onda mayor.

En disolución **RCin**, al tener como grupo funcional un ácido carboxílico, presenta propiedades ácido base, en donde la desprotonación conduce a la ciclación de la molécula formando una *espirolactona*, este mismo arreglo puede suceder en disolventes polares, donde la interacción disolvente-soluto promueve la formación de puentes de hidrógeno, generando así especies resonantes. Por lo tanto, esta especie “cerrada” presenta absorción a dos longitudes de onda en disolventes polares próticos como el agua y metanol (*figura 12*); la banda de más alta energía (entre 500-530 nm) que se asocia a la absorción del estado localmente excitado, mientras que la banda de menor energía (700-750 nm) corresponde a transiciones de transferencia de carga, mientras que disolventes de menor polaridad como cloroformo, acetona y DMSO se observa absorción solo a una longitud de onda.

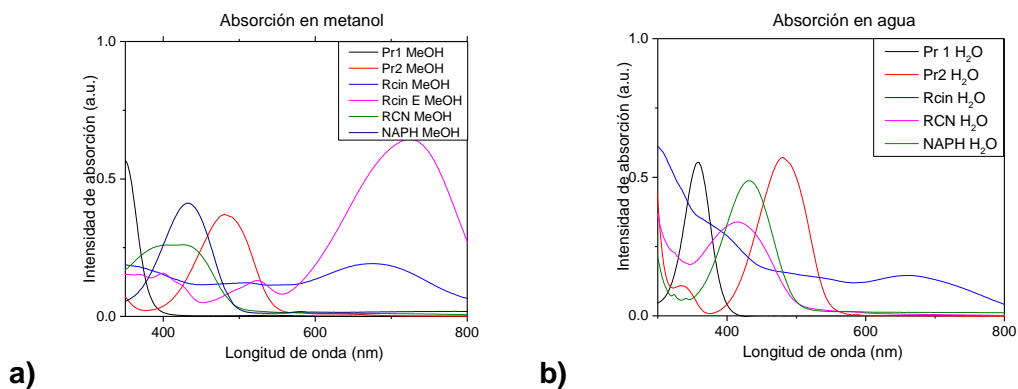


Figura 12.- Absorción de los **precursores 1 y 2, RCin, RCin** esterificado, **Naph** y **RCN** en a) metanol y b) agua

Por otro lado, el análogo esterificado de **RCin** presentó fluorescencia solo de la especie abierta, pues la presencia de un grupo funcional en lugar del grupo ácido carboxílico de su análogo, no permite tener equilibrios ácido-base, y por lo tanto, la capacidad de formar la especie “cerrada”.

Los espectros de absorción y de emisión se relacionan, aproximadamente, como un objeto a su imagen en un espejo si el espaciado de los niveles vibracionales no es muy distinto y las probabilidades de las transiciones son parecidas. En la *figura 13* se presentan los espectros de emisión en cloroformo, acetona y DMSO de las moléculas sintetizadas.

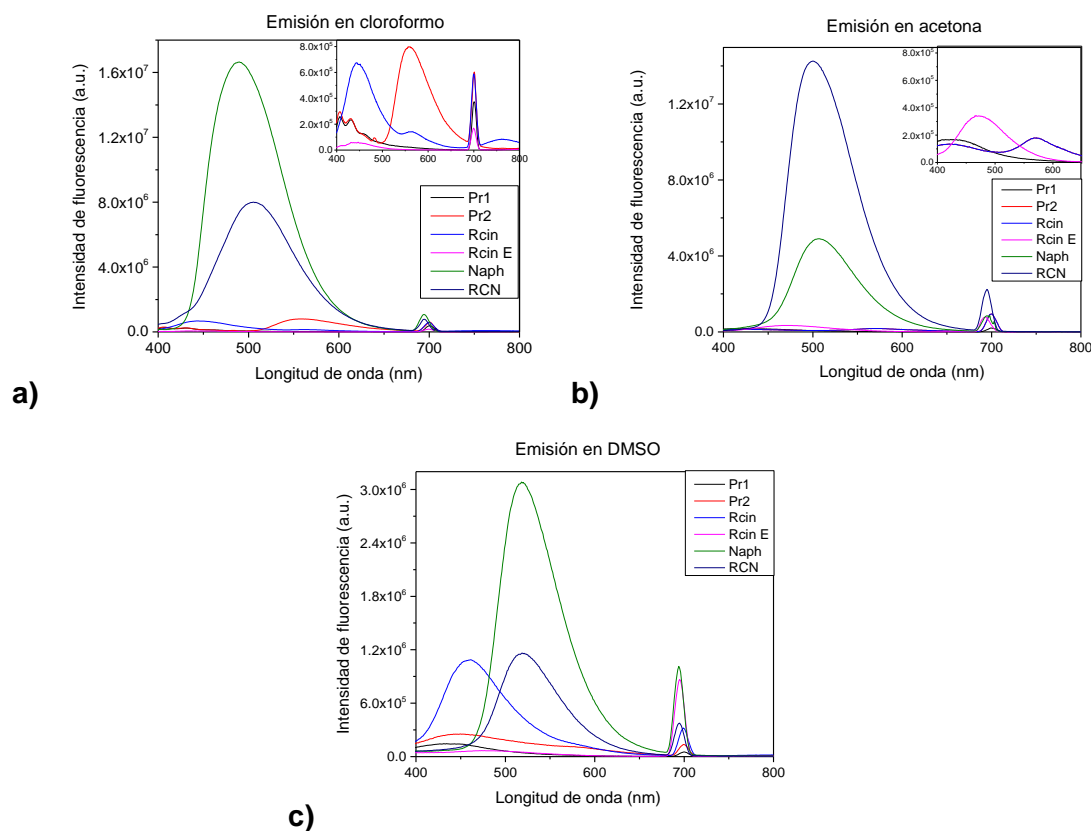


Figura 13.- Espectros de emisión de los precursores 1 y 2, **RCin**, **RCin** esterificado, **Naph** y **RCN** en a) Cloroformo b) acetona y c) DMSO

Cuando una molécula presenta un momento dipolar en estado excitado mayor al momento dipolar en estado basal, la emisión de fluorescencia se verá alterada por el momento dipolar del disolvente, de manera que entre mayor formación de interacciones débiles entre la molécula y el disolvente, la fluorescencia se verá desplazada a longitudes de onda de menor energía. En la *figura 13* se observa que la emisión de fluorescencia disminuye en disolventes de mayor polaridad y un ligero desplazamiento batocrómico (corrimiento hacia el rojo), lo anterior deja en evidencia la influencia de la polaridad de medio en las transiciones electrónicas.

En el caso particular de **RCin** y **RCin** esterificado, se observa un abatimiento casi en su totalidad de la fluorescencia de la especie esterificada. Las moléculas de estructura planar, rígida, con dobles enlaces conjugados y de gran energía de resonancia suelen ser fluorescentes, si la configuración electrónica o la rigidez en la molécula es modificada, se favorece un aumento de la velocidad de conversión interna y en consecuencia pérdidas de energía que producen disminución o pérdida total de la fluorescencia.⁴³ Tal es el caso de **RCin**, que al esterificarse pierde rigidez en su estructura molecular ocasionando que la fracción no rígida sufra vibraciones de baja frecuencia en comparación con el resto de la molécula, perdiendo así la capacidad de emitir fluorescencia, mientras que **RCin** en su forma ácida presenta propiedades solvatocrómicas (*figura 13.1.*), es decir, la localización de su espectro de emisión y absorción dependen de la polaridad del disolvente y se evidencia por cambios de color de la molécula en disolución.

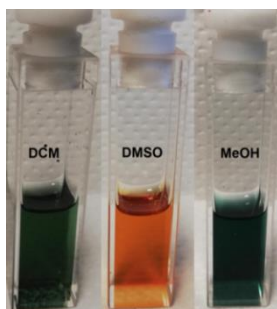


Figura 13.1.- Solvatocromismo de **RCin** en tres disolventes distintos.

Muchos aldehídos y cetonas tienen niveles excitados $n \rightarrow \pi^*$ bajos, exhibiendo bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia. El espectro de emisión en medios polares próticos (*figura 14*) de **RCin** presenta dos bandas diferentes: la primera (450-480 nm) corresponde posiblemente a la emisión del estado localmente excitado. La segunda banda (550-600 nm) es probable que se deba a la emisión del estado de transferencia de carga. Como se puede apreciar en las *figura 13 y 14*, la emisión de fluorescencia de **RCin** se ve eclipsada en su totalidad por la fluorescencia que proporciona **Naph** en el conjugado fluorescente final (**RCN**), dando como resultado que **RCN** emita fluorescencia a una longitud de onda muy

⁴³ Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and applications. 2th ed. WILEY-VCH.Germany. 2002, 52-63

similar a **Naph** pero de menor intensidad y con un ligero desplazamiento hipsocrómico.

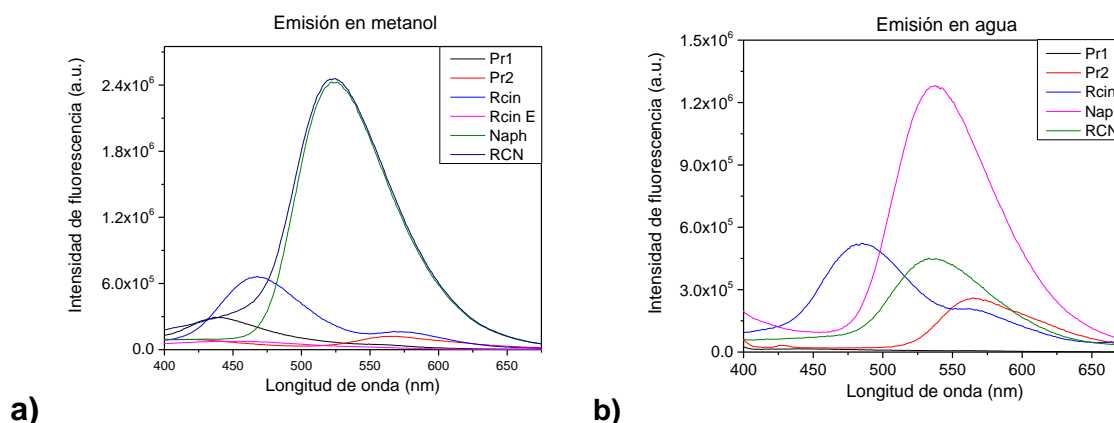


Figura 14.- Espectros de emisión de los precursores 1 y 2, **RCin**, **RCin esterificado**, **Naph** y **RCN** en a) metanol y b) agua

Se presenta un efecto hipocrómico de la fluorescencia de los precursores, de **RCin** y de su forma esterificada al cambiar de metanol a agua como disolvente, sin embargo, en la situación de los espectros de **RCN** y **Naph**, en metanol, la fluorescencia de ambas compuestas presenta diferencias mínimas, siendo la fluorescencia de **RCN** prácticamente igual que la de **Naph**, mientras que en agua, la fluorescencia disminuye más del doble, en el caso de **Naph** y, más de cinco veces en el caso de **RCN**. Se infiere que las moléculas de agua se encuentran solvatando a la molécula fotoexcitada, dando como resultado una redistribución de carga mejor a la inicial.⁴⁴

Los compuestos derivados de naftaleno tienen altos rendimientos cuánticos de fluorescencia (alrededor de 0.55), tal como se observa en los espectros de fluorescencia de **Naph**, en donde la presencia de un átomo de nitrógeno actúa como grupo donador de electrones, induciendo un incremento en el coeficiente molar de absorción y un desplazamiento de los espectros de fluorescencia y absorción. La presencia de pares solitarios de electrones en los átomos de

⁴⁴ Peckus, D.; Matulaitis, T.; Franckevicius, T.; Mimaitė, V.; Tamulevicius, T.; Simokaitienė, J.; Volyniuk, D.; Gulbinas, V.; Tamulevicius, S. and Grazulevicius, J. Twisted Intramolecular Charge Transfer States in Trinary Star-Shaped Thiphenylamine-Based Compounds. *J. Phys. Chem.* **2018**, 122, 12. 3218-3226.

oxígeno y nitrógeno no cambia la naturaleza de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ en la molécula orgánica.⁴⁵

Con el fin de evaluar la polaridad del conjugado fluorescente (**RCN**) se realizó una titulación dioxano-agua (*figura 15*). Se observa un efecto batocrómico (de 512 hasta 542 nm) y una disminución en la intensidad conforme la polaridad del medio aumenta y la señal de emisión se desplaza a longitud de onda mayores, es decir, el número de moléculas solvatadas es mayor en medio no polar que en medio polar, por lo tanto la configuración de **RCN** más estable se encuentra en dioxano. Se empleó un par de disolventes con polaridad muy distinta pero con otros parámetros físicoquímicos similares, con el fin de evitar que los cambios observados en la emisión de fluorescencia estuvieran influenciados principalmente por cambios en la constante dieléctrica y no en la viscosidad del medio.⁴⁶

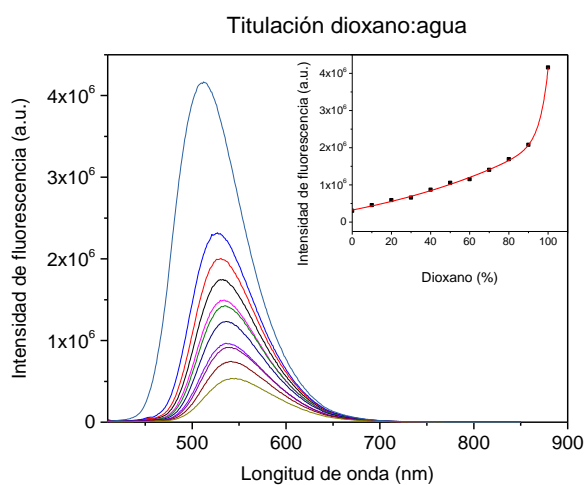


Figura 15.-Espectro de emisión de **RCN**; titulación dioxano: agua.

En general, los rendimientos cuánticos y tiempos de vida dependen en gran medida de la naturaleza del compuesto y del medio. En el ensayo de oxidación de **RCN** con peróxido de hidrógeno no se observó un cambio significativo en las bandas de emisión de fluorescencia al aumentar la concentración de peróxido de hidrógeno (*figura 16*).

⁴⁵ Valeur, B. Molecular Fluorescence. Principles and applications. 2th ed. WILEY-VCH.Germany. **2002**, 57.

⁴⁶ Raut,S.; Kimball, J.; Fudala, R.; Doan, H.; Maliwal, B.; Sabnis, N.; Lacko, A.; Gryczynski, I.; Dztuba, S. and Gryczynski,Z. A homodimeric BODIPY rotor as a fluorescent viscosity sensor for membrane- mimicking and celular environments. *Phys. Chem. Chem.Phys.* **2014** 16,27037-27042.

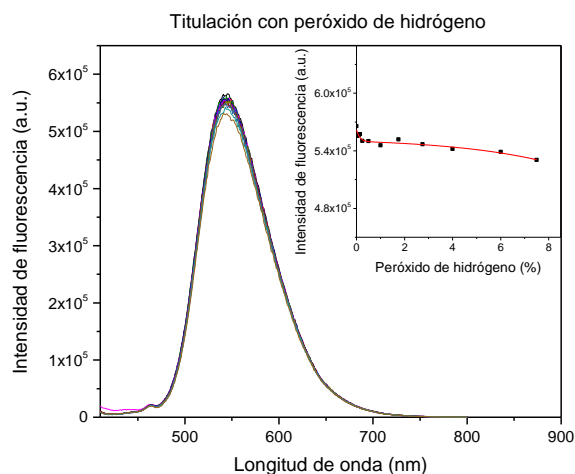


Figura 16.-Titulación de **RCN** con peróxido de hidrógeno

La sonda fluorescente al ser empleada en sistemas biológicos se enfrenta a múltiples procesos que lleva a cabo la célula, uno de estos procesos es la apoptosis. Con el fin de observar el comportamiento de la sonda sintetizada (**RCN**) en situaciones de muerte celular, se realizó una titulación con digitonina, compuesto con el cual se induciría la apoptosis a la célula en estudios de microscopía. Se observa que al aumentar la concentración de digitonina dentro de la celda, la intensidad de fluorescencia de **RCN** aumenta (*figura 17*).

La presencia de un enlace amida en la estructura de **RCN**, promueve su funcionalización como quimiosensor, pues tiene la capacidad de ciclarse y formar un anillo de *espirolactama*, teniendo como consecuencia la pérdida de fluorescencia, o bien, mantenerse en forma de enlace amida y presentar la emisión de fluorescencia observada en los ensayos anteriormente presentados. La sonda responde a cambios en el medio ante la adición de digitonina, aumentando así su intensidad de fluorescencia, con esto se deducen dos posibles sitios de interacción entre la sonda y la digitonina⁴⁷; uno es la interacción entre el hidrógeno del grupo amida de la sonda con la cadena polisacárida y el otro es la coordinación del anillo naftílico con el fragmento análogo al colesterol o bien, mediante la formación de micelas de digitonina que encapsulen a la mitocondria.

⁴⁷ Das, S.; Shekar, H.; Uddin, R.; Rissanen, K.; Mandal, S. and Sahoo P. Differential detection and quantification of cyclic AMP and other adenosine phosphates in live cells. *Chem. Comm.* **2017**, 53, 7600-7603

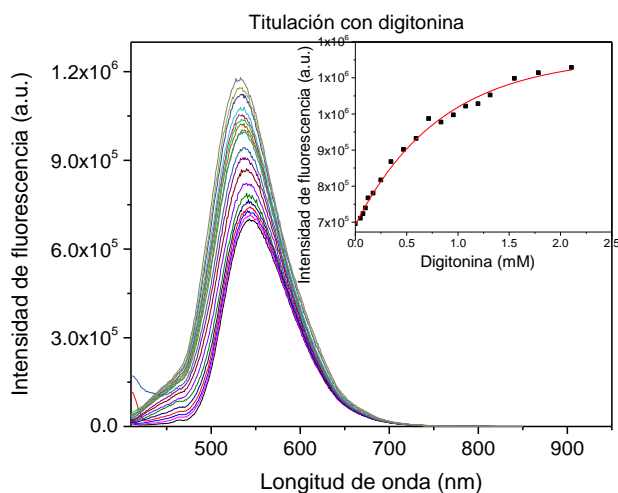
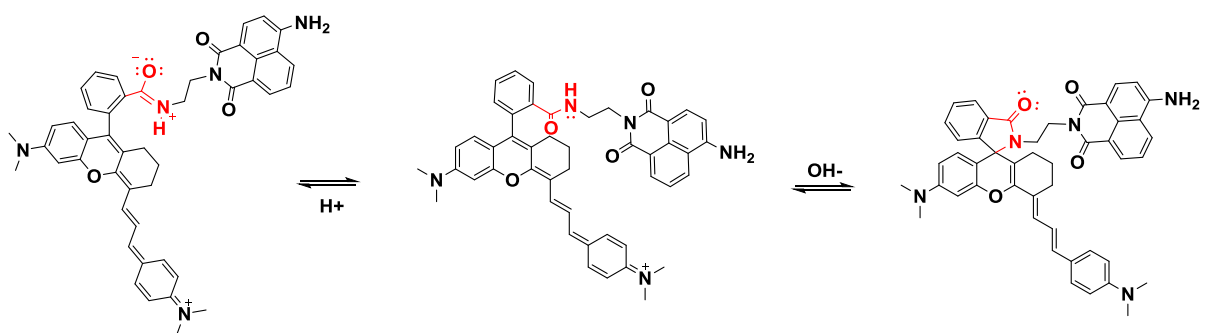


Figura 17.-Espectro de emisión. Titulación de RCN con digitonina.

En la *figura 18* se presenta la curva de titulación de **RCN** dependiente del pH. Se observa un efecto hipocrómico al aumentar la basicidad del medio. La estructura de las amidas presenta un par de electrones no enlazantes en el átomo de hidrógeno; sin embargo, las amidas son bases muy débiles y por lo tanto se requiere un ácido fuerte para protonarlas. La protonación se produce en el átomo de oxígeno del grupo carbonilo, en lugar de hacerlo en el nitrógeno. La débil basicidad se puede explicar representando como un híbrido de resonancia de la estructura convencional y una estructura con un doble enlace entre el carbono y el nitrógeno (*Esquema 6*).⁴⁸



Esquema 6.-Equilibrio ácido base de grupo funcional amida de RCN.

⁴⁸ McMurry J. Química orgánica. 7^{ma} ed. México. Edit. Cengage Learning. 2008, 58, 791, 813-815

La deslocalización del par electrónico no compartido del átomo de nitrógeno disminuye el carácter parcialmente positivo del carbono carbonílico, y hace que las amidas sean menos reactivas que otros derivados de ácido carboxílico ante el ataque de nucleófilos. Las moléculas de amidas con un (o sin) sustituyente en el átomo de nitrógeno, son capaces de formar enlaces de hidrógeno fuertes. Cuando al medio acuoso se le añade base, **RCN** se desprotona favoreciendo la formación de la *espirolactama*, la cual al ser una cerrada, la estabilidad de la molécula disminuye y en consecuencia también la fluorescencia.

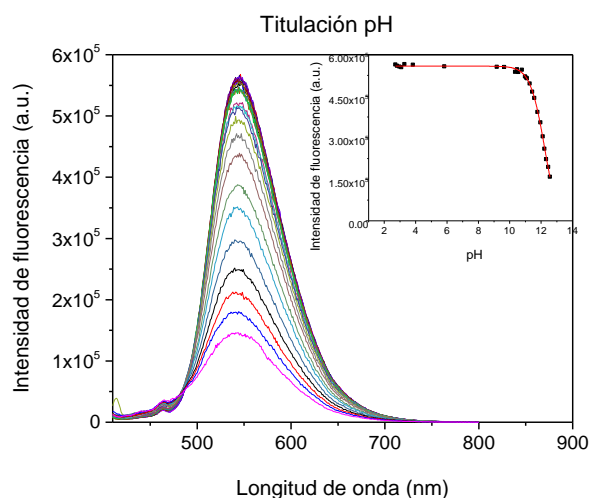


Figura 19.-Titulación espectrofotométrica de **RCN** dependiente del pH, usando NaOH 0.2 M.

Los espectros reportados en esta sección confirman que **RCN** es altamente sensible a la polaridad del medio y que sus emisiones presentan elevada dependencia a cambios en el medio gracias al diseño molecular empleado.

5.3.-Bioimagen por microscopía confocal

Tras confirmar que tanto los fluoróforos como la sonda fluorescente son sensibles al cambio en su medio, se realizaron estudios de microscopía confocal en células de adenocarcinoma de pulmón humano (SK-LU-1) para demostrar su uso como sonda fluorescente. En este sentido, se predice que la sonda fluorescente sintetizada podría reportar cambios entre organelos y subestructuras celulares, o en células bajo diversas condiciones de enfermedad o bajo el tratamiento con algún fármaco.

A partir de la disolución stock preparada para los experimentos de fluorescencia se realizaron los ensayos en células, añadiendo 2 μL de dicha disolución en la caja con las células (concentración final *ca.* 5 μM). En la *imagen 1* se pueden observar las imágenes obtenidas de las células teñidas con **Naph**, **RCin** y **RCN** en diferentes condiciones, se aprecia que la fluorescencia de **Naph** se distribuye en el núcleo y nucleolo de la célula, mostrando mayor intensidad de emisión en este último organelo. Por su parte **RCin** se localiza en mitocondria con una menor intensidad de fluorescencia que **Naph**. Se observa también que **RCN** posee gran capacidad fluorescente, tanto en el canal rojo como en el canal verde y se localiza en mitocondria con alta especificidad a la concentración empleada. Con estos resultados se aprecia que la sonda conjugada obtenida conserva la localización de **RCin** y una intensidad y emisión de fluorescencia muy parecida a la de **Naph**.

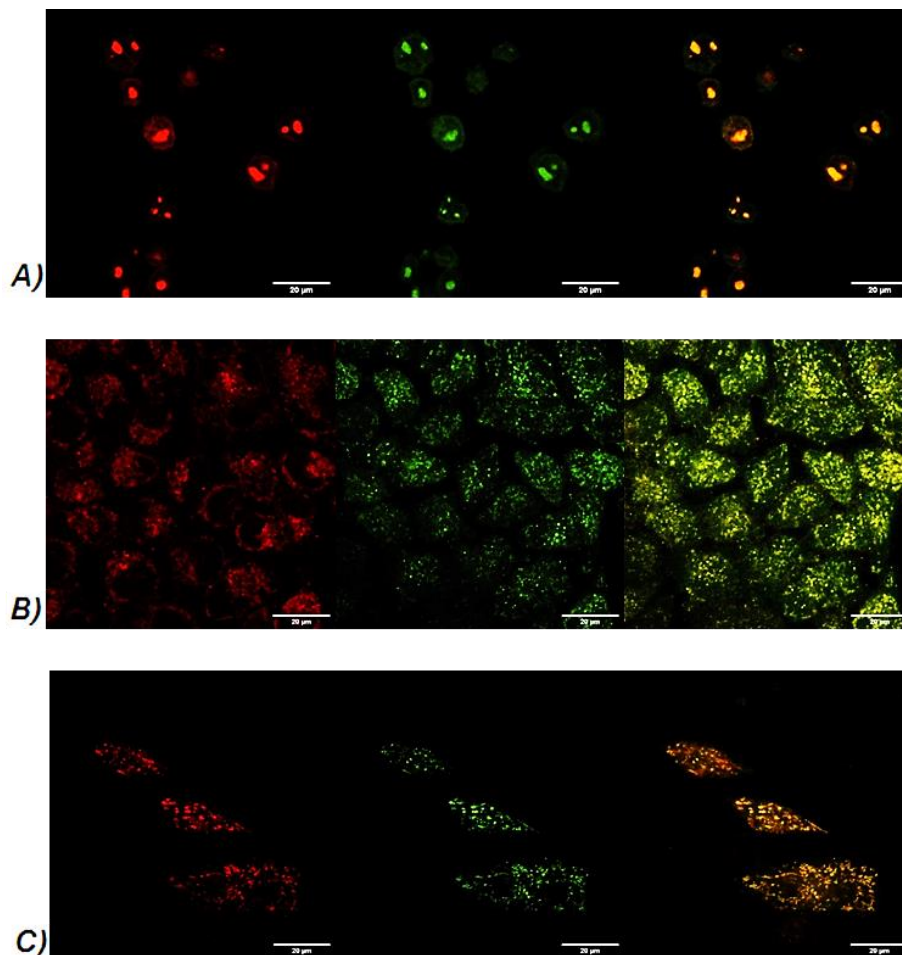


Imagen 1.-Imágenes obtenidas por microscopía confocal de la localización de **A) Naph** (λ_{ex} : 582 nm) **B) RCin** (λ_{ex} = 520 nm) y **C) RCN** (λ_{ex} = 488 nm) en células SK-LU-1. Escala a 20 μm

Para demostrar que **RCN** se localiza específicamente dentro de las mitocondrias, se realizó un ensayo con carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), compuesto que inhibe la fosforilación oxidativa actuando como ionóforo y causando un desacoplamiento del gradiente de protones.⁴⁹ En la *imagen 2* se observa un cambio en la intensidad de fluorescencia y una ligera tinción del citoplasma al añadir 2 μ L de CCCP a la caja previamente incubada con **RCN**. Considerando que la matriz mitocondrial es alcalina y tiene un potencial de membrana negativo,⁵⁰ se favorecerá la entrada de una molécula cargada (como lo es **RCN**) a través de la ATP-sintasa, al añadir el CCCP se inhibe este canal y la molécula es expulsada al medio, es por esto que la fluorescencia disminuye.

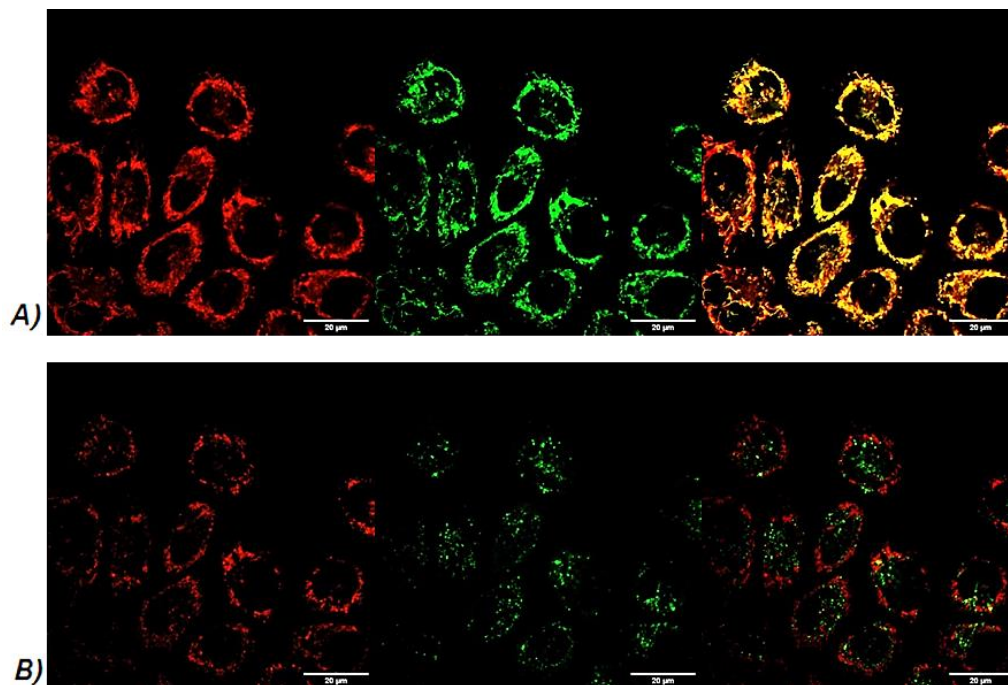


Imagen 2.-Imágenes obtenidas por microscopía confocal de A) células SK-LU-1 incubadas 30 min con **RCN** ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$) antes de la adición de CCCP y B) después de la adición de CCCP.

Si la molécula fluorescente añadida al cultivo celular está cargada positivamente, asumiendo condiciones específicas, se acumulará dentro de las mitocondrias en proporción inversa al potencial de membrana mitocondrial de

⁴⁹ Son, M.; Aromataris, E.; Castro, J.; Roberts, M.; Barritt, G. and Rychkov, G. Mitochondrial uncoupler FCCP activates proton conductance but does not block store-operated CA^{2+} current in liver cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2010**, 2:495,152.

⁵⁰ Perry, S.; Norman, J.; Barberi, J.; Brown, E. and Gelbart, H. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques. NIH* **2011**, 50(2), 99

acuerdo con la ecuación de Nernst. Mitocondrias hiperpolarizadas (interior más negativo) acumularán más molécula fluorescente, e inversamente, si las mitocondrias están despolarizadas, será menor la cantidad de moléculas fluorescentes dentro de dicho organelo.⁵¹

Para garantizar la localización mitocondrial de **RCN** se realizaron experimentos de colocalización con “*TMRM*” (Tetrametilrodamina metil éster), ésta es una sonda fluorescente catiónica y lipofílica útil para monitorear el potencial de membrana mitocondrial,⁵² que presenta emisión de fluorescencia con desplazamiento al rojo y penetra en la célula siendo secuestrada por las mitocondrias en actividad.

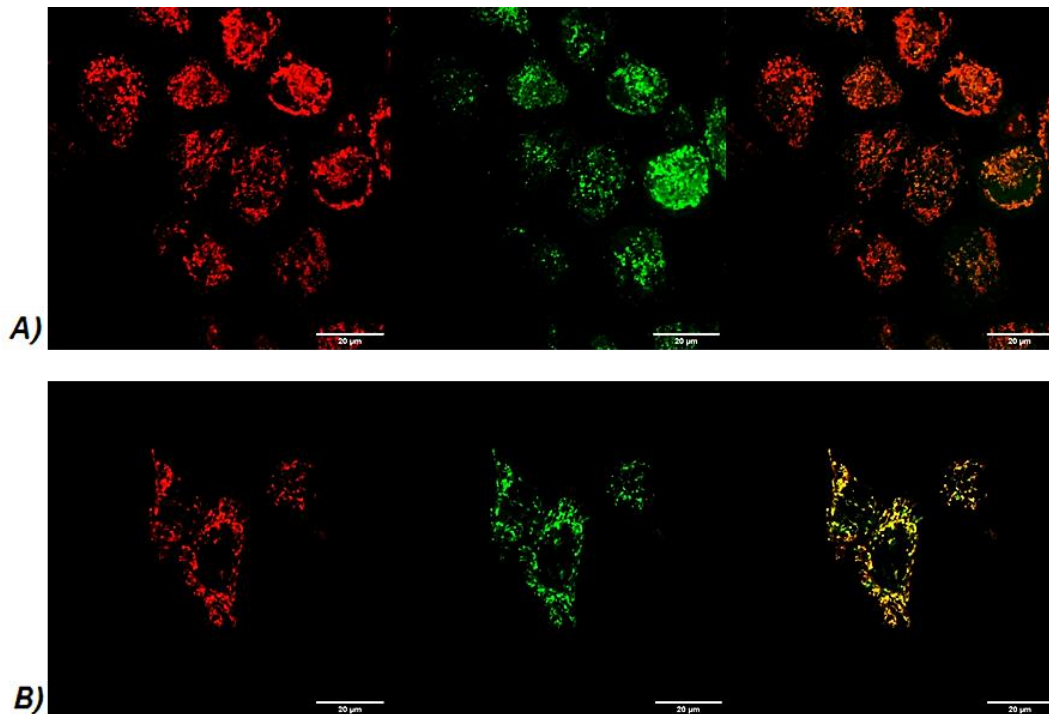


Imagen 3.-Colocalización de *RCN* con *TMRM*. En el canal rojo se presenta la fluorescencia de *TMRM*, en el canal verde la fluorescencia de *RCN* y la tercera columna muestra la imagen compuesta de ambos canales. **A)** Células incubadas con *RCN* y adición de *TMRM*. **B)** Células incubadas con *TMRM* y adición de *RCN*.

⁵¹ Perry, S.; Norman, J.; Barberi, J.; Brown, E. and Gelbart, H. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques. NIH.* **2011**, 50(2), 101.

⁵² Fiskum, G.; Kowaltowski, A; Andreyev, A.; Kushnareva, Y. and Starkov, A. Apoptosis-Related Activities Measured with Isolated Mitochondria and Digitonin-Permeabilized Cells. *Methods in enzymology* **2000**, .322, 227.

Con la *imagen 3* se demuestra que **RCN** (canal verde) tiñe selectivamente a las mitocondrias independientemente del orden de adición de las moléculas (**RCN** y TMRM).

Al aumentar la concentración de la molécula (ca. 7.5 μ M) en la célula, se observó que además de penetrar las mitocondrias, se teñían también, estructuras circulares similares a los lisosomas, por esta razón se realizó un segundo experimento de colocalización con un marcador de lisosomas estandarizado, *LysoTracker*. La sonda *LysoTracker* consiste de un fluoróforo vinculado a una base débil que está parcialmente protonada con pH neutro.⁵³ Esto permite que la sonda penetre sin problema por las membranas celulares y ser altamente selectiva a orgánulos ácidos, como los lisosomas. En la *imagen 4 A*) se presenta en canal rojo los lisosomas teñidos con *LysoTracker* y en canal verde las células teñidas con **RCN** en exceso, donde se observa tinción de estructuras circulares además de la mitocondria. En la tercera fotografía de la misma imagen, compuesta por ambos canales, se observa que hay colocalización de los sitios teñidos con rojo y verde, con esto se demuestra que **RCN** tiñe también lisosomas ante exceso de concentración de la misma en el medio.

Como experimento adicional se añadió CCCP a las células con *LysoTracker* y la sonda fluorescente, con esto se esperaba que la sonda que se encontraba en lisosoma se liberara y penetrara a las mitocondrias que quedarían “vaciadas” por efecto del CCCP. Dicho comportamiento no sucedió, pues como se observa en la *imagen 4 B*). **RCN** se liberó de la mitocondria, pero no de los lisosomas y, la sonda liberada se distribuyó heterogéneamente en la célula, marcando citoplasma, núcleo, posiblemente más lisosomas, membrana nuclear y nucleolo, estos dos últimos organelos presentaron mayor intensidad de fluorescencia, es posible que la célula haya entrado a un estado de muerte celular y la sonda se haya internado en la membrana nuclear y nucleolo por cambios en el potencial de membrana inducido por CCCP, o bien, que **RCN** se haya hidrolizado y liberado a **Naph**, y ésta tiñera el nucleolo.

⁵³ ThermoFisher Scientific. LysoTracker Probes. Disponible en <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7528>

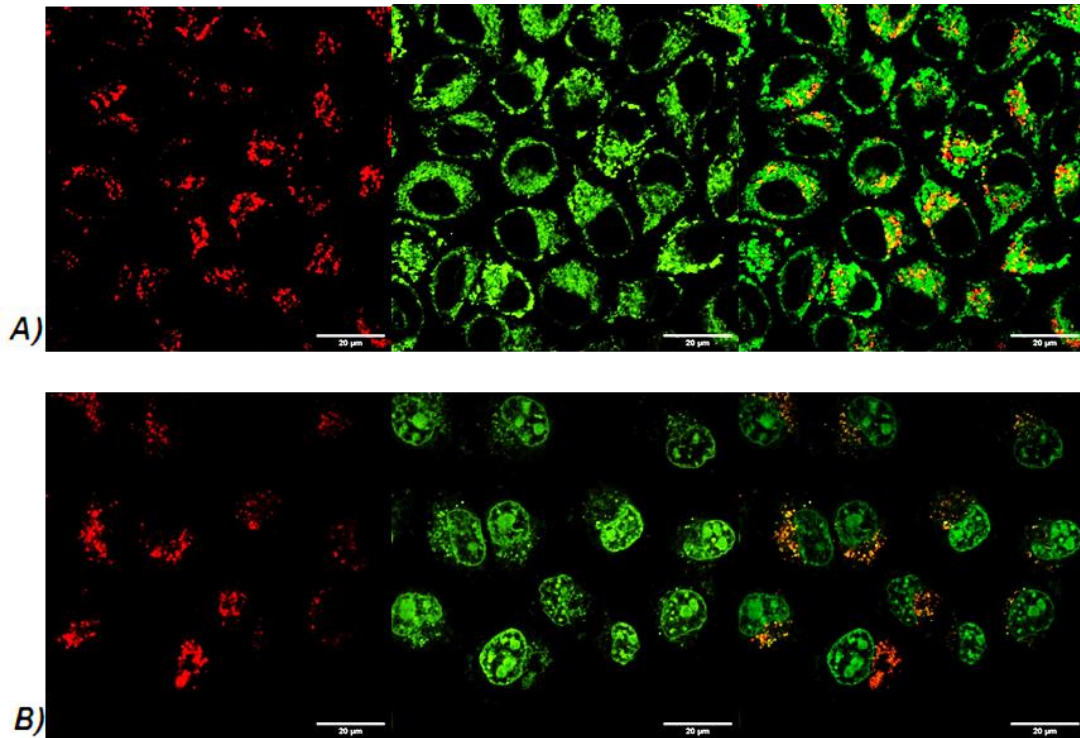


Imagen 4.-Imágenes obtenidas por microscopía confocal de A) Colocalización de RCN con LysoTracker y B) adición de CCCP a células SK-LU-1 tratadas con **RCN** y LysoTracker.

Las alteraciones mitocondriales son un factor constante en la muerte celular, siendo identificadas como actoras clave en el proceso apoptótico. En respuesta a varios estímulos apoptóticos diferentes (aumento de calcio intracelular, lesión de DNA por agentes oxidantes, luz UV, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos, etc.), las mitocondrias liberan al citocromo C, procaspasa 9 y el factor inductor de apoptosis.⁵⁴

La mitocondria amplifica la respuesta apoptótica, liberando inductores apoptóticos con capacidad de iniciar la cascada de las caspasas y la permeabilización de las membranas.⁵⁵

Para complementar los datos obtenidos, se realizaron experimentos con cuatro agentes externos para inducir cambios en las células y comprobar que **RCN** funciona como sonda fluorescente capaz de reportar estos cambios en su medio

⁵⁴ Fiskum, G.; Kowaltowski, A; Andreyev, A.; Kushnareva, Y. and Starkov, A. Apoptosis-Related Activities Measured with Isolated Mitochondria and Digitonin-Permeabilized Cells. *Methods in enzymology* **2000**, 322,222

⁵⁵ Cascales, M. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm.*, **2003**, 69,58

local. El peróxido de hidrogeno se empleó para causar estrés oxidativo en las células, la digitonina, el etopósido y la nistatina se emplearon para inducir la apoptosis mediante mecanismos diferentes.

El estrés oxidativo severo puede causar muerte celular mediante procesos apoptóticos. En la *imagen 5* se observa el cambio de morfología de las mitocondrias después de 40 y 50 minutos de haber sido tratadas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), además de la disminución mínima de la intensidad de fluorescencia de la sonda. Un desequilibrio en el estatus prooxidante/antioxidante en la célula da como resultado estrés oxidativo provocando citotoxicidad. El peróxido de hidrógeno interviene en un proceso conocido como peroxidación de lípidos de membrana, generando una especie altamente reactivas con proteínas, ADN y moléculas susceptibles.⁵⁶

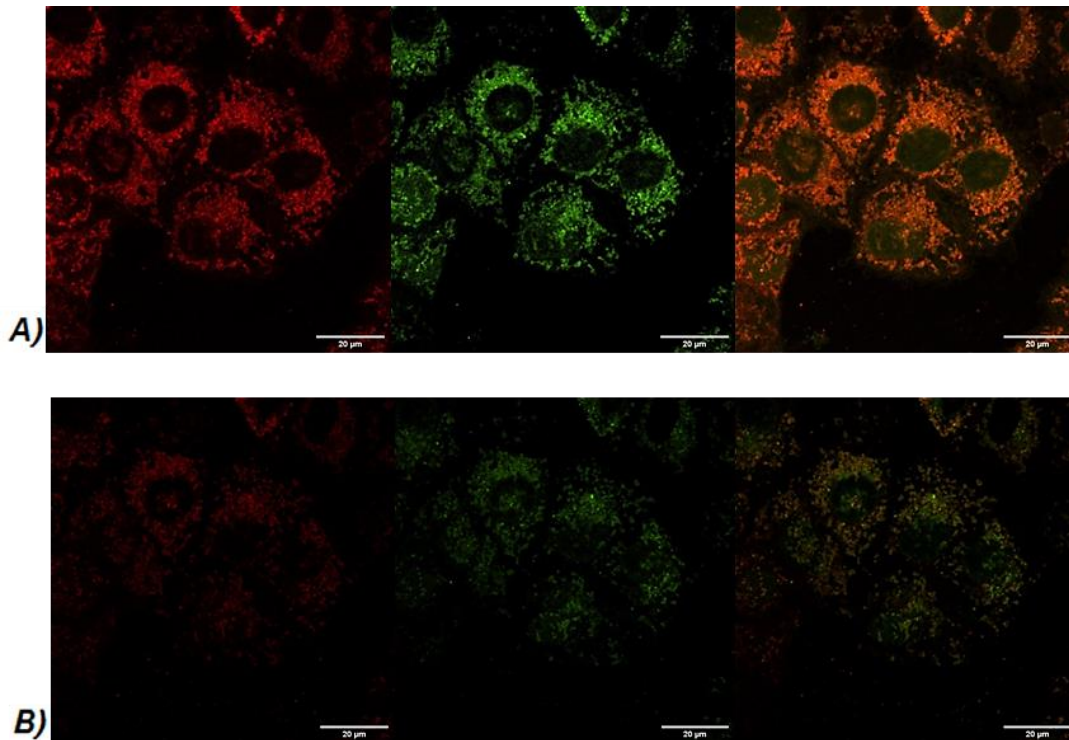


Imagen 5.-Inducción de apoptosis por adición de peróxido de hidrógeno a células incubadas con RCN. A) Imagen de las células a los 40 min de añadido el tratamiento y B) después de 50 min.

⁵⁶ Gutierrez, J.; Mondragón, P.; García, L.; Hernández, S.; Ramirez, S. y Nuñez, N. Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Rev. Esp. Med. Quir.* **2014**, 19: 446

La afinidad específica de la digitonina por los colesteroles les permite interrumpir selectivamente las membranas plasmáticas de células eucariotas, que tienen una proporción alta de colesterol, sin alterar las membranas intracelulares y, en particular, la membrana interna mitocondrial. Sin embargo, aunque la membrana interna mitocondrial tiene bajos niveles de colesterol, la membrana externa contiene altos niveles de colesterol y, por lo tanto, está sujeta a problemas estructurales y alteraciones funcionales causadas por digitonina, dependiendo de la cantidad utilizada.⁵⁷

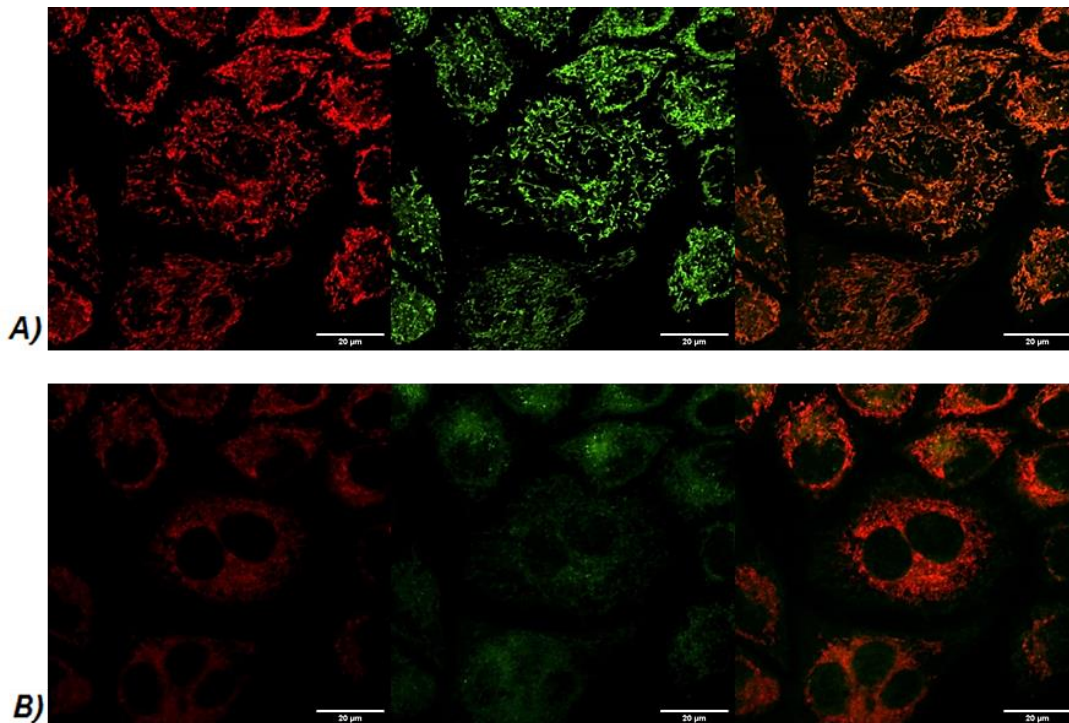


Imagen 6.-Inducción de apoptosis por adición de digitonina a RCN. **A)** antes de añadir digitonina. **B)** después de añadir digitonina.

La degradación del DNA cromosómico en fragmentos de oligonucleósidos es una de las características de la apoptosis. Estímulos apoptóticos como el etopósido,⁵⁸ radiaciones UV o gamma, inducen la fragmentación del DNA. La degradación oligonucleosómica del DNA en el núcleo de células apoptóticas se consigue mediante la acción de caspasas activas.

⁵⁷ Fiskum, G.; Kowaltowski, A; Andreyev, A.; Kushnareva, Y. and Starkov, A. Apoptosis-Related Activities Measured with Isolated Mitochondria and Digitonin-Permeabilized Cells. *Methods in enzymology* **2000**, .322, 222.

⁵⁸ Cascales, M. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm.*, **2003**, 69, 52-53.

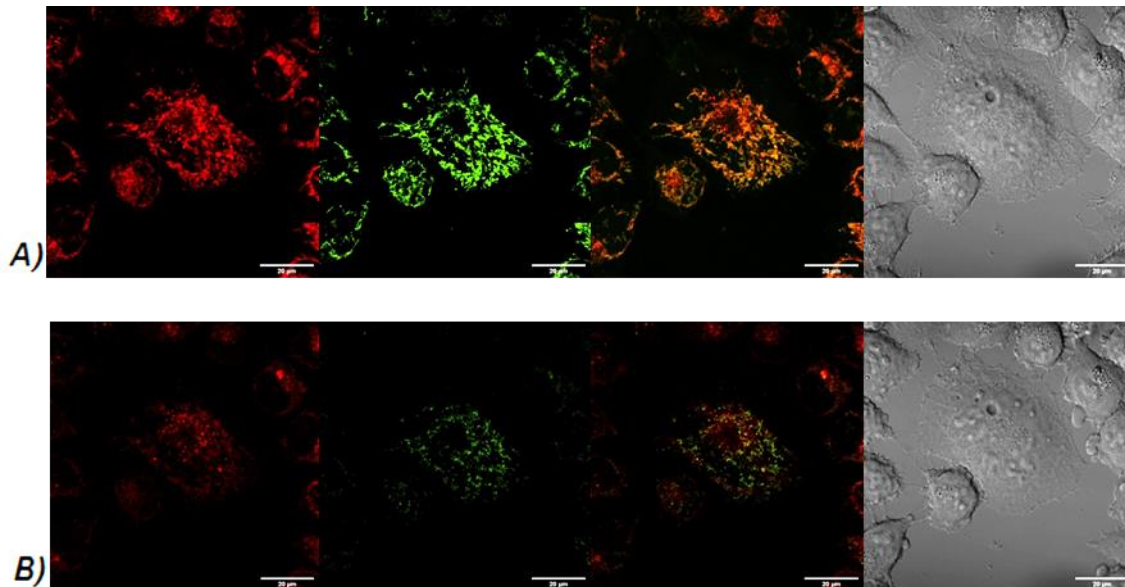


Imagen 7.-Inducción de apoptosis por adición de etopósido a células SK-LU-1 incubadas con RCN.
A) antes de añadir etopósido. **B)** después de añadir etopósido.

En la muerte por necrosis se detectan una serie de cambios característicos: las células y sus orgánulos se hinchan (se altera la capacidad de la membrana plasmática para controlar el paso de los iones y el agua); las células se rompen y su contenido se vierte al espacio intercelular; se origina inflamación de los tejidos adyacentes. Las células que son inducidas a sufrir apoptosis reducen su tamaño, sus mitocondrias se abren y libera el citocromo C, en la superficie celular surgen cuerpos apoptóticos y se degrada la cromatina de sus núcleos.⁵⁹

Las células también se sometieron a estrés por medio de la adición de Nistatina, un polieno con actividad antimicótica cuyo mecanismo de acción es la formación de canales iónicos que se extienden a través de la membrana mediante interacciones con los esteroides en las capas lipídicas, ocasionando la disipación de un gradiente de potasio.⁶⁰ La adición de nistatina a células intactas en reposo inicia una serie de cambios degradativos que resultan en la destrucción de una variedad de enzimas y posiblemente de estructuras celulares.⁶¹

⁵⁹ Cascales, M. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm.*, **2003**, 69, 37

⁶⁰ Silva, L.; Coutinho, A.; Fedorov, A. and Prieto, M. Competitive Binding of Cholesterol and Ergosterol to the Polyene Antibiotic Nystatin. A Fluorescence Study. *J.Biophysical*. **2006**, 90,3625

⁶¹ Lampen, J.; Arnow, P. and Safferman. Mechanism of protection by sterols against polyene antibiotics. *J. Bacter*. **1959** ,80, 200

La *imagen 8 A)* presenta una célula teñida con **RCN** observada en el canal rojo, verde, combinado y campo claro de izquierda a derecha, durante la adición de nistatina en **B)** se observa una disminución más pronunciada de la intensidad de fluorescencia en el canal verde que en el rojo, además de una contracción celular (plasmólisis) en la imagen en campo claro.

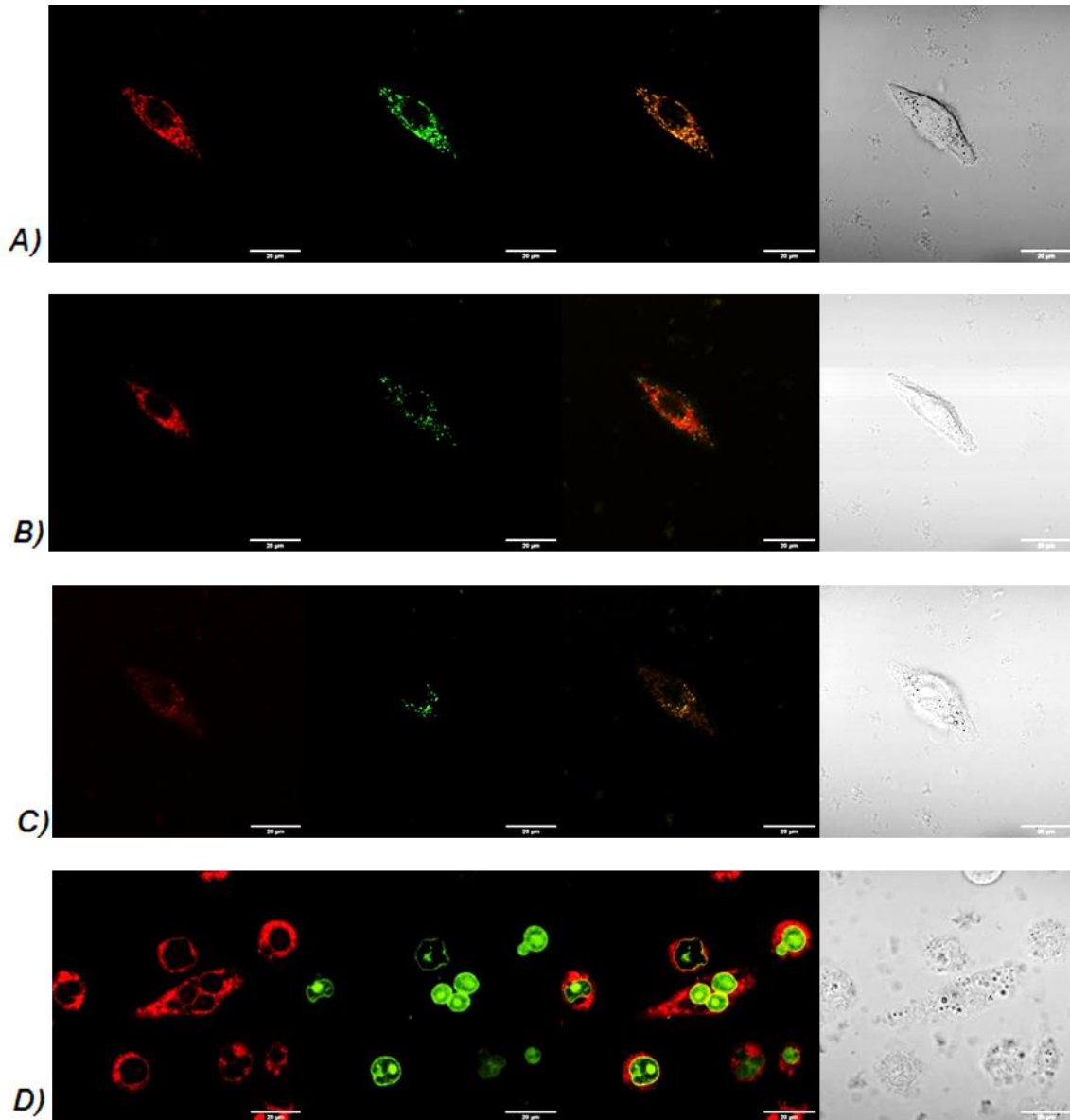


Imagen 8.- Inducción de apoptosis por adición de Nistatina. **A)** Células SK-LU-1 antes de la adición de nistatina, incubadas con **RCN**, **B)** durante la adición de nistatina **C)** después de la adición de nistatina y **D)** Células incubadas con nistatina y posterior adición de RCN.

La adición de nistatina conduce a la permeabilización de la membrana, originando la salida de solutos al medio extracelular. La pérdida de intensidad de fluorescencia puede deberse a la interacción que tiene la nistatina con la sonda (*ver gráfica 1, anexo II*) o bien a la salida de la sonda del medio intracelular.

Después de la adición de nistatina se observa (*imagen 8 C*) que la célula se hincha (turgencia), se forman compuestos apoptóticos alrededor de la membrana, y se disminuye casi en su totalidad la fluorescencia de **RCN** en ambos canales. Dicha hinchazón celular conduce a la entrada de medio extracelular con el fin de recuperar su equilibrio osmótico, sin embargo, al estar la nistatina unida covalentemente a la membrana, no se consigue aquél equilibrio y su ruptura de la estructura membranal, mediante la formación de cuerpos apoptóticos. La nistatina puede formar agregados con colesterol mediante interacciones hidrófobas.⁶²

La nistatina, al ser incubada con las células antes del tratamiento con **RCN**, inicia el proceso apoptótico de éstas, además de, como se ha reportado con anterioridad,⁶³ actuar como una sonda fluorescente con respuesta a los cambios en la fluidez de los lípidos de membrana. Dicho esto, es posible que el estrés inducido a las mitocondrias y la apertura de canales en la membrana causados por la nistatina, favorezcan la internalización de **RCN** a otros organelos, como se observa en la *figura 8 inciso D*), siendo que las interacciones entre **RCN** y nistatina como moléculas fluorescentes, generen el cambio de posición, o bien, que **RCN** se haya hidrolizado en los dos componentes fluorescentes que lo componen.

Las mitocondrias requieren modelos experimentales más simples que permitan un mejor control sobre el medio bioquímico, estos modelos incluyen mediciones realizadas en mitocondrias aisladas y con células permeabilizadas para que los componentes solubles del citosol estén en equilibrio con los del medio, para evitar que el resultado de las mediciones de actividad mitocondrial sea diferente de los que existen verdaderamente dentro del ambiente intracelular.

⁶² Silva, L.; Coutinho, A.; Fedorov, A. and Prieto, M. Competitive Binding of Cholesterol and Ergosterol to the Polyene Antibiotic Nystatin. A Fluorescence Study. *J.Biophysical*. **2006**, 90; 3625

⁶³ Wilson, H.; Bahm, Q.; Erickson, J.; Shinkle, A.; Vu, M.; Woodbury, D. and Bell, J. Differential Detection of Phospholipid Fluidity, Order, and Spacing by Fluorescence Spectroscopy of Bis-pyrene, Prodan, Nystatin and Merocyanine. *J. Biophysical*. **2006**, 91: 540, 4091-4092

6.-Conclusiones

Los experimentos realizados en espectroscopía de absorción y emisión, testifican que las diferencias observadas en las células antes y después de los tratamientos se deban a cambios en el ambiente local de las moléculas y al estado de salud de las células mismas y no a la distribución heterogénea de la sonda en los organelos.

Al conjugar un fluoróforo de rendimiento cuántico de fluorescencia despreciable y propiedades modulables (**RCin**), en comparación con un fluoróforo de muy alto rendimiento cuántico (**Naph**), la fluorescencia del producto final será determinada por el fluoróforo de mayor rendimiento cuántico de fluorescencia y la conservación de las propiedades modulables, dependerá de las interacciones con el medio, la rigidez de la molécula y la generación de estructuras en equilibrio principalmente.

La sonda fluorescente obtenida presenta una gran estabilidad, respuesta a cambios en la polaridad del disolvente, es específica y adquirió fluorescencia a una longitud de onda muy similar al fluoróforo de mayor rendimiento cuántico de fluorescencia.

Con la esterificación de **RCin** se demuestra que la formación de la especie ciclada (*espirolactona*, el pK_a calculado para **RCN** es de 12.16), es la responsable de la fluorescencia dual de dicho compuesto y la influencia de esta ciclación para el solvatocromismo de la molécula, pues al estar como **RCin** esterificado (**RCin E**), no se presentan fenómenos de cambios de color dependientes del disolvente.

Los experimentos de microscopía realizados confirman que **RCN** es capaz de emplearse como sonda fluorescente mitocondrial en células vivas, además de reportar cambios en la polaridad local entre distintas estructuras celulares y muerte celular.

7.- Sección Experimental

7.1.- Reactivos e instrumentación

Para la síntesis, manejo, tratamiento y análisis de los compuestos propuestos, los reactivos y disolventes empleados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich y usados sin previa purificación. El diclorometano empleado para la síntesis fue secado, mediante destilación vertical y cloruro de calcio de origen comercial. Los reactivos sólidos fueron pesados en balanza analítica OHAUS®.

Las reacciones fueron llevadas a cabo en baños de aceite mineral, con agitación magnética constante y temperatura o baño de hielo, si así lo requería, se llevaron a cabo hasta que el reactivo limitante se consumiera y no se observaran cambios significativos en la mezcla de reacción respecto al tiempo, el avance de la misma se monitoreó mediante TLC disolventes, en placas de silicagel-60 HF 254 Merck y posterior revelación con cámara de luz UV (longitud de onda de 254 nm).

La evaporación de los disolventes se realizó mediante un rotaevaporador a presión reducida Brüker, línea de vacío acoplada a bomba de vacío. El secado de los productos de reacción se realizó mediante evaporación a presión reducida, estufa a vacío a temperatura controlada y aire.

Las columnas cromatográficas empleadas para la purificación de los productos se prepararon compactando una suspensión de adsorbente (silicagel 60, de 230-400 mesh, silicagel 100 de mesh y fluorisil) en DCM. El producto se impregnó en el adsorbente correspondiente al de la columna montada y se eluyó con mezcla disolventes (DCM/MeOH), aumentando la polaridad gradualmente. La recristalización se realizó por par de disolventes (MeOH/H₂O).

La caracterización se realizó mediante RMN ¹H y ¹³C empleando los espectrofotómetros Bruker Fourier 300MHz, Joel Eclipse 400 MHz y Bruker AVANCE III HD 700 MHz, las muestras para este análisis se prepararon con 10 a 50 mg del compuesto purificado en 0.5 mL de disolvente deuterado adecuado. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) con

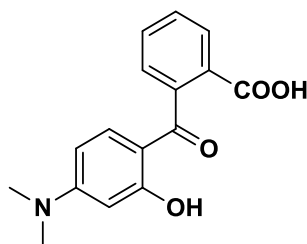
respecto al tetrametilsilano (TMS), mientras que las constantes de acoplamiento (J) están expresadas en Hz.

Los espectros de masa se determinaron en un espectrofotómetro de masas modelo 1200 Infinity Series, empleando la técnica de ionización por electrospray (ESI+). La espectroscopía FT-IR se realizó en el equipo Bruker Tensor 27 en el rango de 500- 4000 cm^{-1} .

Los puntos de fusión se determinaron en el equipo MELT-TEMP® LABORATORY DEVICES INC. USA. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Zeiss (Alemania).

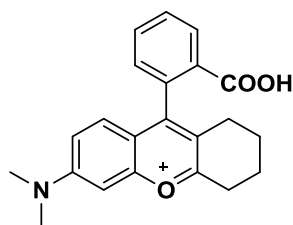
7.2.- Procedimiento

La síntesis de los compuestos estudiados se realizó de acuerdo con mecanismos similares anteriormente descritos en la literatura y a procedimientos desarrollados por el grupo de investigación.

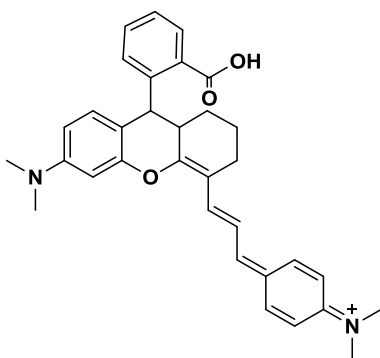


Síntesis de ácido 2-(4-(dimetilamino)-2-hidroxibenzoil) benzoico (**Pr1**): Se mezclaron 3-(dimetilamino) fenol (1.000 g, 3.5 mmol) y anhídrido ftálico (1.079 g, 7 mmol) en 21 ml de Tolueno, se agitó a 120 °C a reflujo durante 24 h, el tolueno se evaporó a presión reducida, se adicionó al producto seco 100 mL de NaOH (35 % m/v) se agitó a 90 °C durante 24 h. La mezcla fue neutralizada con HCl, se obtuvo un precipitado violeta, éste se cristalizó por par de disolventes MeOH: H₂O. El producto final tuvo punto de fusión 182-183 °C y la masa equivalente al 74% de rendimiento. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 12.44 (s,1H), 8.10 (d,1H, J = 8), 7.63 (t,1H, J = 8), 7.53 (t, 1H, J = 8), 7.36 (d, 1H, J = 8), 6.90 (d,1H, J = 12), 6.16 (s, 1H), 6.08 (d,1H, J = 12), 3.03 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 400MHz): 198.76, 170.08, 165.14, 155.98,141.18,134.33, 132.78, 131.08, 129.22, 127.99, 127.74, 110.36, 104.03, 97.78, 39.98. FT-IR (cm^{-1}) O-H fenólico (3195.67), C=O (1720.89) O-H

ácido carboxílico (1254.97). HRMS (ESI+, m/z) calculada para: C₁₆H₁₅NO₄ fue de 285.1001, encontrada de 286.1298.

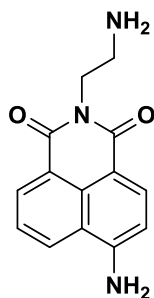


Síntesis de 9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-1, 2, 3, 4-tetrahidroxantilo (**Pr2**): A una disolución del compuesto **Pr1** (0.5 g, 1.75 mmol) en 3 mL de H₂SO₄ se añadió gota a gota ciclohexanona (0.36 mL, 3.5 mmol) a 0 °C, se agitó y calentó gradualmente a 90 °C, se mantuvo a esa temperatura 2.5 h. La mezcla se enfrió en baño hielo y se le adicionó gota a gota HClO₄ (0.3 mL, 7 mmol) para obtener un precipitado rojo, la mezcla se filtró al vacío y el sólido se recrystalizó en MeOH. El producto tiene 220 °C de p.f. y un rendimiento de 61 %. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 8.26 (d, 1H, J = 8), 7.92 (t, 1H, J = 4), 7.81 (t, 1H, J = 4), 7.40 (d, 1H, J = 8), 7.35 (d, 1H, J = 8), 7.20 (s, 1H), 7.06 (d, 1H, J = 8) 3.29 (s, 6H), 2.27-2.15 (m, 2H), 2.15-2.05 (m, 2H), 1.91 (t, 2H, J = 8), 1.71 (t, 2H, J = 8). ¹³C NMR (DMSO, 400 MHz) 170.39, 165.65, 164.37, 158.99, 157.58, 134.12, 131.25, 129.83, 129.35, 128.52, 121.31, 119.39, 117.24, 95.98, 55.38, 53.08, 29.41, 25.23, 21.38, 21.06. FT-IR (cm⁻¹) COOH (3429.81). HRMS (ESI+, m/z) calculada para: C₂₀H₁₇NO₃⁺ 348.1599, encontrada 348.1862.



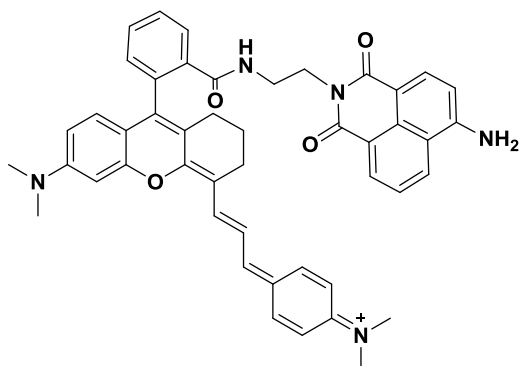
Síntesis de *N*-(4-(3-(9-(2-carboxifenil)-dimetilamino)-2,3-dihidro-1*H*-xanten-4-il)alilideno)ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-*N*-metilmetanamonio (**RCin**): Una disolución de **Pr2** (0.10 g, 0.3 mmol) y cinamaldehído (0.05 g, 0.3 mmol) en 10 mL

de anhídrido acético se agitó a 0 °C durante media hora en atmósfera inerte. Subsecuentemente se calentó a 60°C y se mantuvo en agitación 3 h. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el sólido se purificó mediante cromatografía en columna (DCM:MeOH = 9:1). Se obtuvo un sólido azul con dorado correspondiente al 55 % y p.f de 189 °C, ¹H NMR (DMSO, 400 MHz d): δ 9.66 (s,1H), 7.94 (d,1H, *J* = 8), 7.80 (t, 1H, *J* = 8), 7.68 (t, 1H, *J* = 8), 7.43 (d, 2H, *J* = 8), 7.28 (d, 1H , *J* = 12), 7.05(s, 1H), 7.01 (d, 1H , *J* = 12), 6.80 (t, 1H, *J* = 8), 6.71 (d, 2H, *J* = 12), 6.54 (d 1H, *J* = 8), 6.48 (d 1H, *J* = 8),6.41 (d 1H, *J* = 8), 2.94 (s, 6H), 2.93 (s, 6H), 2.83 (m, 2H), 2.75 (m, 2H), 1.63 (m, 2H). ¹³C NMR (DMSO, 400 MHz) 165.76, 162.98, 159.71, 157.30, 156.39, 152.47, 147.72, 141.97, 135.00, 134.03, 131.23, 130.69, 129.73, 129.01, 128.85, 124.41, 124.00, 122.31, 120.62, 117.14, 116.14, 112.60, 96.37, 53.02, 40.88, 26.35, 24.97, 20.87. FT-IR (cm⁻¹) COOH (3535.57), metilenos (2923.57, 2858.12), C-O-C (1084.64) HRMS (ESI+, m/z) calculada para: C₃₃H₃₄N₂O₃, 505.64 encontrado 505. 2482



Síntesis de 6-amino-2-(2-aminoetil)-4*H*-benzoisoquinolina-1,3(2*H*)-diona (**Naph**): A 0.1 g (0.391 mmol) de 6-amino-1*H*, 3*H*benzo [de] isocromeno-1,3-diona se añadió etilendiamina (3 mL), se cerró a presión y se agitó a 120 °C durante 6 h. La mezcla de reacción se enfrió y se vertió en acetona, el sedimento se recogió por filtración y se secó a presión reducida para proporcionar un sólido amarillento, se purificó por cromatografía en columna (DCM:MeOH = 8:2).p.f. 190 °C y 77 % de rendimiento. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 8.61 (d,1H, *J* = 8), 8.42 (d,1H, *J* = 8), 8.19 (d, 1H, *J* = 8), 7.66 (t, 1H, *J* = 8), 7.42 (s, 2H), 6.85 (d, 1H *J*=8), 4.04 (t, 2H, *J* = 8), 2.76 (t, 2H, *J* = 8). ¹³C NMR (DMSO, 400 MHz):164.46, 163.59, 153.09, 134.35, 131.40, 130.19, 129.66, 124.40, 122.37, 119.83, 108.59, 108.14, 42.74. FT-IR (cm⁻¹) N-C=O (3495.23, 3414.80), amina unida a anillo aromático (1676.40,

1638.14, 1578.81) C-NH₂ (1090.13) HRMS (ESI+, m/z) calculada para: C₁₄H₁₃N₃O₂, 255.28 encontrado 256.108 .



Síntesis **(RCN)**: Síntesis de (*E*)-*N*-(4-(3-(9-(2-((2-(6-amino-1,3-dioxo-1*H*-benzo[de]isoquinolin-2(3*H*)-il)etil)carbamoil)fenil)-6-(dimetilamino)-2,3-dihidro-1*H*-xanten-4-il)alilideno)ciclohexa-2,5-dien-1-ilidene)-*N*-metilmetanamino **(RCN)**: Se mezcló a temperatura ambiente y en atmósfera de argón, *N*-(4-(3-(9-(2-carboxifenil)-dimetilamino)-2,3-dihidro-1*H*-xanten-4-il)alilideno)ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-*N*-metilmetanamino **(RCin)** (0.100 g, 0.2 mmol), 6-amino-2-(2-aminoetil)-4*H*-benzoisoquinolina-1,3(2*H*)-diona **(Naph)** (0.107 g, 0.4 mmol), Cs₂CO₃ (0.128 g, 0.4 mmol) y HBTU (0.379 g, 0.4 mmol) en 8 mL de dimetilformamida (DMF), se agitó 1 h a temperatura ambiente, subsecuentemente se calentó a 90 °C durante 24h. Se realizó una extracción DCM:H₂O (2X), el disolvente se evaporó bajo presión reducida para obtener un sólido café amarillento que se purificó por cromatografía en columna (DCM:MeOH=95:05) p.f. 152 °C y 40 % de rendimiento ¹H NMR (DMSO, 700 MHz): δ 8.57 (d,1H, *J* = 8), 8.30 (d,1H, *J* = 8), 8.07 (d, 1H, *J* = 8), 7.76 (d,1H, *J* = 8) 7.60 (t, 1H, *J* = 8), 7.56 (t, 2H, *J* = 12), 7.51 (d,1H, *J* = 8) 7.04 (d,1H, *J* = 8), 7.00 (t,1H, *J* = 8), 6.97 (s,1H), 6.80 (d,2H, *J* = 8) 6.72 (d,2H, *J* = 8), 6.21 (d,1H, *J* = 8), 6.11 (d,1H, *J* = 8) 5.66 (d,1H, *J* = 8), 3.43 (t, 2H, *J* = 8), 2.98 (t, 2H, *J* = 8), 2.94 (s, 6H), 2.73 (t,2H, *J* = 8), 2.61 (s,6H), 1.67 (t,2H, *J*=12), 1.57 (t,1H, *J* = 12). ¹³C NMR (DMSO, 400 MHz): 207.30, 169.30, 164.90, 163.91, 152.70, 152.87, 150.99, 150.45, 147.84, 134.93, 133.78, 132.40, 131.24, 130.23, 128.96, 128.42, 127.90, 126.56, 124.91, 123.75, 123.31, 121.08, 120.30, 112.74, 109.53, 108.88, 107.57, 105.99, 98.61, 77.34, 67.37, 51.22, 40.78, 40.23, 39.33, 32.25, 31.26, 29.99, 29.60, 26.52, 23.42, 23.02, 22.58, 14.45. FT-IR (cm⁻¹) enlace amida (3443.88), amina (3249.27), enlace C-N

(2855.14) C=O (1719.10) O=C-N-C=O (1687.06) C=N (1638.73) amina unida a anillo aromático (1377.25) C-O-C (1126.03) HRMS (ESI+, m/z) calculada para C₄₇H₄₅N₅O₄, 742.34 encontrado 742.3413

8.-Metodología analítica

8.1.-Espectroscopía óptica

Los espectros de absorción de cada molécula se realizaron en el espectrofotómetro Cary Series UV-Vis en celdas de cuarzo de 1.0 cm y 3.5 mL de capacidad. Los espectros de emisión fueron obtenidos empleando el Fluorímetro FS5 en una celda de cuarzo de 1.0 cm a 20 ± 1 °C. Para llevar a cabo dichas mediciones con cada una de las moléculas, se preparó una disolución stock de <10 mg de compuesto en 700 µL de DMSO, de la cual se añadió 1 µL a 200 µL de disolvente (grado HPLC o equivalente) en turno dentro de la celda de cuarzo.

8.2.-Microscopía confocal

La sonda, así como los fluoróforos sintetizados fueron analizados en células de adenocarcinoma de pulmón humano (SK-LU-1) mediante microscopía confocal, con el fin de determinar la localización a nivel celular y evaluar el funcionamiento.

Las células fueron sembradas en cajas Petri de 5 cm de diámetro con fondo de vidrio, se cultivaron en medio RPMI-1640, suplementado con 10 % de suero fetal bovino, L-glutamina (2 µM), penicilina G (100 U/mL), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C en atmósfera anaerobia (5 % CO₂ v/v).

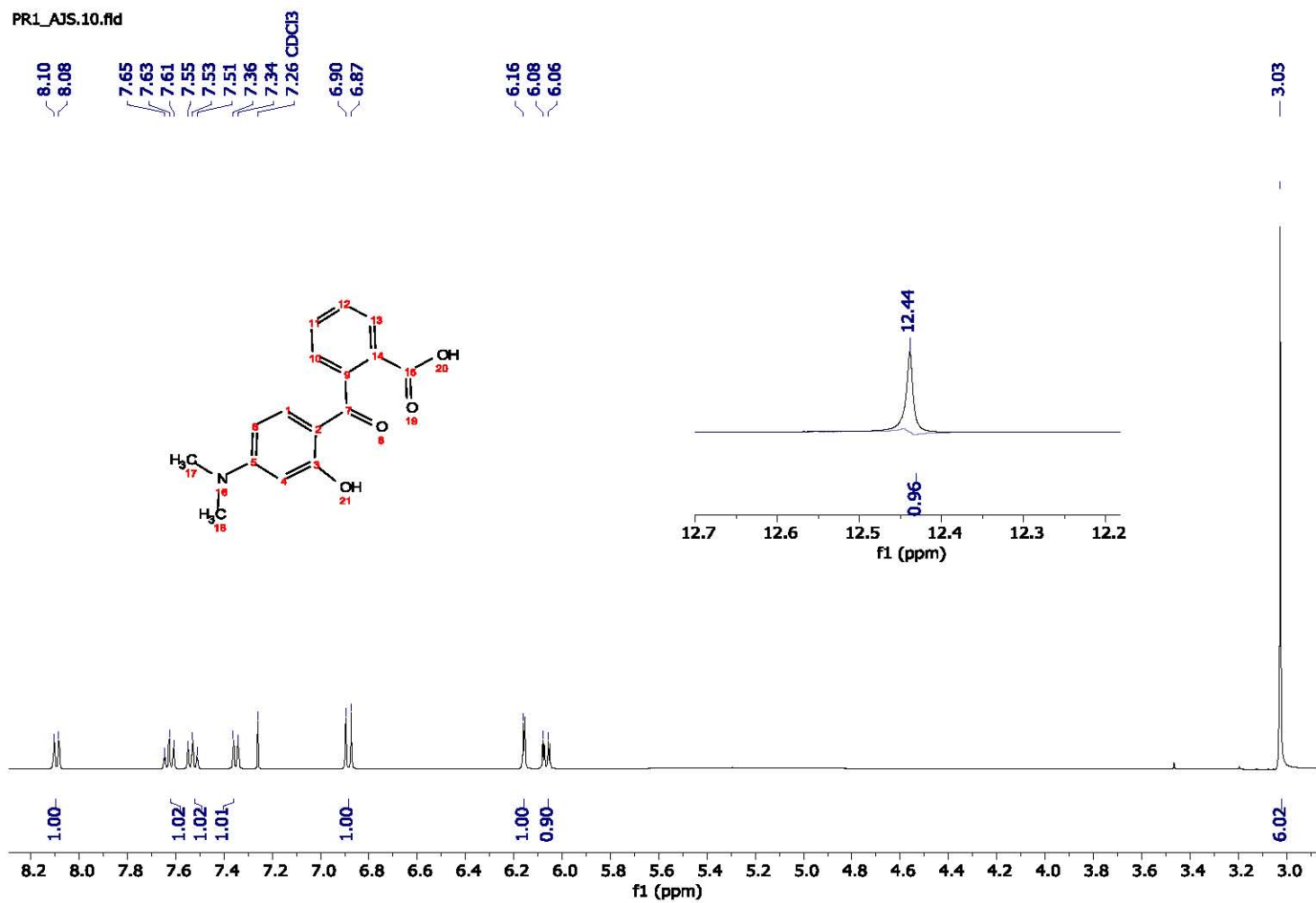
El manejo de las células se realizó en condiciones totales de asepsia, la tinción así como la aplicación de tratamientos a las células, se llevó a cabo justo antes de la observación en el microscopio y toma de imágenes, de acuerdo con la metodología que a continuación se describe:

- 1.-Observación en microscopio óptico para verificar la integridad, adherencia y confluencia de los cultivos celulares.
- 2.-Realizar la succión del medio de cultivo en cámara previamente esterilizada por luz ultravioleta.

- 3.-Lavar las células con buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4) dos veces, cuidando no despegar las células de la caja.
- 4.-Añadir 1 mL de medio RPMI-1640, adicionar tratamiento o molécula disuelta en DMSO e incubar 30 min a 37 °C.

Anexo 1

Caracterización de Pr1



Espectro 1.1-Espectro ^1H NMR de 2-(4-(dimetilamino)-2-hidroxi-benzoyl) ácido benzoico en $\text{CDCl}_3\text{-}\delta_6$, 400 MHz.

C_PR1_AJS.10.fid

134.33
132.78
131.08
129.22
127.99
127.74

110.36

104.03

97.78

77.35
77.03
76.72

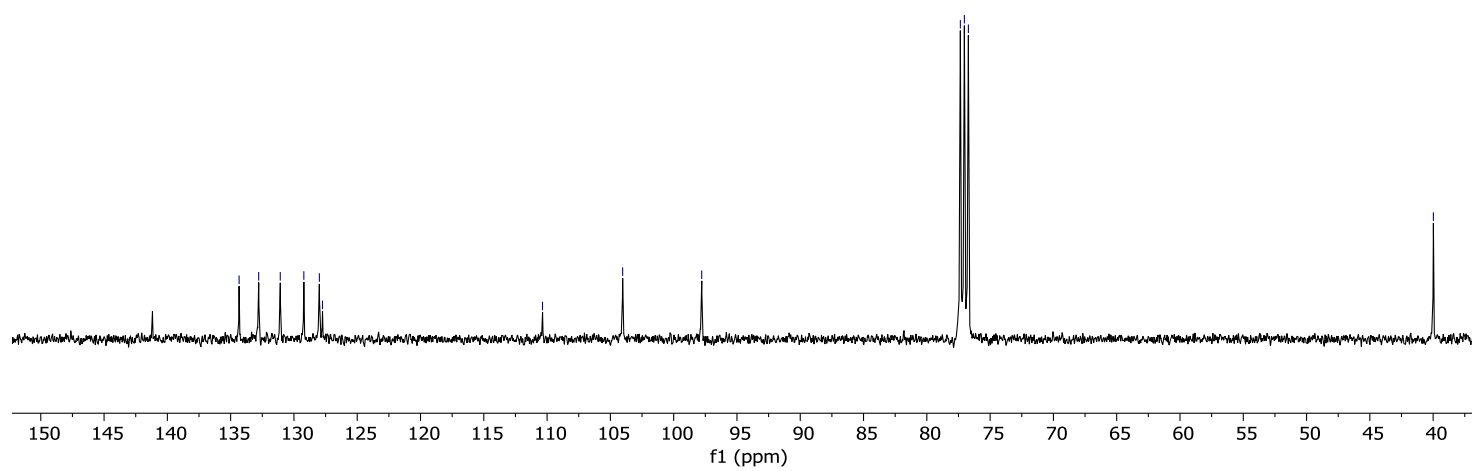
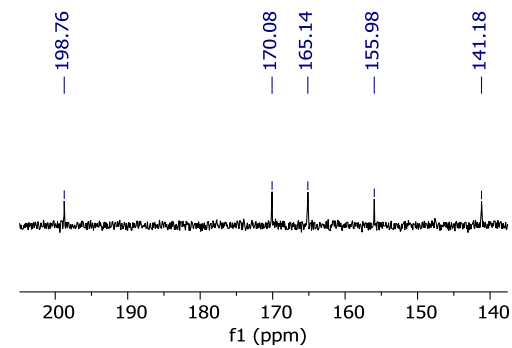
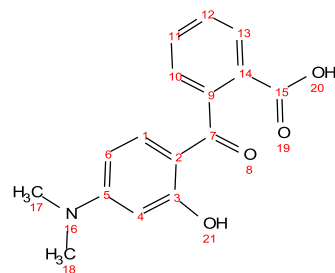
198.76

170.08

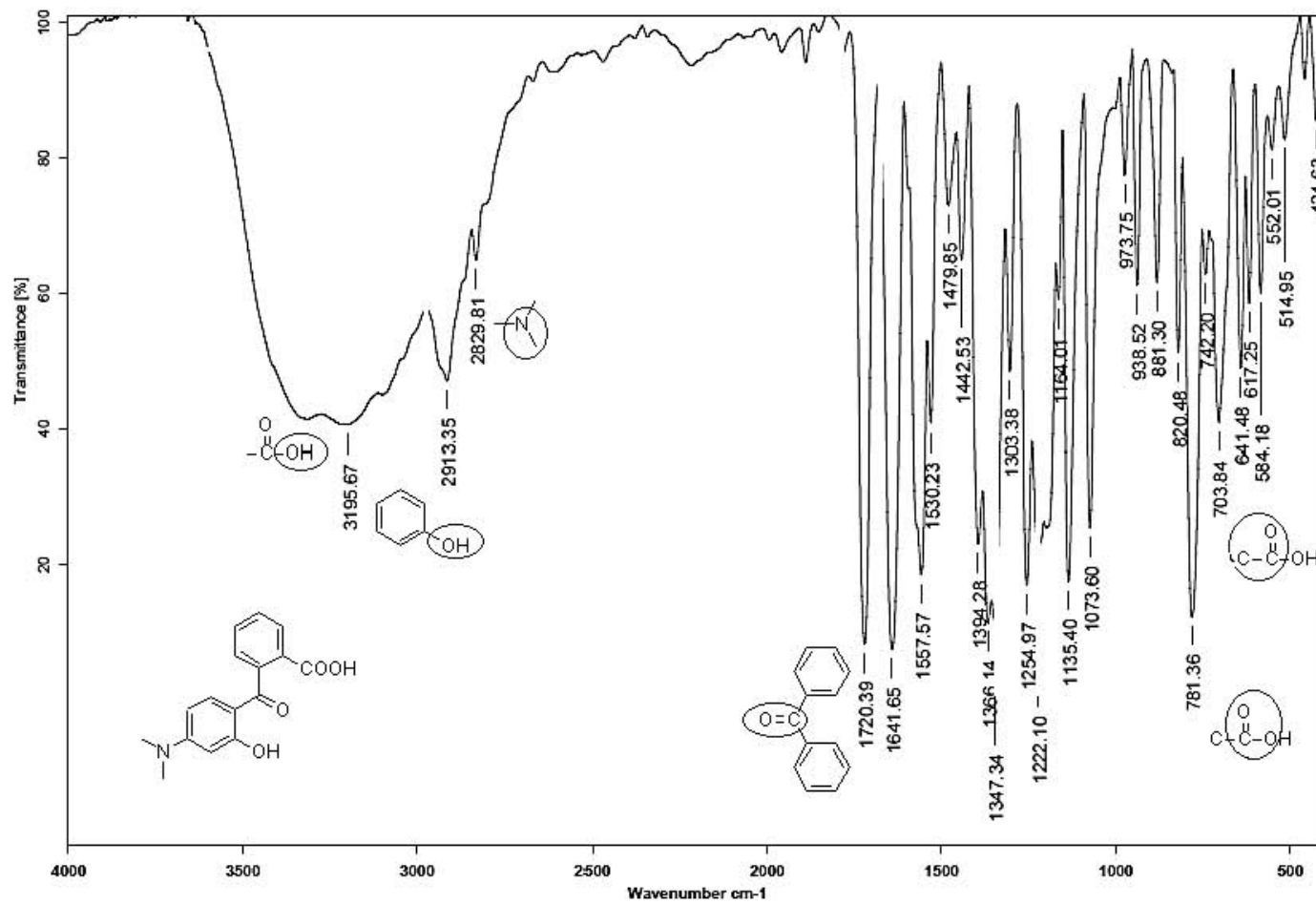
165.14

155.98

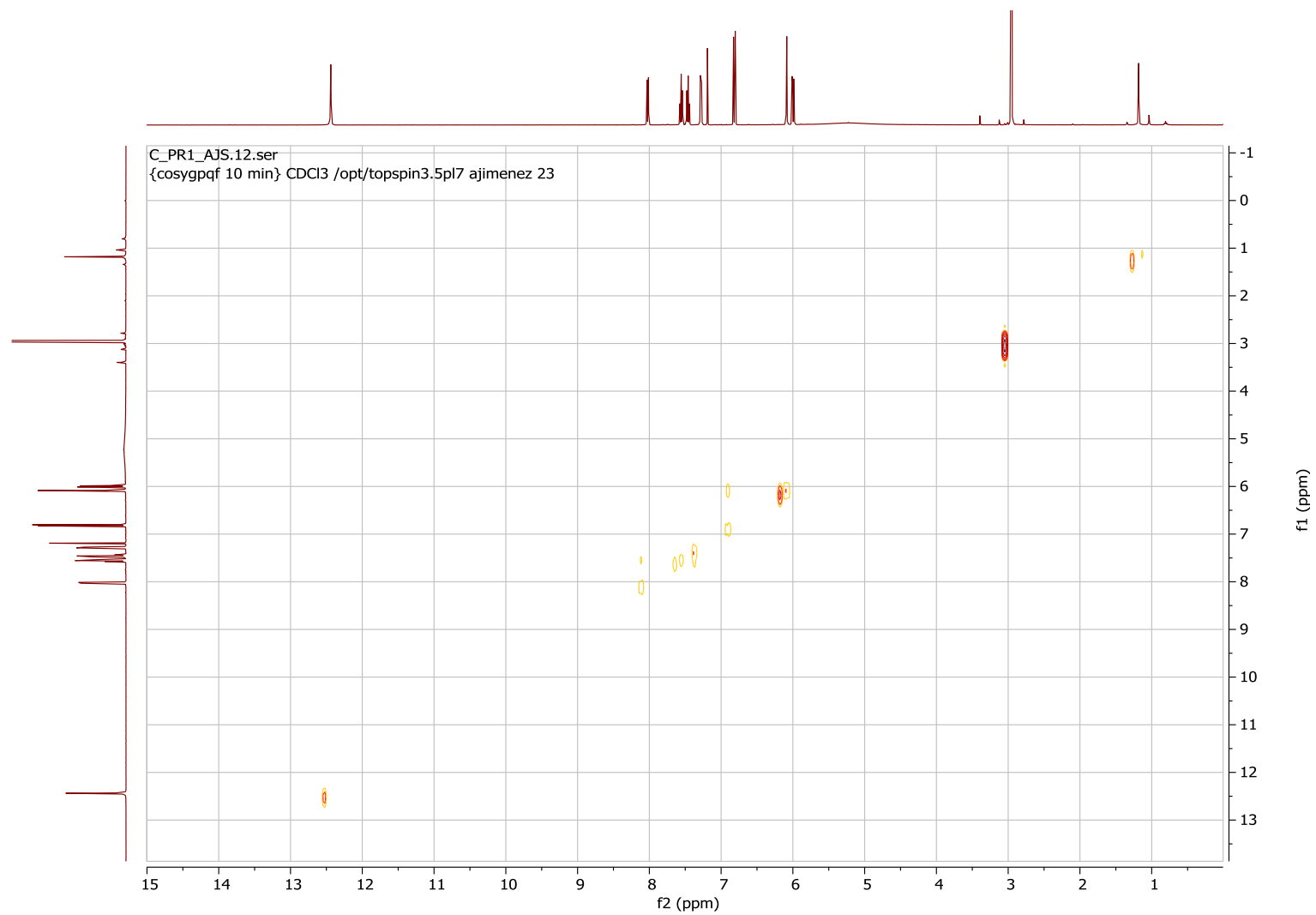
39.98



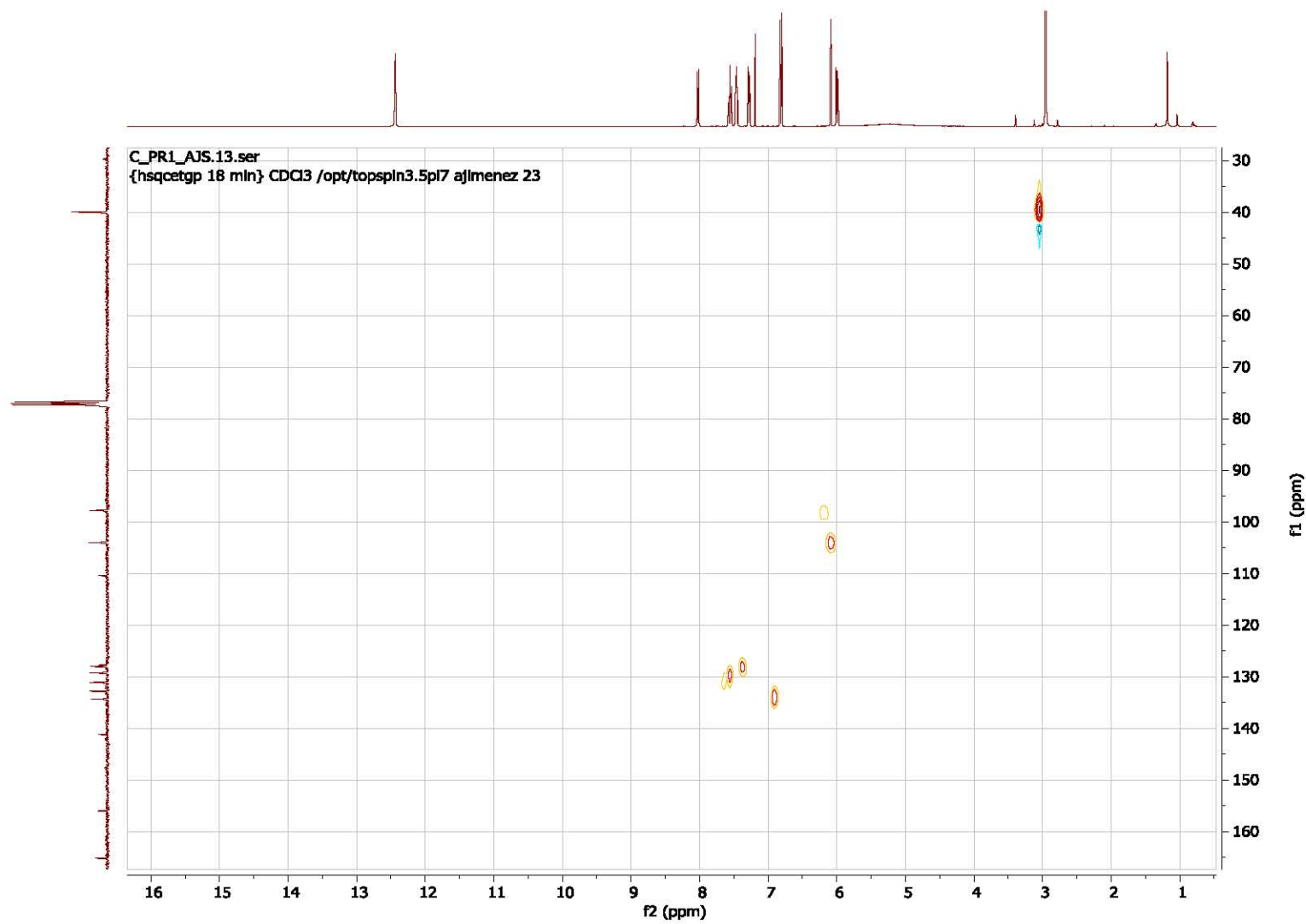
Espectro 1.2- Espectro ^{13}C NMR de 2-(4-(dimetilamino)-2-hidroxibenzoil) ácido benzoico en $\text{CDCl}_3-\delta_6$, 400 MHz.



Espectro 1.3-Espectro IR de 2-(4-(dimetilamino)-2-hidroxibenzoil) ácido benzoico en KBr.

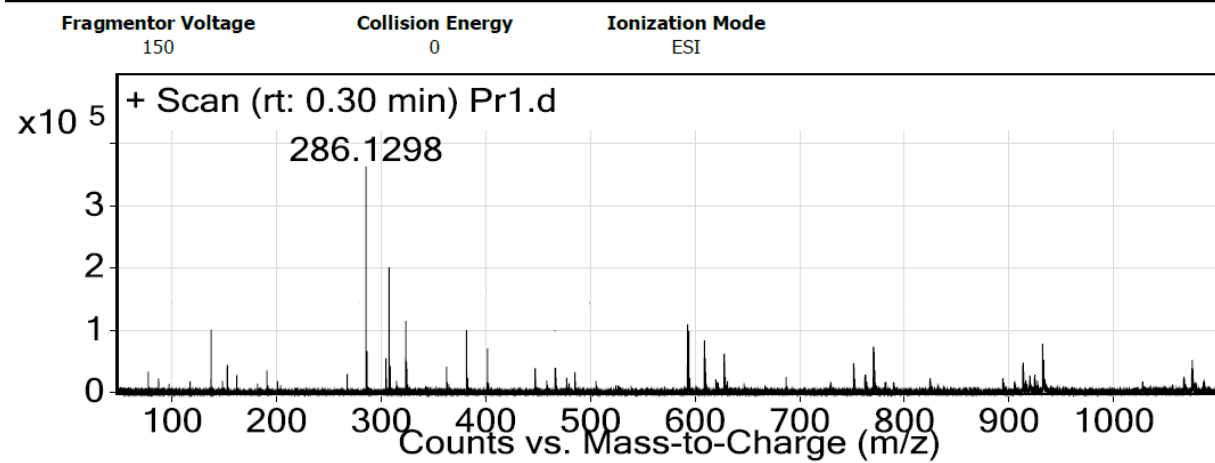


Espectro 1.4-Espectro COSY de 2-(4-(dimetilamino)-2-hidroxi-benzoil) ácido benzoico en $\text{CDCl}_3-\delta_6$, 400 MHz.



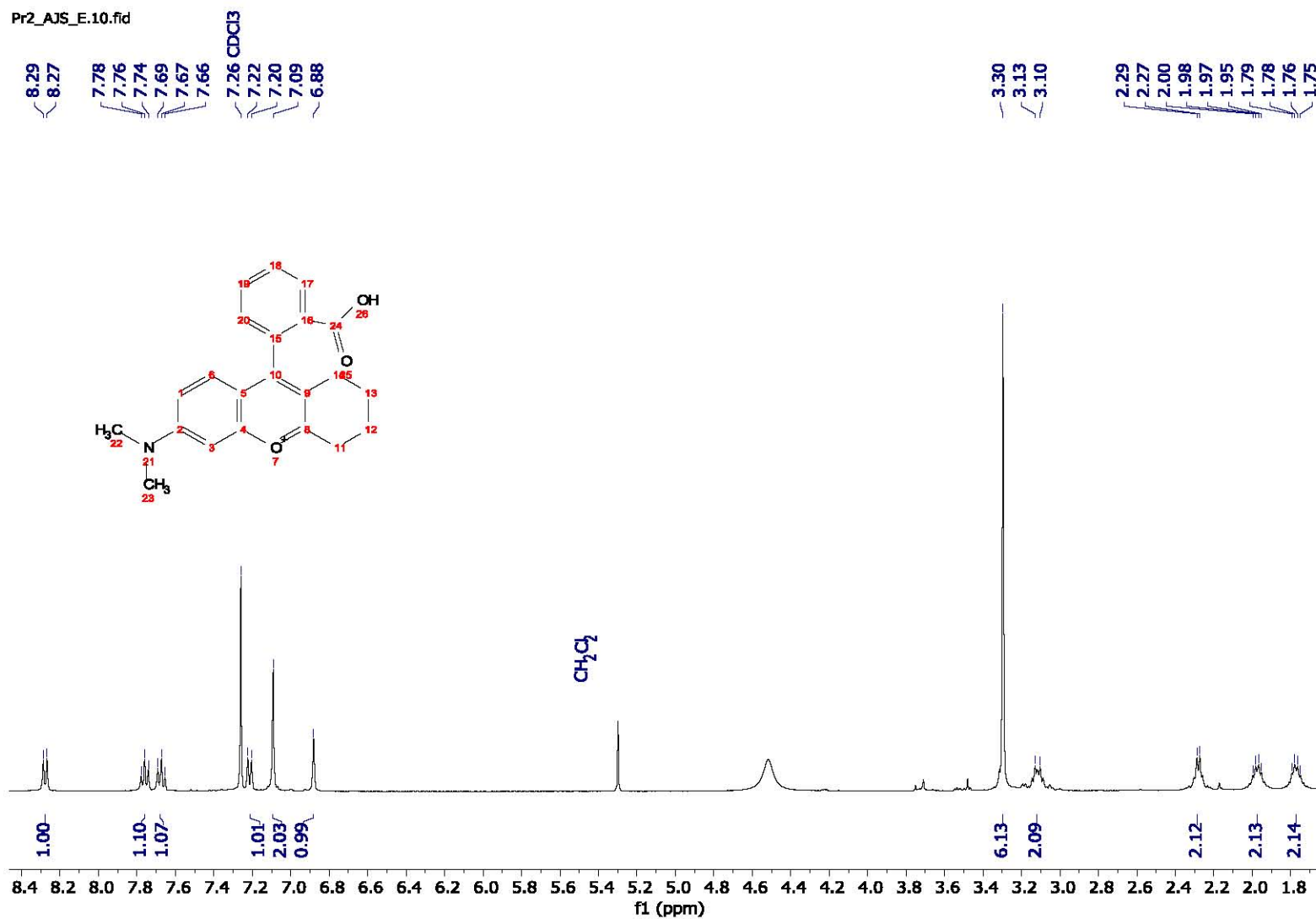
Espectro 1.5-Espectro HSQC de 2-(4-(dimetilamino)-2-hidroxi-benzoi) ácido benzoico en $\text{CDCl}_3\text{-}\delta_6$, 400 MHz.

User Spectra



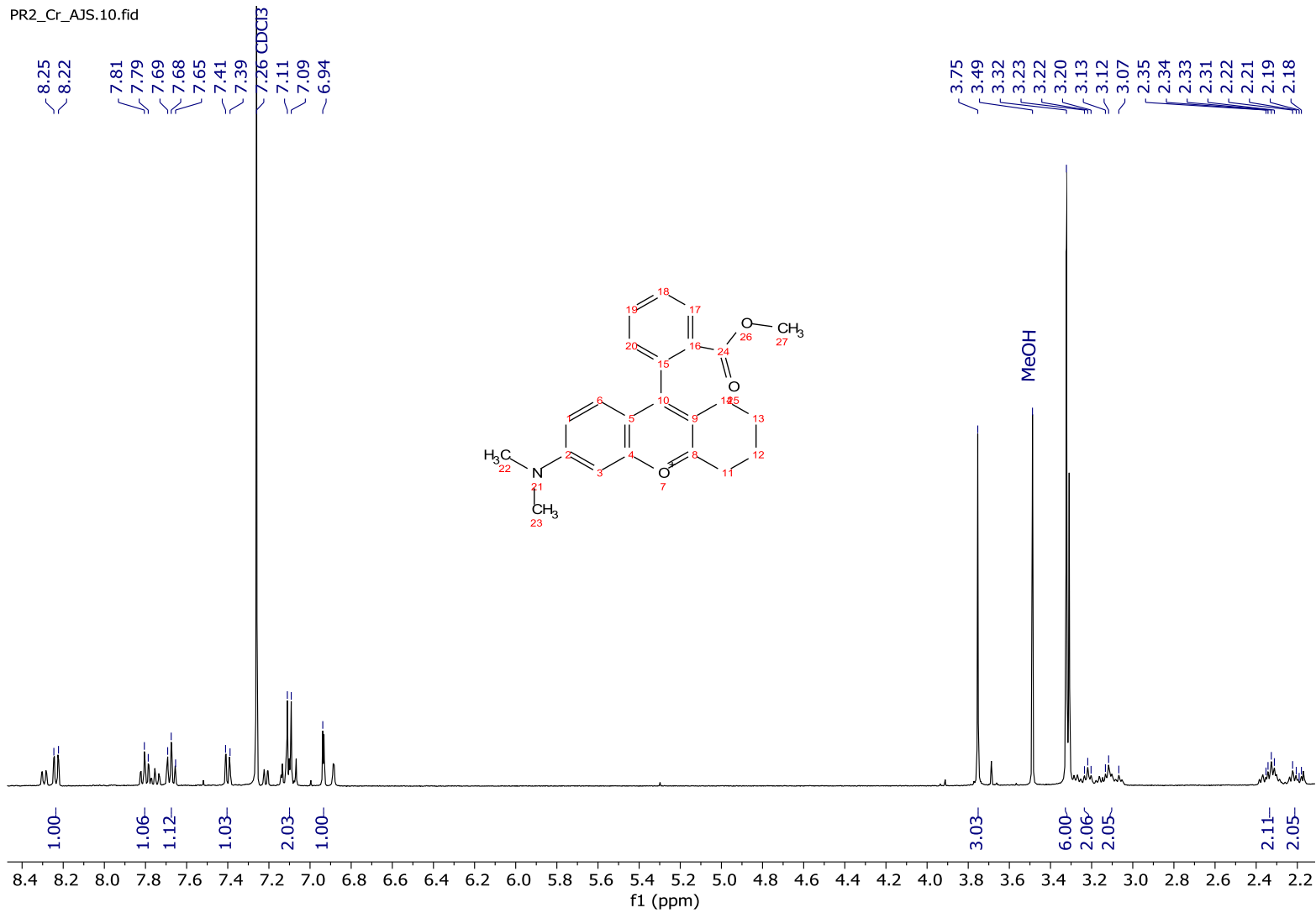
Espectro 1.6-Espectro de masas obtenido mediante ESI⁺ de 2-(4-(dimetilamino)-2-hidroxibenzoil) ácido benzoico.

Caracterización de Pr2



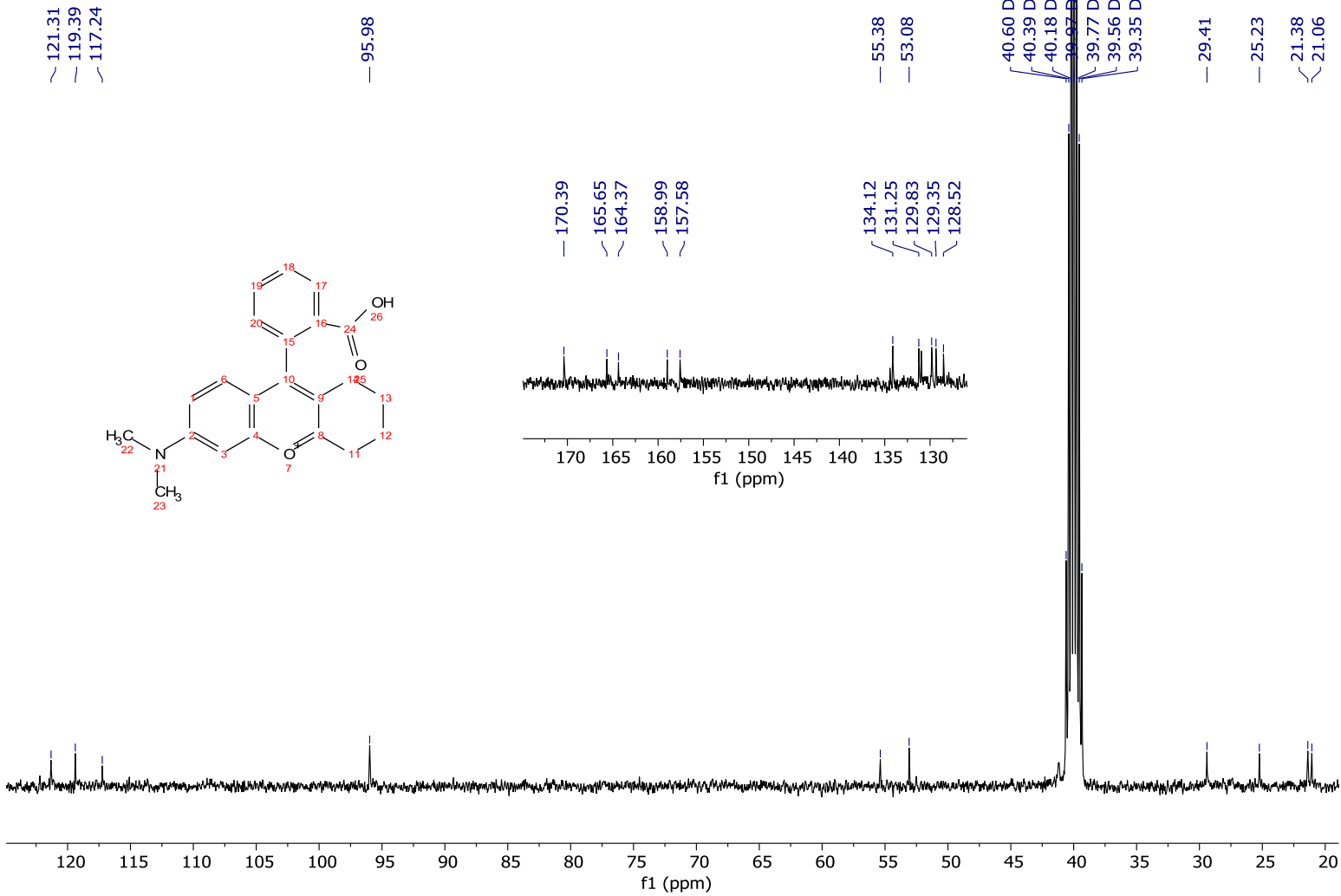
Espectro 2.1-Espectro ¹H NMR de 9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo en DMSO- δ_6 , 400 MHz.

PR2_Cr_AJS.10.fid

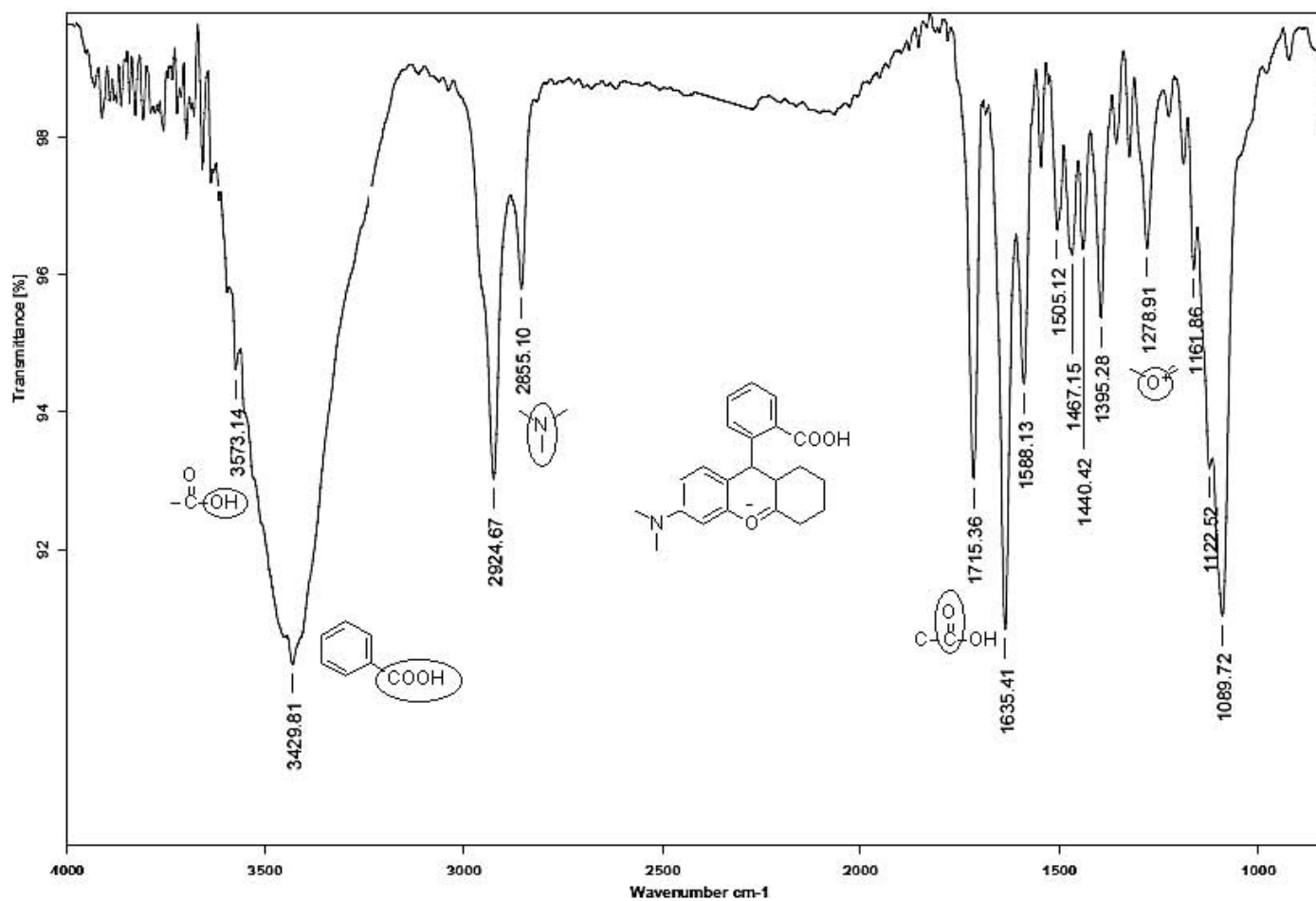


Espectro 2.2-Espectro ¹H NMR de 6-(dimetilamino)-9-(2-(metoxicarbonil)fenil)1,2,3,4-tetrahidroxantilo en CDCl₃-δ₆, 400 MHz.

C_PR2_AJS.10.fid



Espectro 2.3-Espectro ¹³C NMR de 9- (2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo en DMSO-δ₆, 400 MHz.



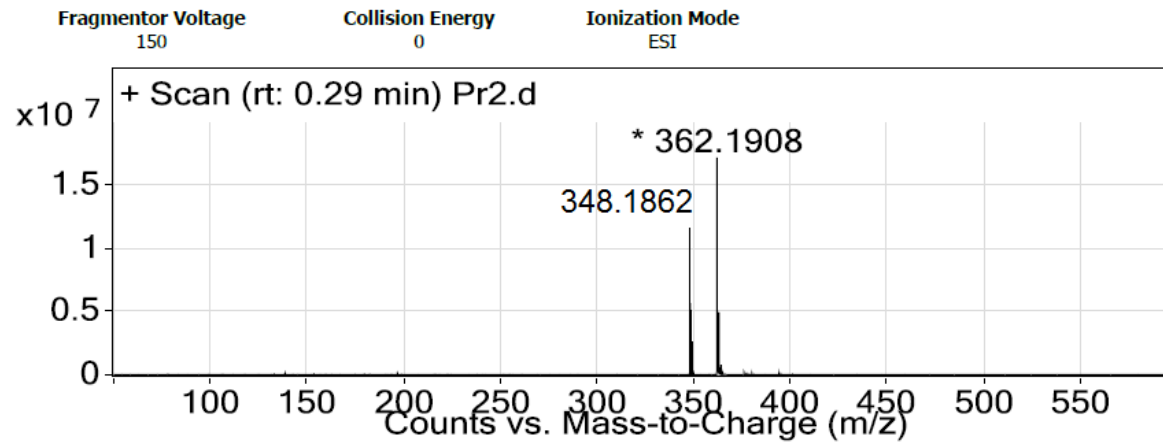
Pr2 KBr/Pastilla RPM

Espectro 2.4-Espectro IR de 9- (2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-1, 2, 3,4-tetrahidroxantilo en KBr.



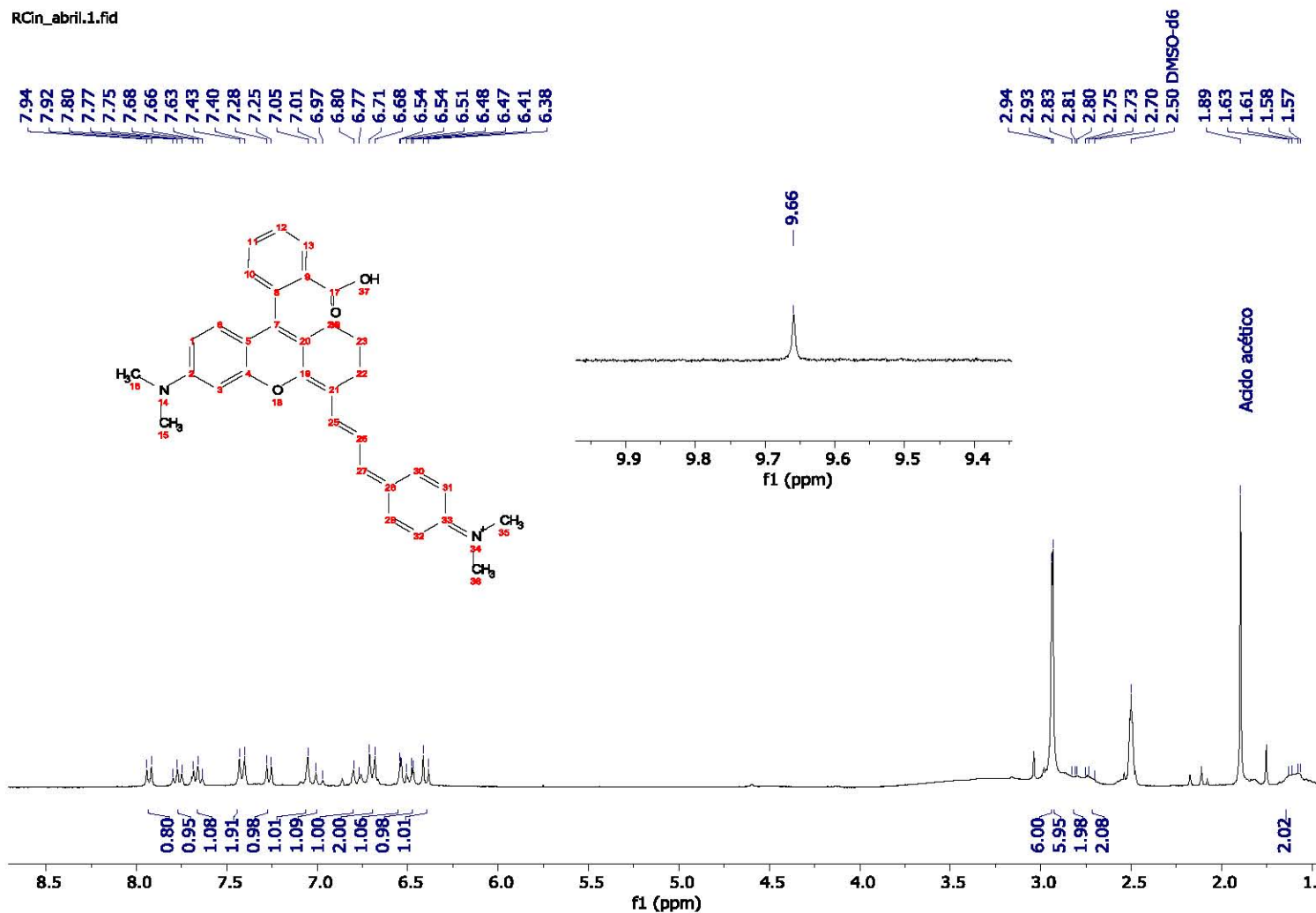
Espectro 2.5-Espectro COSY de 9- (2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo en DMSO- δ_6 , 400 MHz.

User Spectra



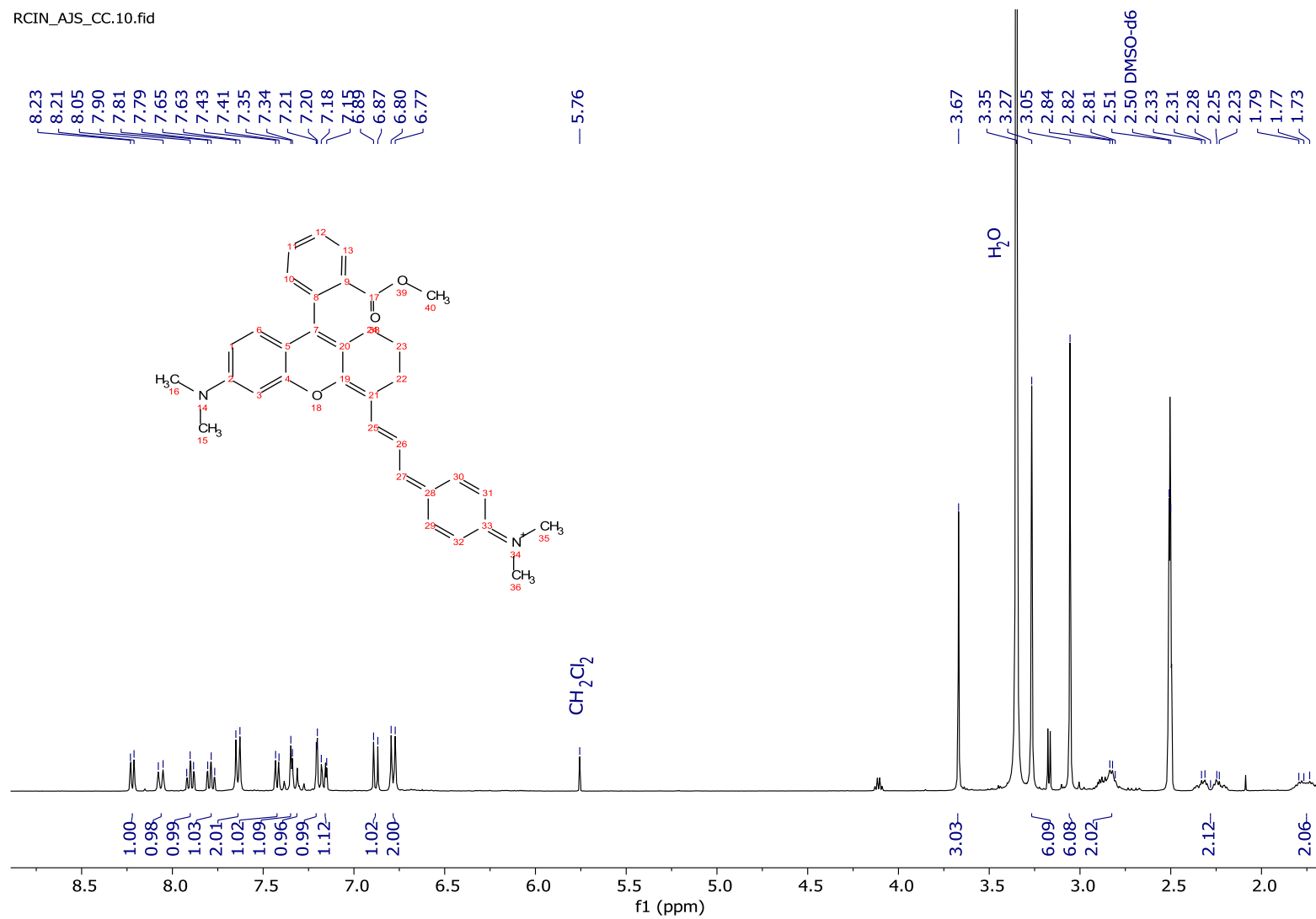
Espectro 2.6-Espectro de masas obtenido mediante la técnica ESI⁺ de 9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo en KBr.

Caracterización de RCin



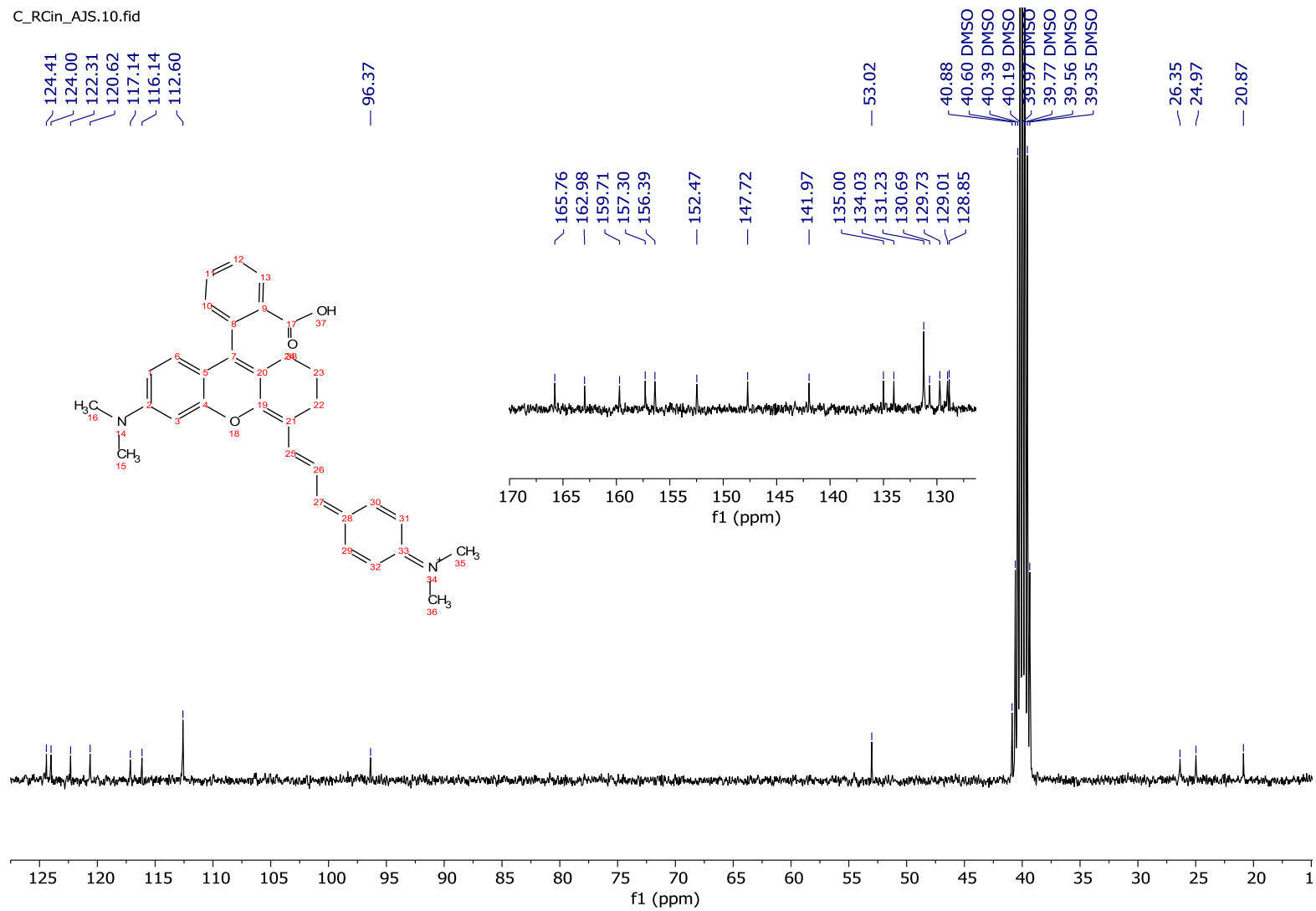
Espectro 3.1- Espectro ^1H NMR de N-(4-(3-(9-(2-carboxifenil)-dimetilamino)-2,3-dihidro-1H-xanten-4-il)alilideno)ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-N-metilmetanamonio (**RCin**) en $\text{DMSO}-\delta_6$, 400 MHz.

RCIN_AJS_CC.10.fid

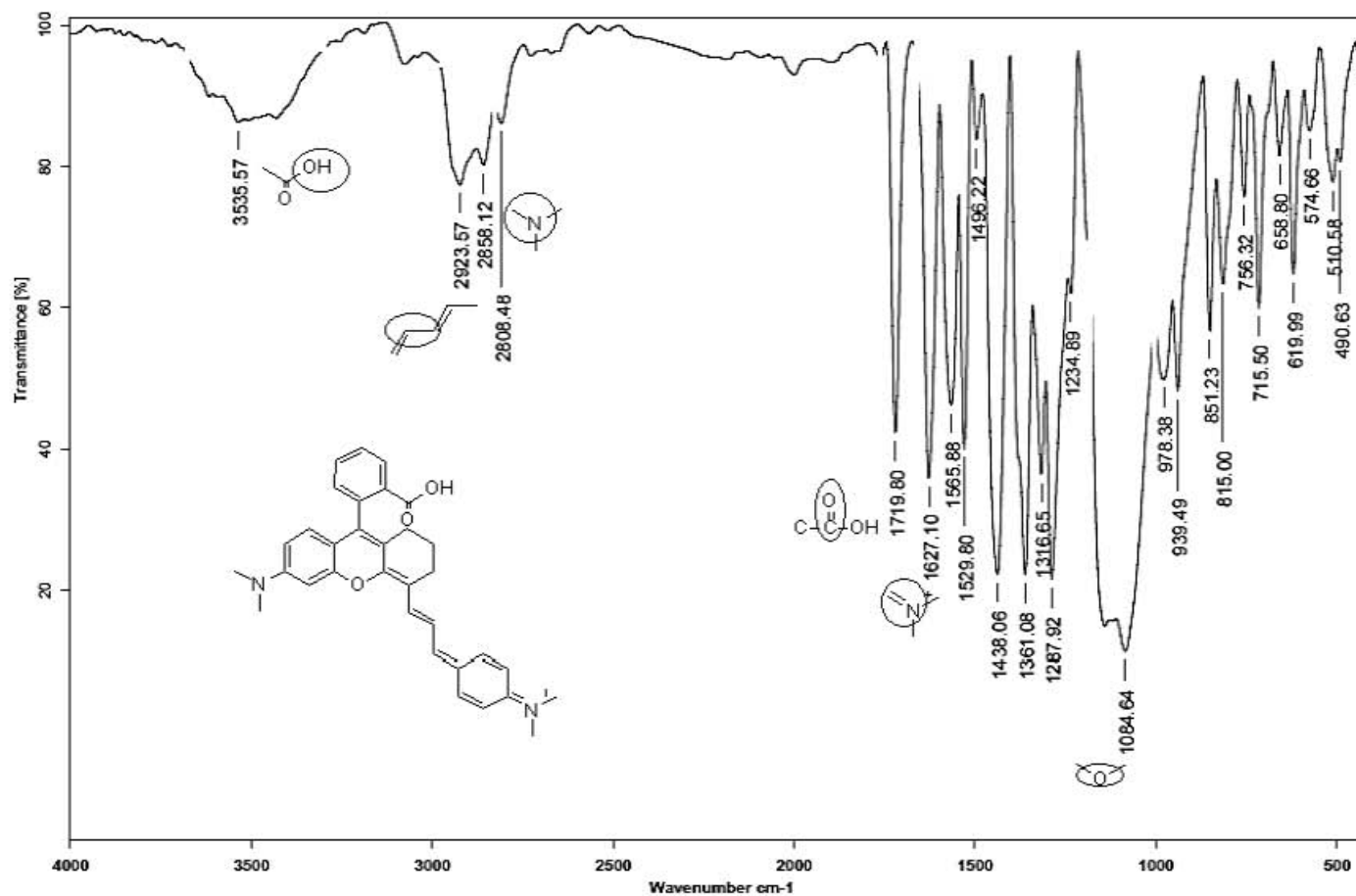


Espectro 3.2- Espectro ¹H NMR de *(E)-N-(4-(3-(6-(dimetilamino)-9-(2-(metoxicarbonil)fenil)-2,3-dihidro-1H-xanten-4-il)alilideno)ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-N-metilmetanamonio (RCinE)* en DMSO- δ_6 , 400 MHz.

C_RCin_AJS.10.fid



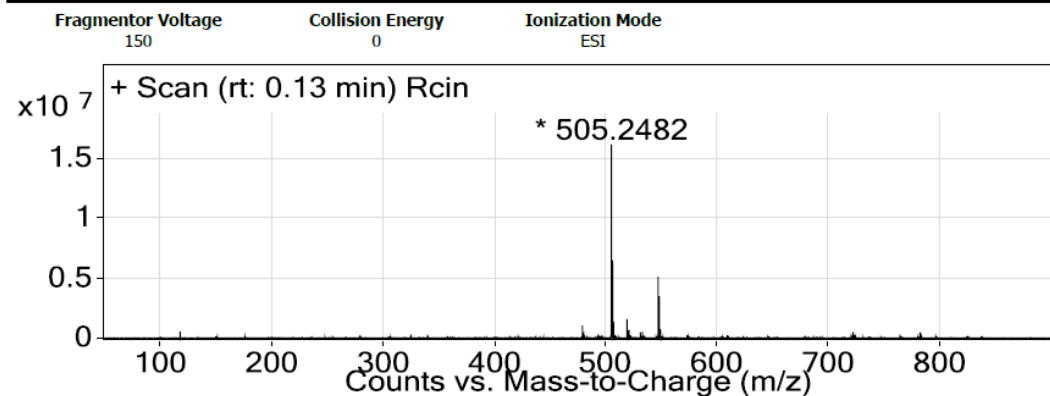
Espectro 3.3.- Espectro ^{13}C NMR de N-(4-(3-(9-(2-carboxifenil)-dimetilamino)-2,3-dihidro-1H-xanten-4-il)alilideno)ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-N-metilmetanamónio (**RCin**) en DMSO- δ_6 , 400 MHz.



RCin KBr/Pastilla

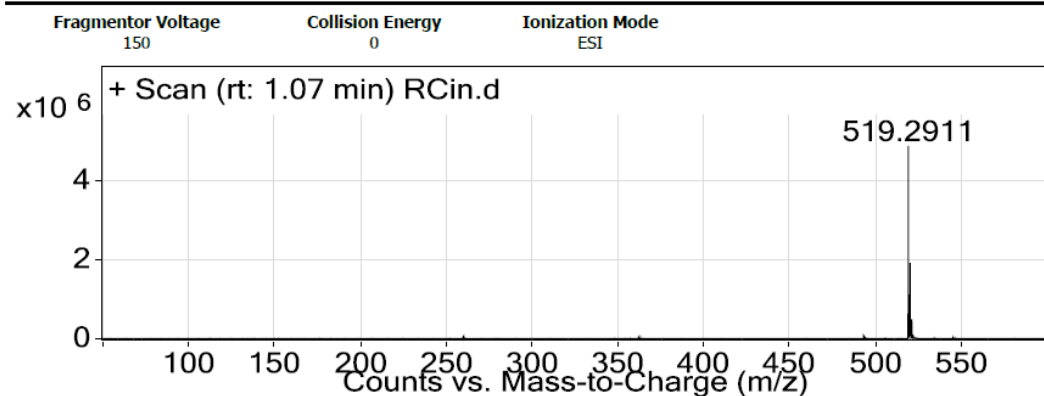
Espectro 3.4- Espectro IR de N-(4-(3-(9-(2-carboxifenil)-dimetilamino)-2,3-dihidro-1H-xanten-4-il)alilideno)ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-N-metilmetanamonio (**RCin**) en KBr.

User Spectra



Espectro 3.5- Espectro de masas obtenido por ESI+ de N-(4-(3-(9-(2-carboxifenil)-dimetilamino)-2,3-dihidro-1H-xanten-4-il)alilideno)ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-N-metilmetanamonio (**RCin**).

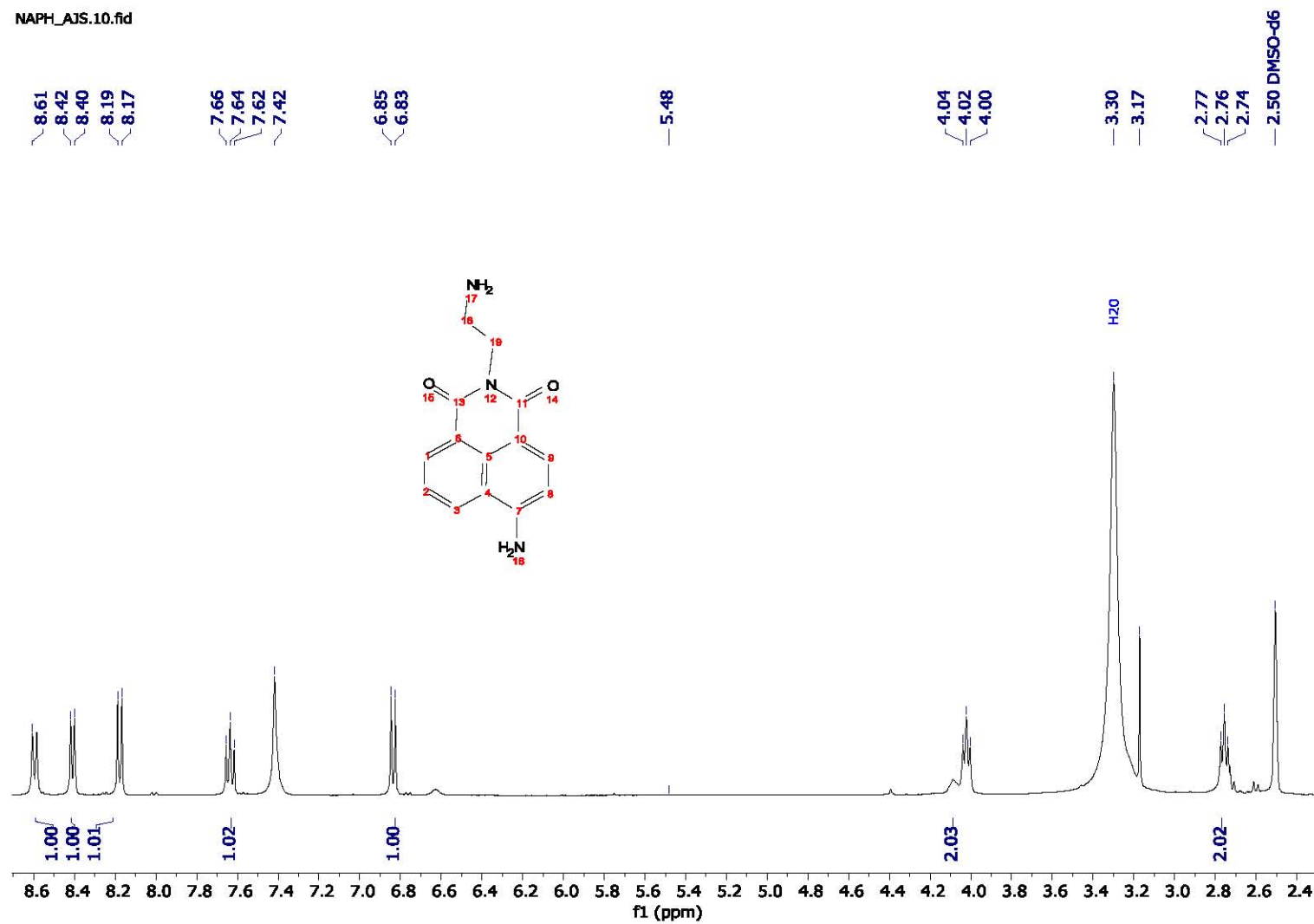
User Spectra



Espectro 3.6- Espectro de masas de (*E*)-N-(4-(3-(6-(dimetilamino)-9-(2-(metoxicarbonil)fenil)-2,3-dihidro-1H-xanten-4-il)alilideno)ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-N-metilmetanamonio (**RCinE**) en DMSO- δ_6 , 400 MHz.

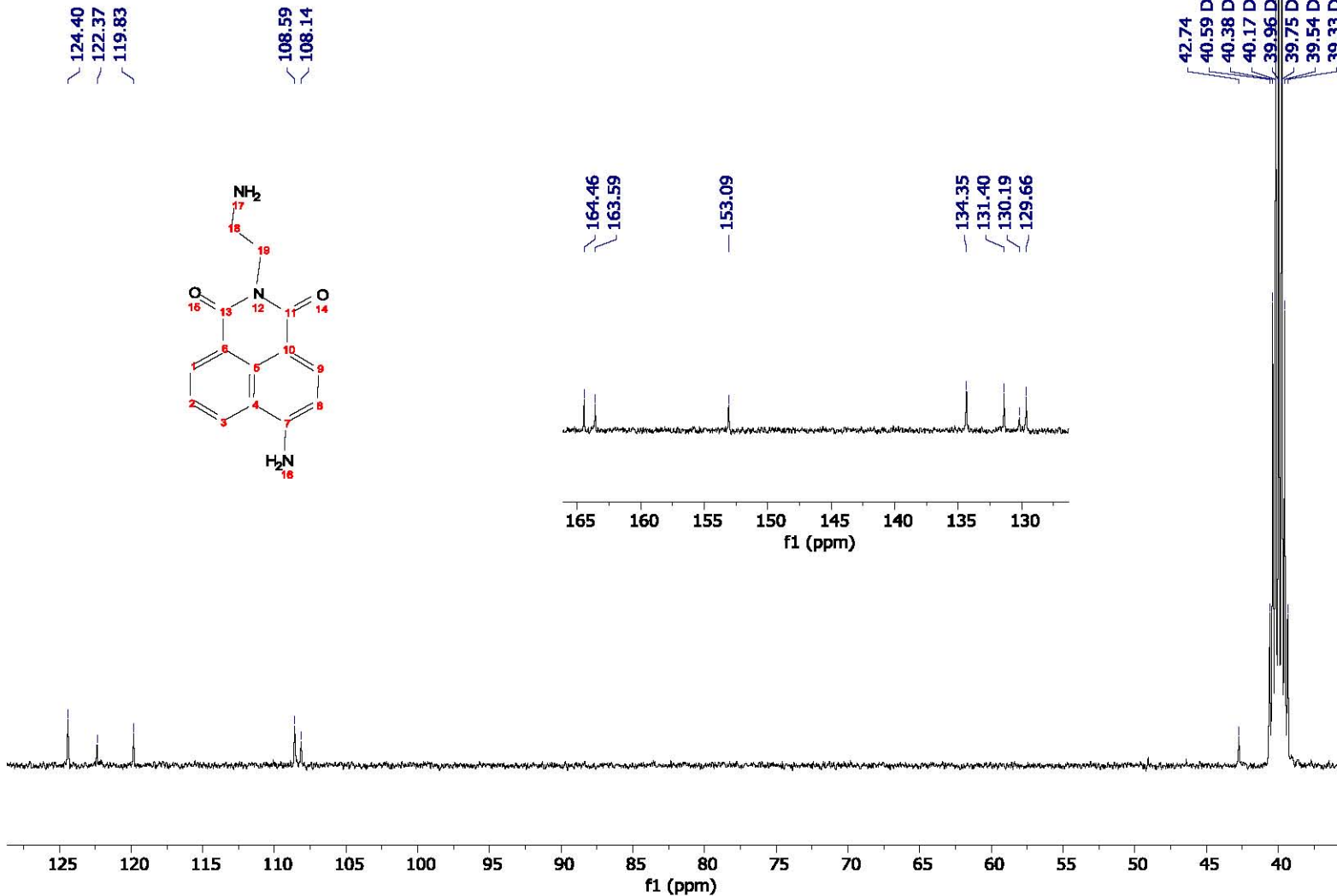
Caracterización de Naph

NAPH_AJS.10.fid

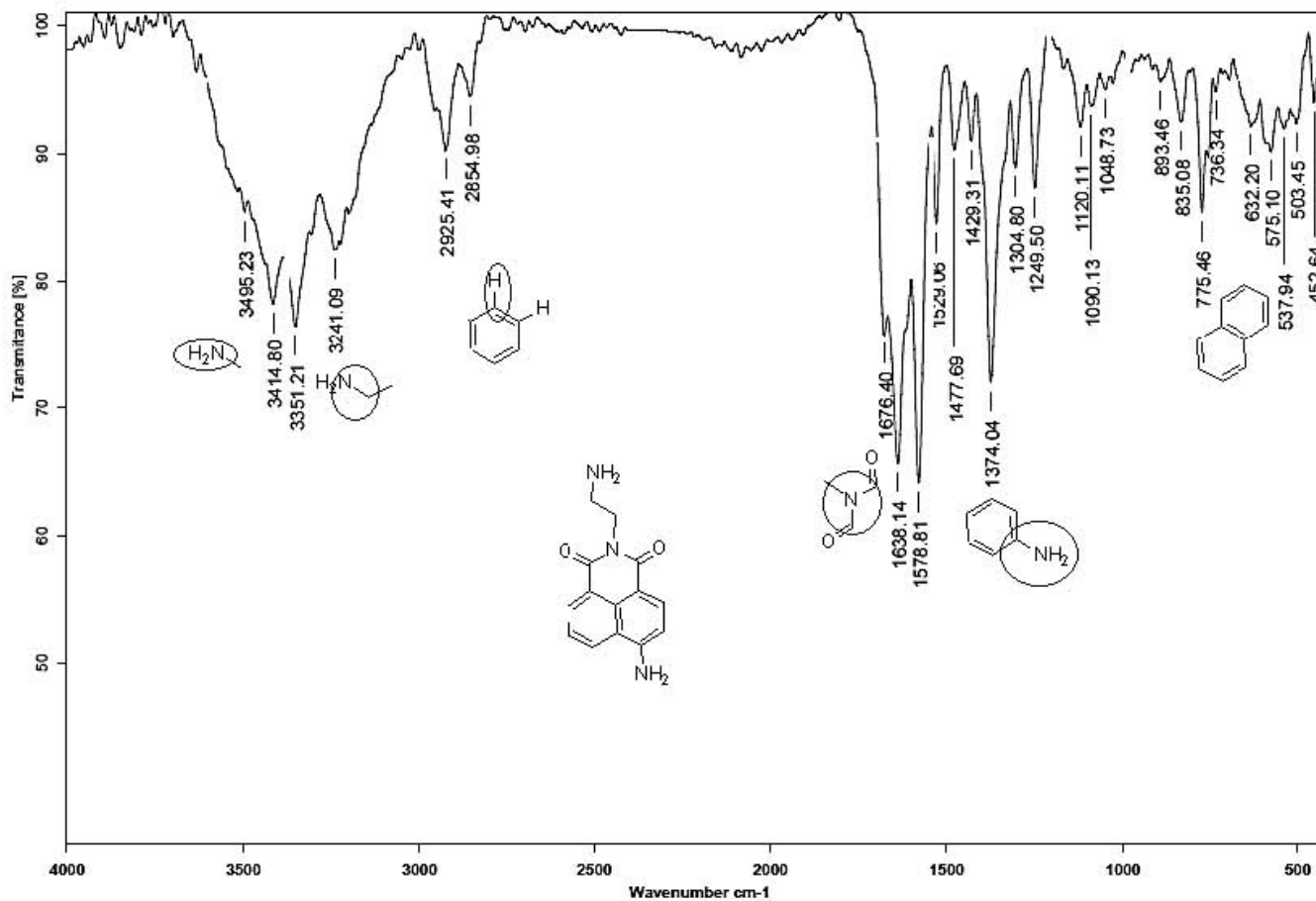


Espectro 4.1- Espectro ¹H NMR de 6-amino-2-(2-aminoetil)-4H-benzoisoquinolina-1,3(2H)-diona (**Naph**) en DMSO-δ₆, 400 MHz.

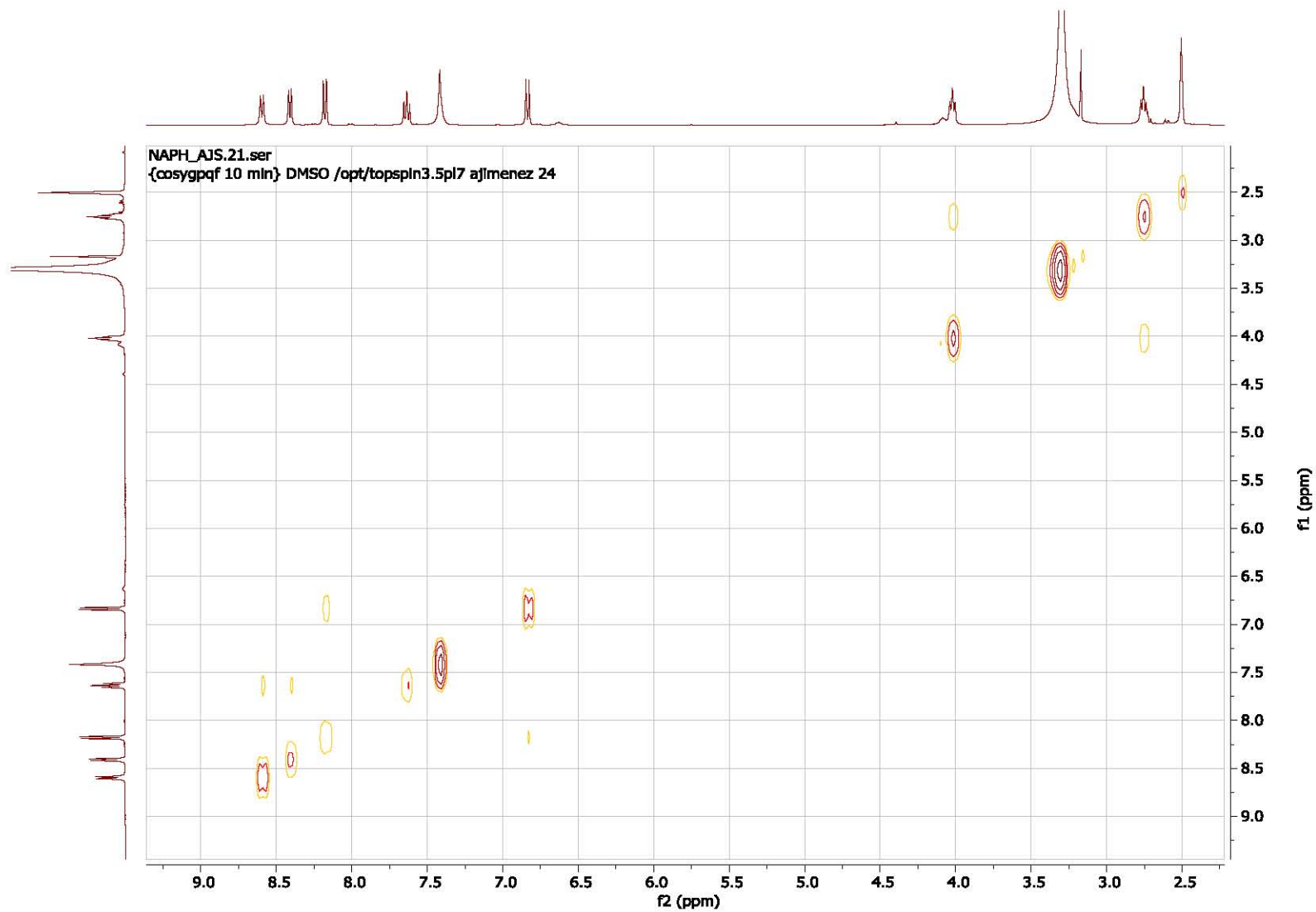
C_NAPH_AJS.10.fid



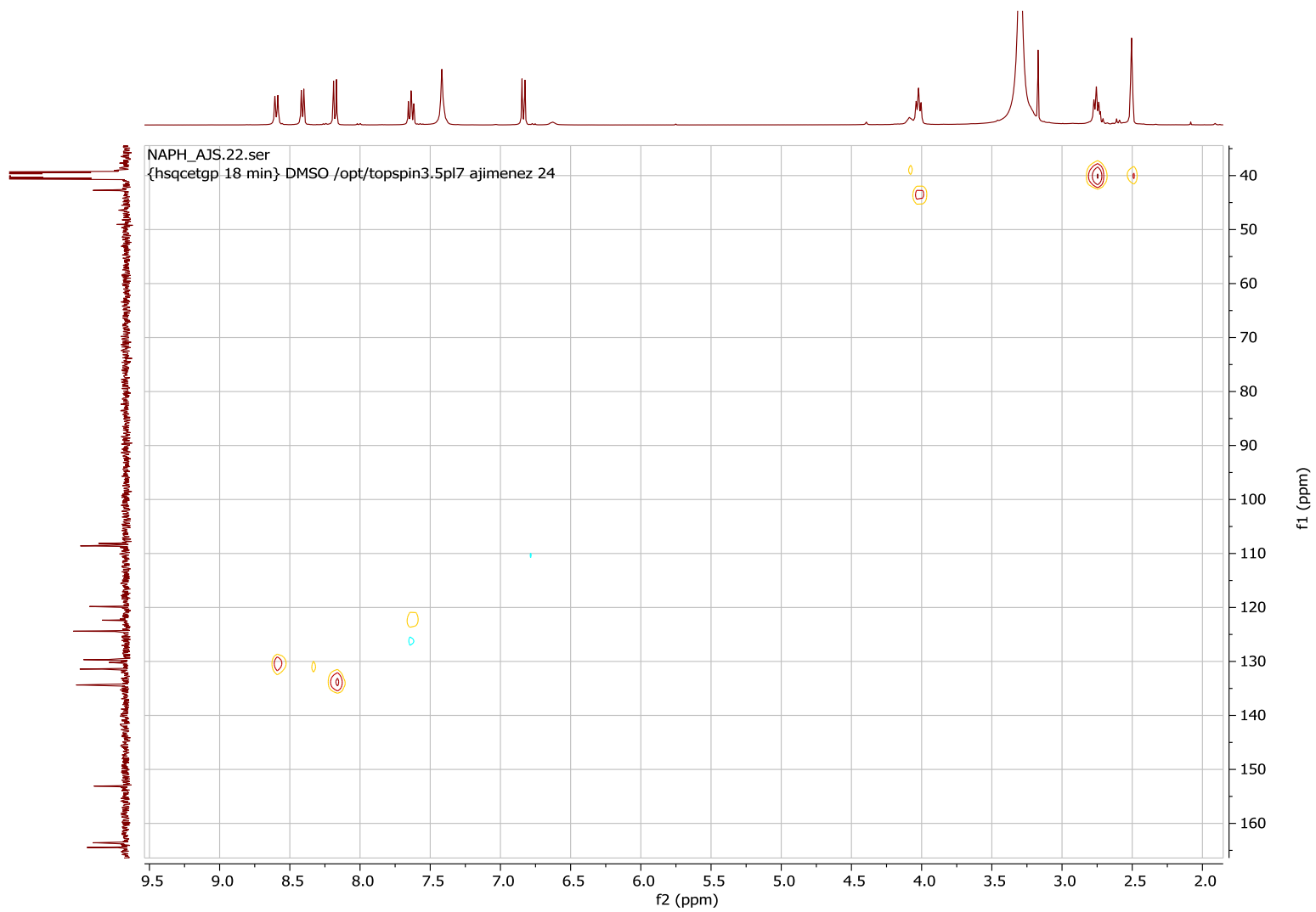
Espectro 4.2- Espectro ¹³C NMR de 6-amino-2-(2-aminoetil)-4H-benzoisoquinolina-1,3(2H)-diona (**Naph**) en DMSO- δ_6 , 400 MHz.



Espectro 4.3- Espectro IR de 6-amino-2-(2-aminoetil)-4H-benzoisoquinolina-1,3(2H)-diona (**Naph**) en KBr.



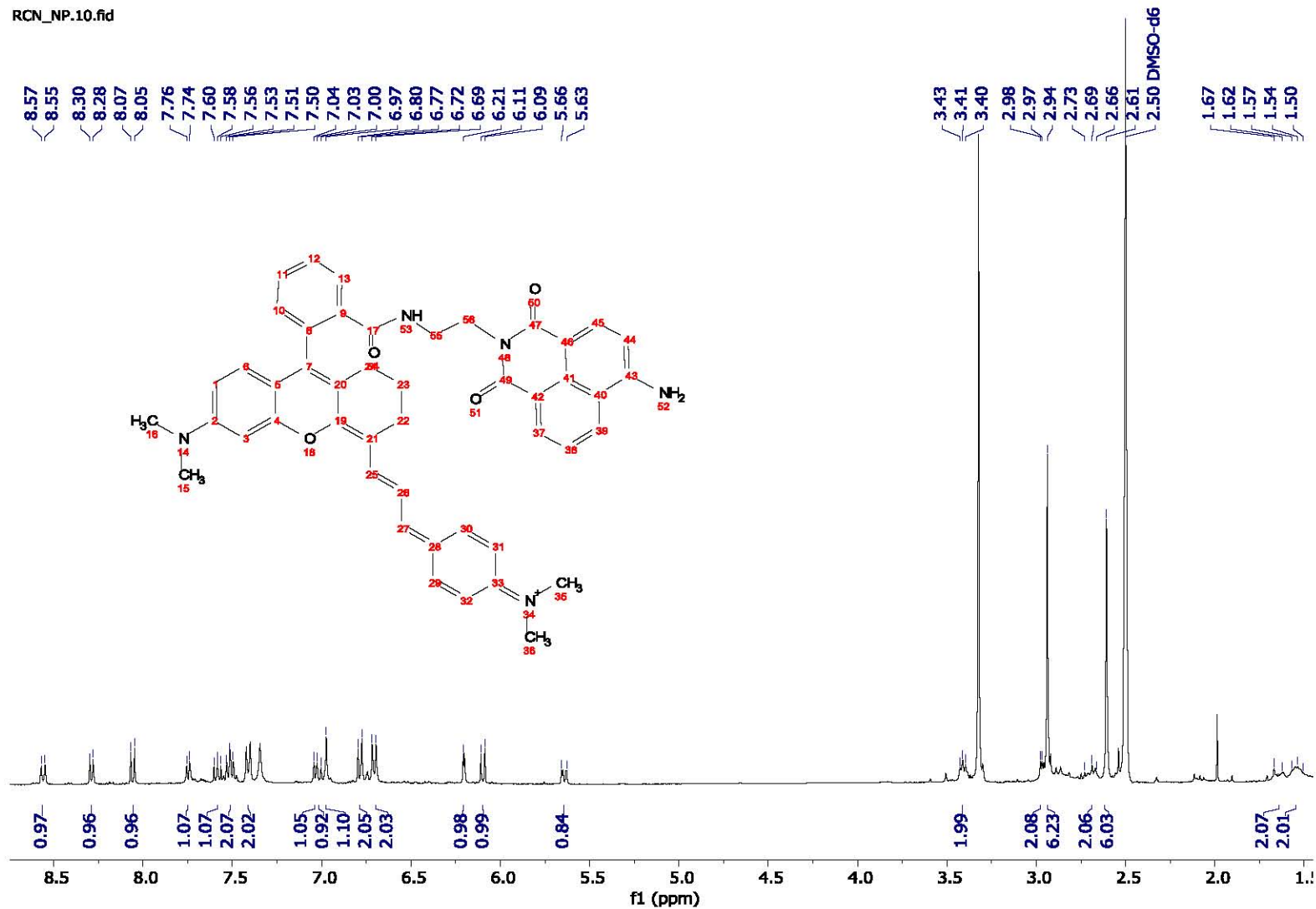
Espectro 4.4- Espectro COSY de 6-amino-2-(2-aminoetil)-4H-benzisoquinolina-1,3(2H)-diona (**Naph**) en DMSO- δ_6 , 400 MHz.



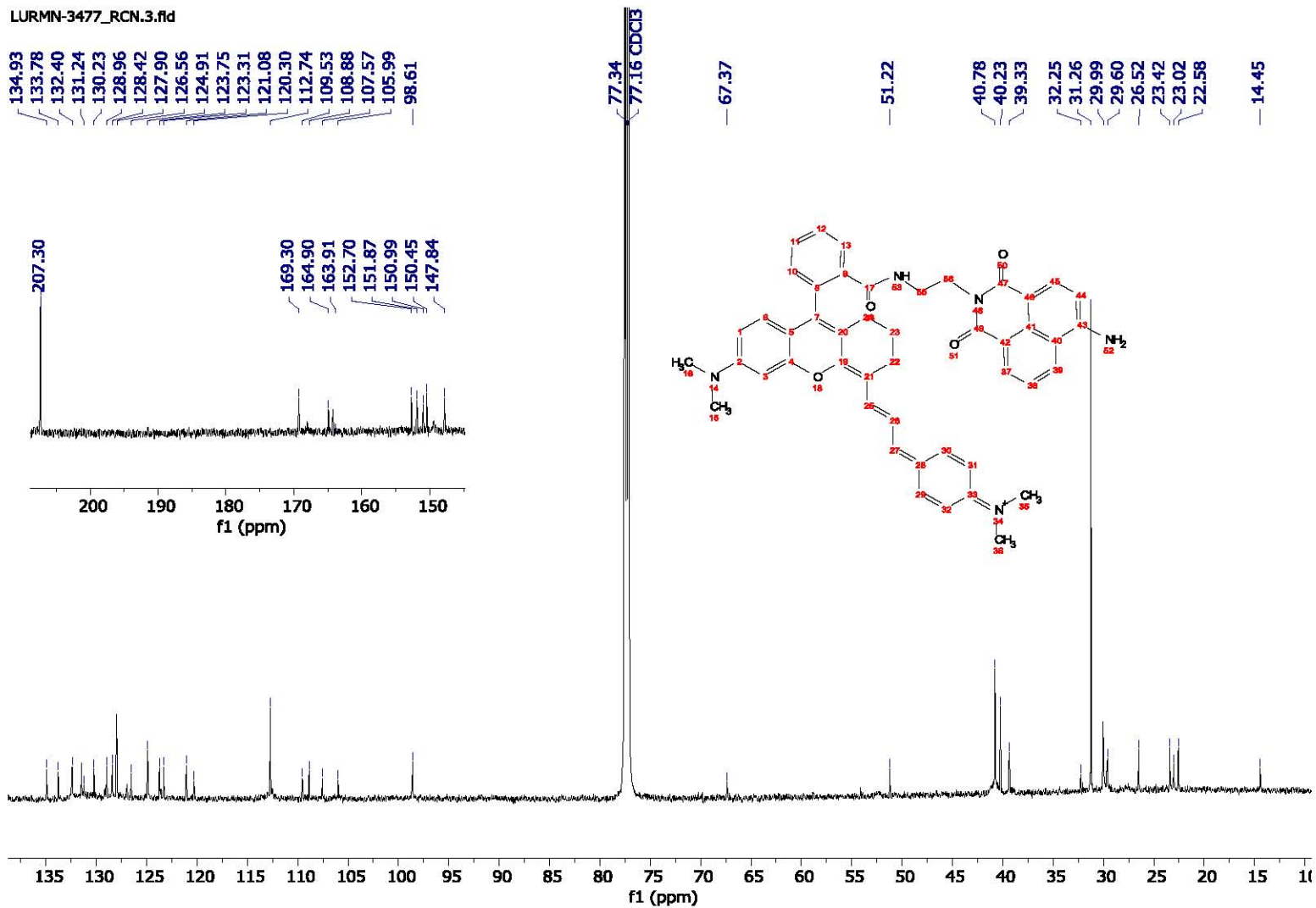
Espectro 4.5- Espectro HSQC de 6-amino-2-(2-aminoetil)-4H-benzoisoquinolina-1,3(2H)-diona (**Naph**) en DMSO- δ_6 , 400 MHz.

Caracterización de RCN

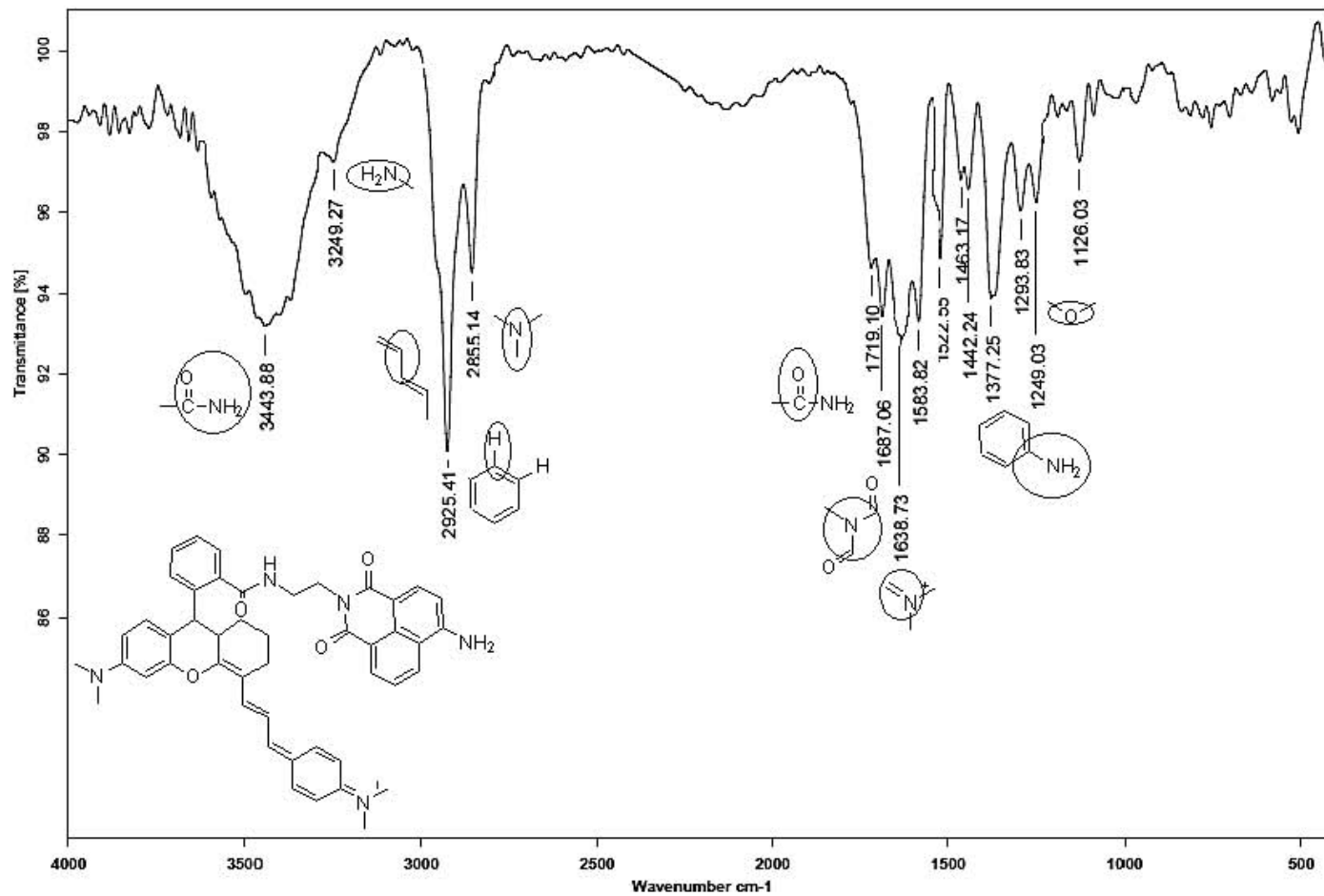
RCN_NP.10.fid



Espectro 5.1- Espectro ¹H NMR (RCN) en DMSO-δ₆, 400 MHz.



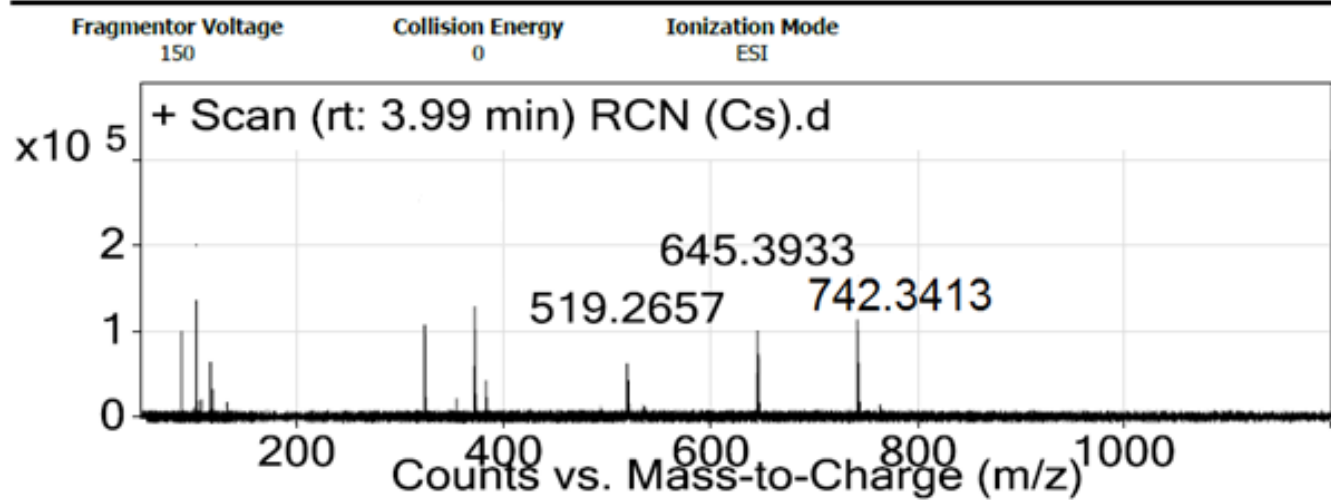
Espectro 5.2- Espectro ^1H NMR (RCN) en $\text{CDCl}_3\text{-}\delta_6$, 700 MHz.



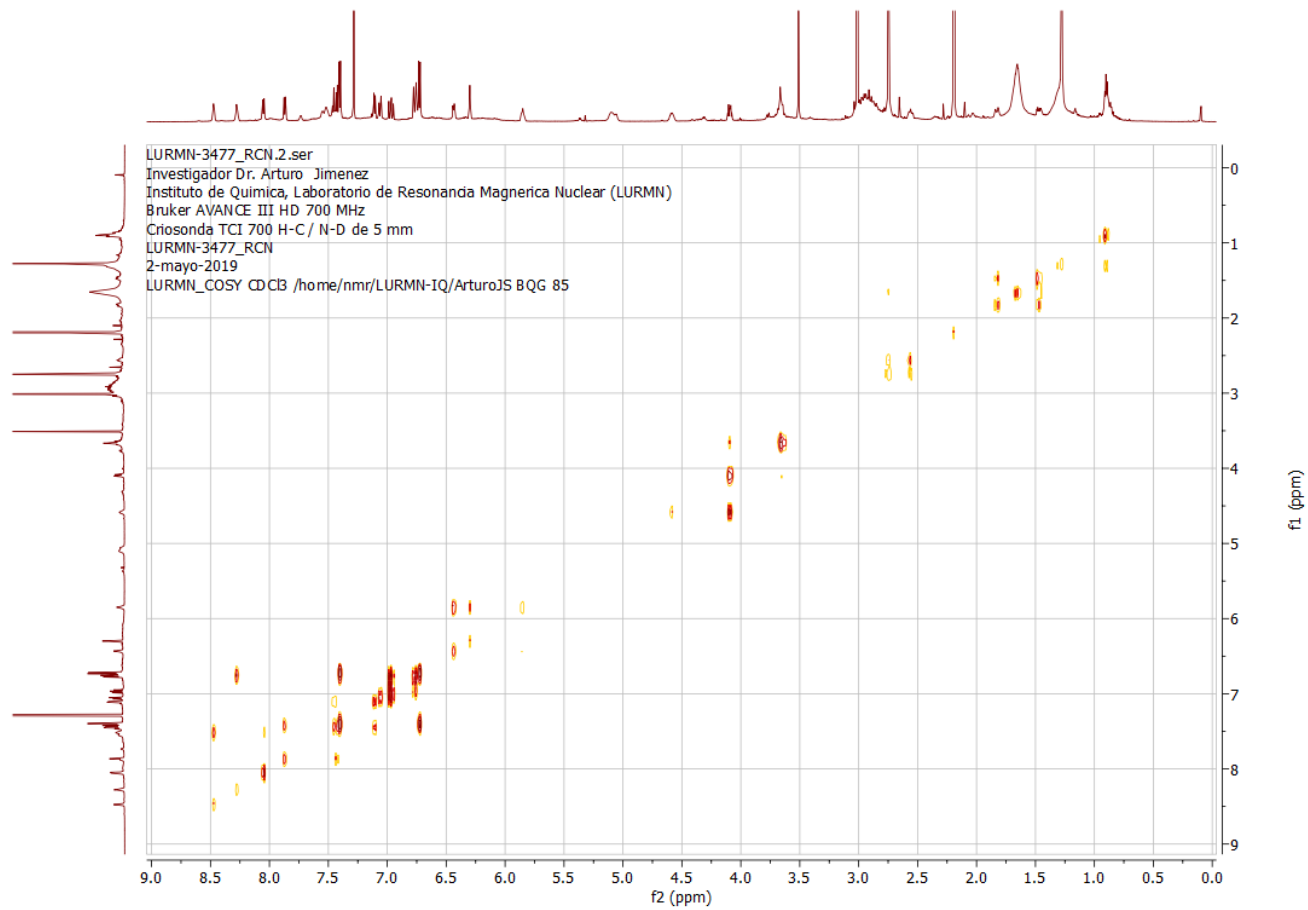
RCN_Cs KBr/Pastilla

Espectro 5.3- Espectro IR de (RCN) en KBr.

User Spectra

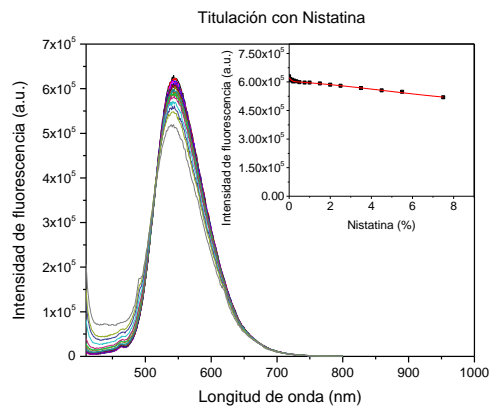


Espectro 5.4- Espectro de masas obtenido por ESI+ de **(RCN)** en KBr.

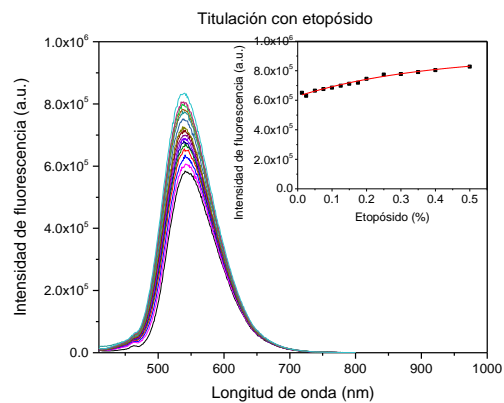


Espectro 5.5- Espectro COSY (RCN) en DMSO- δ_6 , 700 MHz.

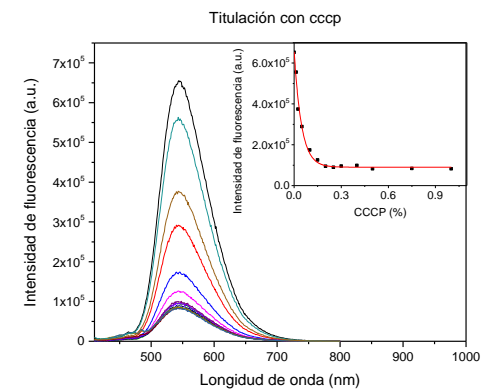
Anexo 2



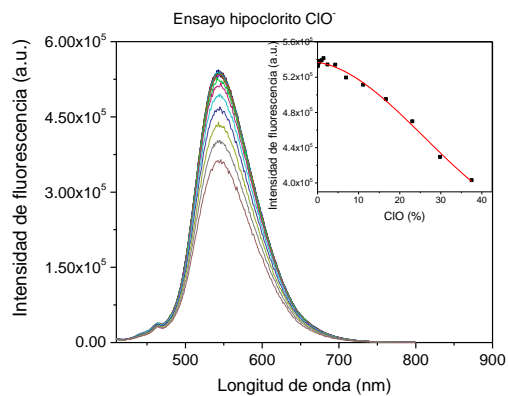
Gráfica 1.- Titulación de **RCN** con nistatina



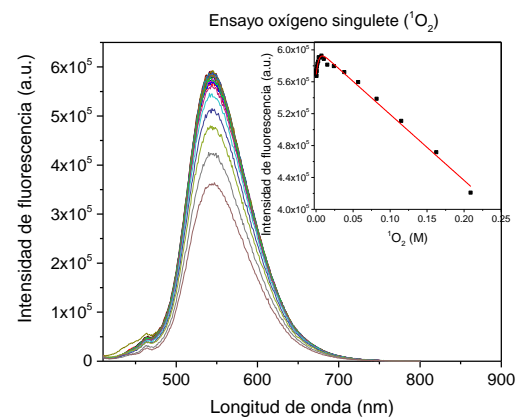
Gráfica 2.- Titulación de **RCN** con etopósido



Gráfica 3.- Titulación de **RCN** con cccp



Gráfica 4.- Titulación de **RCN** con hipoclorito



Gráfica 5.- Titulación de **RCN** con oxígeno singlete