



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Desarrollo de Sondas Fluorescentes con Solvatocromismo para Microscopia de Imagen”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. DANIELA CONPCECIÓN CEBALLOS ÁVILA

**Tutor Principal:
DR. ARTURO JIMÉNEZ SÁNCHEZ, INTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2024



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“Desarrollo de Sondas Fluorescentes con
Solvatocromismo para Microscopia de Imagen”**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.F.B. DANIELA CONCEPCIÓN CEBALLOS ÁVILA

TUTOR

DR. ARTURO JÍMENEZ SÁNCHEZ

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM



Ciudad de México, ENERO, 2024

El siguiente trabajo fue realizado en el laboratorio 5-C del Departamento de Química Orgánica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Arturo Jiménez Sánchez, con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) CVU 1177452. Con el financiamiento del Fondo CONAHCYT Ciencia de Fronteras No. 319214 y el programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IA200522)

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	7
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	10
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	14
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES	15
1.1 PROCESOS DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN DE LUZ	15
1.1.1 Procesos fotofísicos en compuestos orgánicos	15
1.1.2 Transiciones electrónicas	15
1.1.3 Fluorescencia	16
1.2 SOLVATOCROMISMO	19
1.2.1 Efecto de la polaridad del medio	19
1.2.2 Solvatocromismo positivo	19
1.2.3 Solvatocromismo negativo	21
1.3 SONDAS FLUORESCENTES DE MARCAJE SUBCELULAR	23
1.3.1 Sondas fluorescente	23
1.3.2 Aplicaciones de sondas fluorescentes	24
1.4 MICROSCOPIA DE IMAGEN.....	27
1.4.1 Introducción a la microscopía	29
1.4.2 Aplicaciones en microscopia de fluorescencia	29
1.5 SONDAS MITOCONDRIALES NERNSTIANAS.....	30
CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS	34

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GENERAL	35
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	35
CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA	37
4.1 METODOLOGÍA SÍNTETICA	37
4.1.1 Síntesis de yoduro-1,1,2,3-tetrametil-1 <i>H</i> -benzo[<i>e</i>]indol	37
4.1.2 Síntesis de 2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-acetilo (2)	38
4.1.3 síntesis de 7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-8-carbaldehído (3)	39
4.1.4 Síntesis de 3-nitro-4-hidroxibenzaldehído (4)	40
4.1.5 Síntesis de AztecNernst-1	40
4.1.6 Síntesis de AztecNernst-2	41
4.1.7 Síntesis de AztecNernst-3	42
4.1.8 Síntesis de AztecNernst-P	42
4.1.9 Síntesis de AztecNernst- ψ	43
4.2 EXPERIMENTOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	44
4.2.1 Evaluación de las propiedades solvatocrómicas	44
4.2.2 Determinación de pK_a	45
4.2.3 Evaluación de la capacidad de formar agregados.....	46
4.2.4 Evaluación de la respuesta a microviscosidad local	46
4.3 CULTIVO CELULAR Y MICROSCOPIA DE IMAGEN	46
CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
5.1 DISEÑO DE LAS SONDAS FLUORESCENTES.....	48
5.2 SÍNTESIS DE LA FAMILIA AZTECNERNST	51

5.3 CARACTERIZACIÓN	53
5.3.1 Caracterización de yoduro-1,1,2,3-tetrametil-1 <i>H</i> -benzo[<i>e</i>]indol	53
5.3.2 Caracterización de 2-oxo-2 <i>H</i> -cromen-7-acetilo (2)	57
5.3.3 Caracterización de 7-hidroxi-2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-8-carbaldehído (3)	58
5.3.5 Caracterización de AztecNernst-1	60
5.3.6 Caracterización de AztecNernst-2	62
5.3.7 Caracterización de AztecNernst-3	65
5.3.8 Caracterización de AztecNernst-P	68
5.3.9 Caracterización de AztecNernst- ψ	71
5.4 CARACTERIZACIÓN FOTOFÍSICA	74
5.4.1 Solvatocromismo	74
5.4.2 Determinación de pK_a	79
5.4.3 Formación de agregados	81
5.4.4 Microviscosidad local	85
5.4.5 Microscopía de imagen	87
CONCLUSIONES	97
REFERENCIAS	99
ANEXOS	103

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme la vida, salud y determinación para cumplir mis metas.

Al CONAHCYT por haberme otorgado el apoyo económico que me permitió culminar mis estudios de maestría, CUV1177452.

Al Instituto de Química de la UNAM, por brindarle las herramientas necesarias a sus alumnos para que realicen sus estudios de posgrado y formar investigadores de calidad.

Al Dr. Arturo Jiménez Sánchez por haberme aceptado en su grupo de trabajo y haberme brindado las herramientas necesarias para terminar mi maestría de una forma satisfactoria. Agradezco su invaluable aporte en el desarrollo de este proceso y sus consejos para la escritura de este manuscrito, así como permitirme seguir siendo parte de su grupo en mi etapa de doctorado.

A los miembros de mi jurado, Dra Rosa Luisa Santillán, Dra Martha Verónica Escárcega, Dr Marcos Hernández, Dr Jesús Rodríguez y al Dr Jorge Peón. Gracias por formar parte de este proceso académico y sus invaluable aportaciones a este manuscrito.

A la Maestra Josefina Tenopala, por siempre resolver cualquier duda que presenté durante mi maestría, por su atención y el apoyo brindado en los trámites de titulación.

A mi padre, César L. Ceballos Ríos, por haberme inculcado el amor por la ciencia desde que era una niña, por su apoyo y guía a lo largo de mi vida. Gracias por haberme ayudado a encontrar mi pasión. A mi madre, Pascuala Ávila Rodríguez, por ser un rayo de luz en mi vida. Gracias por todo el amor que me ha dado siempre, por buscar lo mejor para mí y mis hermanos, gracias por su ejemplo de mujer fuerte y trabajadora, gracias por apoyarme a lograr cada uno de mis sueños. Mis logros son los suyos. Los amo inmensamente.

A mi hermana, Jessica A. Ceballos Ávila, mi otra mitad, tu existencia me motiva a dar lo mejor de mí, siempre seremos tú y yo contra los demonios,

AGRADECIMIENTOS

A L. Gilberto Meza Rodríguez, por su invaluable apoyo en mi trayecto de maestría, su paciencia y amor. Gracias por formar parte de esta etapa de mi vida, por ayudarme a no rendirme cuando sentía que no podía más, por las risas en los momentos de estrés, gracias, amor mío.

Al Dr. Javier Ordóñez, por ser el mejor asesor técnico y amigo. Gracias por introducirme al maravilloso mundo de la síntesis orgánica, y por compartir conmigo tus conocimientos, así como haberme inculcado la dignificación de mi trabajo. Gracias por haber creído en mí cuando más lo necesité, y por enseñarme que soy capaz de todo lo que me proponga. Agradezco los momentos de risas y los días de hasta 14 horas de trabajo en el laboratorio, ahora sé que quién te siga jamás tendrá sed.

A Ixsoyen Vázquez, por ser mi hermano de maestría. Porque compartimos juntos el estrés de la maestría, las clases, los días largos en laboratorio y todos los trámites. Tú presencia en el grupo nos une a todos.

A Juan Luis Cortés, Erika Millán, Fernanda Ferrusca, Emiliano Meneses, Jesús Santillán, Gustavo Carmona, Óscar Anguiano y Santiago García, gracias por su ayuda dentro del laboratorio, así como su compañía, hicieron el trabajo más ameno con su presencia.

*Dedicada a mis padres,
Mis logros son por y para ustedes.*

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

a.u → Unidades arbitrarias

CCCP → carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona

CDCl₃ → Cloroformo deuterado

d → Doblete

DAPI → 4,6-diamidino-2-fenilindol

DART → Análisis directo en tiempo real

DCM → Diclorometano

DMEM → Medio Eagle modificado de Dulbecco

DMSO → Dimetilsulfóxido

DMSO-d₆ → Dimetilsulfóxido deuterado

ϵ Constante dieléctrica

H₂O → Agua

HOMO → Orbital molecular ocupado de mayor energía

η → Microviscosidad

i.c → Conversión Interna

i.s.c → Cruce Intersistemas

λ → Longitud de onda

λ_{em} → Longitud de onda de emisión λ_{ex} → Longitud de onda de excitación

LUMO → Orbital molecular no ocupado de más baja energía

μ l → Microlitro

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

μM → Micromolar

m → Multiplete

m/z → Relación masa-carga

MeOH → Metanol

MHz → Megahertz

ml → Mililitro

mmol → Milimol

nm → Nanómetro

IR → Infrarrojo

PVF → Proteína verde fluorescente

pK_a Constante de acidez

RMN → Resonancia magnética nuclear

δ → Desplazamiento químico

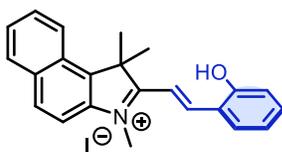
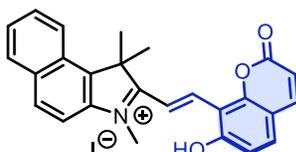
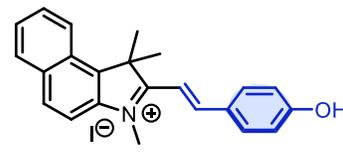
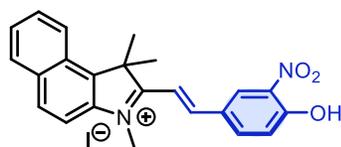
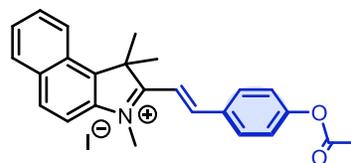
s → Segundo/Singulete

t → Triplete

UV-Vis → Ultravioleta-visible

RESUMEN

En la actualidad existe un gran interés en el desarrollo de sondas selectivas y eficientes para el monitoreo de distintos parámetros en ambientes biológicos, debido a su alta sensibilidad, poca citotoxicidad y compatibilidad con ensayos *in vivo*, además de que su obtención resulta más sencilla que el desarrollo de otros compuestos que se utilizan para los mismos fines, por ejemplo, los anticuerpos acoplados a fluoróforos. Si bien en la actualidad existen diversas sondas comerciales para el estudio de distintos organelos, aún queda un largo camino que recorrer para mejorar la respuesta de estas y obtener resultados que brinden más información sobre el funcionamiento celular. En el presente trabajo, se presenta el diseño y síntesis de una nueva familia de sondas fluorescentes para mitocondria, denominada AztecNernst. Las bases fisicoquímicas detrás del diseño se basan en el proceso ampliamente conocido como mecanismo de gradiente electroquímico dado por la ecuación de Nernst (sondas Nernstianas), así como retención mitocondrial por la hidrólisis de ésteres presentes en algunas sondas Nernstianas, las cuales al perder su carga formal positiva dejan de interactuar con el potencial de membrana mitocondrial. Además, se propone un nuevo diseño para optimizar el marcaje mitocondrial, basado en el coeficiente de reparto de Nernst. Se describen la caracterización fotofísica de las sondas sintetizadas, así como la metodología para obtenerlas. Los resultados obtenidos muestran que AztecNernst-P marca mitocondria, forma agregados y presenta un espectro de emisión típico de la formación de excímeros, además presenta solvatocromismo negativo, lo cual es un parámetro que permite la evaluación de la polaridad de las membranas subcelulares. AztecNernst-2, también marca mitocondria y presenta solvatocromismo negativo. AztecNernst-3 marca mitocondria y responde a la viscosidad en un rango de 1-954 cP, propiedad que puede explotarse para estudiar la microviscosidad local o la tensión de membrana de la mitocondria.

Sondas moleculares fluorescentes sintetizadas en el presente trabajo**AztecNernst-1****AztecNernst-2****AztecNernst-3****AztecNernst-P****AztecNernst-Ψ**

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la fluorescencia sucedió a principios del siglo XIX. En 1852, Sir George Gabriel Stokes acuñó el término de “fluorescencia” para describir el fenómeno que Fredrick Herschel había observado en 1845 en una disolución acuosa de quinina (1)(2).

Otros físicos que contribuyeron a dicho campo emergente fueron Edmond Becquerel y Eilhart Wiedemann. En 1868, ya se había definido que las propiedades fluorescentes eran características de sustancias específicas. De hecho, en aquella época se realizaba caracterización de compuestos químicos orgánicos mediante el análisis de sus propiedades de fluorescencia. A finales del siglo XIX los investigadores identificaron y sintetizaron una gran variedad de tintes fluorescentes. En esta época, ya se utilizaban para teñir células y bacterias, siendo observadas mediante microscopios ópticos convencionales. No obstante, fue hasta la década de 1940 cuando los microscopios de fluorescencia más sofisticados surgieron y permitieron los primeros análisis de muestras biológicas teñidas con fluoróforos (2).

Hoy en día las sondas fluorescentes desempeñan un papel cada vez más importante en diversas áreas de la investigación científica, ya que permiten la detección y obtención de imágenes de moléculas de importancia biológica con alta selectividad y poca invasión. Actualmente el desarrollo de sondas con propiedades optimizadas es necesario para poder monitorear en tiempo real las moléculas y estructuras subcelulares en ensayos *in vitro* e *in vivo*, lo que conlleva a un mejor entendimiento de los procesos celulares (3).

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES

1.1 PROCESOS DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN DE LUZ

1.1.1 Procesos fotofísicos en compuestos orgánicos

La materia interactúa con la luz de diversas maneras, algunos compuestos tienen la capacidad de absorber este tipo de energía y emitirla. La absorción genera que la molécula pase de un estado electrónico basal a uno de mayor energía, denominado estado excitado, la emisión desde este nivel energético se conoce como luminiscencia(1). Dependiendo de la fuente que se utilice para llevar a cabo la excitación es la subclasificación que recibe, la fotoluminiscencia se refiere a la emisión producida por la excitación con fotones en el rango del espectro electromagnético UV-Vis (4) y se divide formalmente en 3 categorías: fluorescencia, fosforescencia y fluorescencia tardía (1).

Los procesos que explican la interacción entre la luz y la materia sin que ésta última se modifique químicamente se denominan fotofísicos, ya que no se genera cambio químico alguno (5). Una forma gráfica de explicarlos es el diagrama de Jablonski (imagen 1.2), en el cual se ilustran los niveles electrónicos en términos de energía, las transiciones y los cambios fotofísicos que ocurren desde que una molécula absorbe luz hasta que la emite para volver a su estado basal (6).

1.1.2 Transiciones electrónicas

En las moléculas los electrones se encuentran distribuidos en distintos niveles energéticos conocidos como orbitales moleculares. Normalmente los electrones van a ocupar los niveles de energía más bajos, cuando esto sucede se dice que la molécula está en su estado basal. Sin embargo, cuando absorbe energía sus electrones pueden ser promovidos a orbitales de mayor energía; a este fenómeno se le denomina transición

electrónica (6). Los electrones que se encuentran en la capa de valencia pueden presentar transiciones impulsadas por la absorción de fotones en el rango del espectro UV-Vis, ya que se encuentran más débilmente atraídos por el núcleo. Los orbitales implicados en estas transiciones son: σ , π , n , π^* y σ^* . En la espectroscopía de absorción y de fluorescencia las transiciones más importantes son las que implican la promoción de un electrón desde el último orbital ocupado (HOMO) hasta el primer orbital desocupado (LUMO) y que sucede comúnmente en el rango de UV-Vis (7)

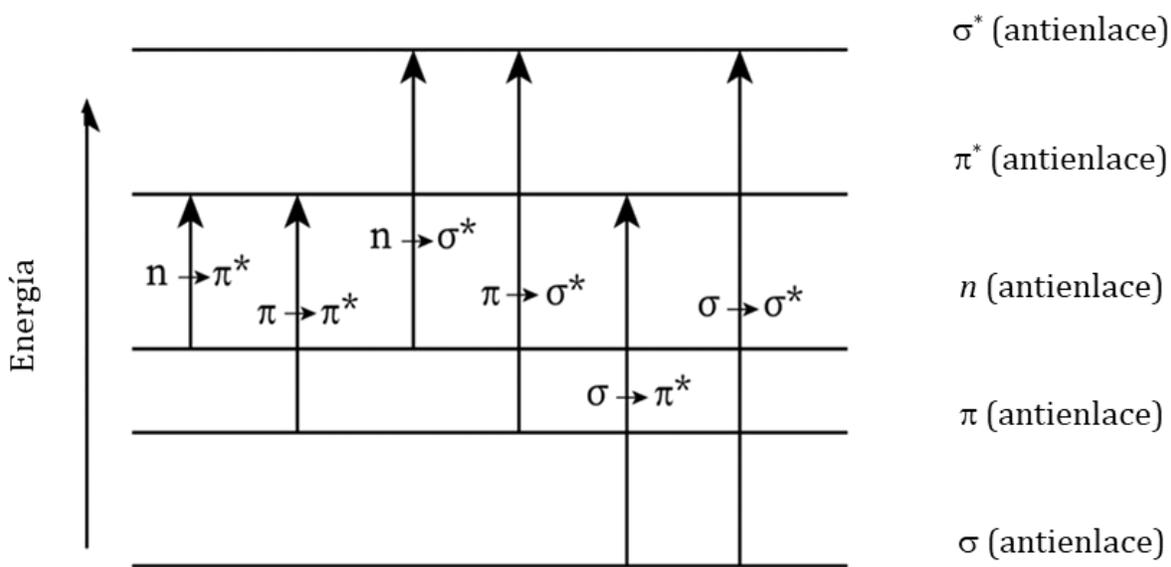


Imagen 1.1 Diagrama de energía de las transiciones electrónicas observadas comúnmente en compuestos orgánicos.

1.1.3 Fluorescencia

Una molécula no puede permanecer en su estado excitado durante mucho tiempo (8). Uno de los mecanismos que utiliza para regresar a su estado basal es la emisión de energía en forma de fotones desde un estado excitado con cierta multiplicidad de spin, si durante el decaimiento del estado excitado dicha multiplicidad se mantiene constante (p. ej. singulete: S_1 a S_0 , o triplete: T_1 a T_0), a este proceso se le conoce como fluorescencia (1). Las moléculas que presentan este fenómeno se denominan fluoróforos.

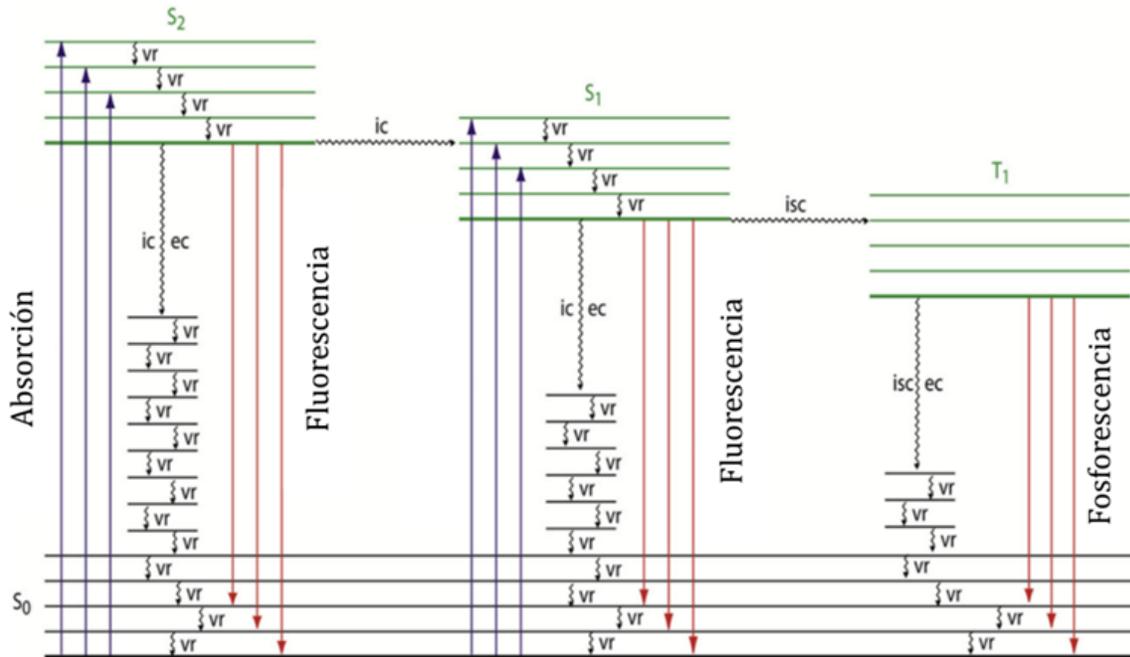


Imagen 1.2 El diagrama de Jablonski es una representación gráfica utilizado para ilustrar los niveles de energía electrónica y las transiciones que ocurren durante la absorción y emisión de luz por una molécula. Es un marco visual clave para comprender los fenómenos como la fluorescencia, la fosforescencia, la relajación vibracional no-radiativa (vr), el cruce intersistemas (isc), conversión interna (ic) y externa (ec). Tomado de (Kafle, 2020).

La absorción de luz se lleva a cabo en un periodo de tiempo tan corto, 10^{-15} s, que no es suficiente para que existan cambios en las coordenadas nucleares, solo en las electrónicas, este fenómeno es descrito por el principio de Franck-Condon (9) En el diagrama de Jablonski la absorción se representa con una línea recta que va desde el estado singlete basal hasta el estado singlete excitado, ya sea S_1 o S_2 . Las líneas gruesas muestran los estados electrónicos, mientras que las delgadas representa los niveles vibrónicos. Cuando se produce la absorción el fluoróforo puede ser excitado hasta cualquier nivel vibrónico de S_1 o S_2 . Posteriormente sucede una conversión interna (IC), en la cual una molécula excitada pasa a un estado de menor energía vibrónica dentro del mismo estado electrónico excitado, este proceso se conoce como relajación no radiativa ya que se produce sin la emisión de fotones. La IC es una de las razones por las cuales el número de fotones emitidos en fluorescencia siempre es menor al de los

absorbidos. La fluorescencia siempre va a suceder desde el nivel vibrónico más bajo de energía (S_1), este es un principio fotofísico conocido como la regla de Kasha, y se explica por el hecho de que la IC se lleva a cabo en un rango de tiempo de 10^{-12} S, mientras que la emisión se produce en un periodo de tiempo de 10^{-10} S aproximadamente (9). Cuando una molécula se encuentra en su estado excitado S_1 de menor energía existe la posibilidad de que en lugar de emitir la energía sufra un proceso llamado cruce intersistema (ISC), el cual implica un cambio en la multiplicidad de espín pasando de un estado excitado singulete a un triplete. En la imagen 1.3 se muestran las multiplicidades de espín que pueden presentar los estados excitados. La emisión desde T_1 hasta S_0 se llama fosforescencia, es un proceso más lento que la fluorescencia, con un tiempo de vida de milisegundo hasta segundos, debido a que la emisión $T_1 \rightarrow S_0$ está prohibida por espín. Por otro lado, en la fluorescencia tardía, la molécula en el estado excitado S_1 también sufre un (ISC) para pasar al estado T_1 , pero a diferencia de la fosforescencia, regresa a S_1 antes de emitir fotones mediante un cruce intersistema reverso (rISC). Este proceso provoca que la fluorescencia se vea “retardada”, pero debido a que la emisión que sucede no es una transición prohibida por espín, se da en un orden de tiempo más corto que la fosforescencia (10).

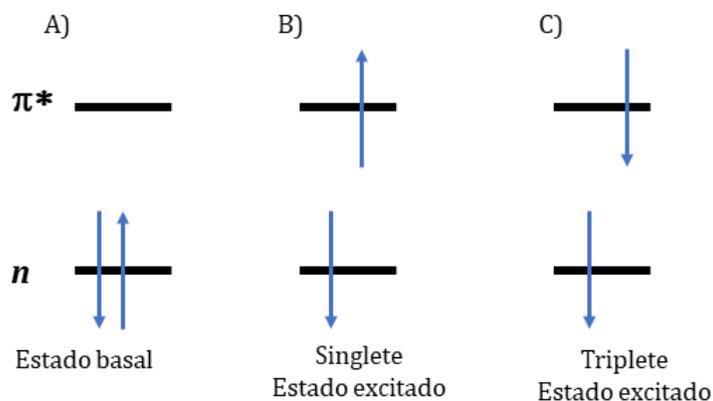


Imagen 1.3 Multiplicidad de Configuraciones electrónicas para (A) un estado fundamental singulete; (B) un estado excitado singulete; y (C) un estado excitado triplete. Tomado de (8).

1.2 SOLVATOCROMISMO

1.2.1 Efecto de la polaridad del medio

La polaridad del disolvente y el ambiente local afectan directamente las propiedades del espectro de absorción y emisión de un fluoróforo, este fenómeno se conoce como solvatocromismo (11). La interacción entre las moléculas de disolvente y el fluoróforo son una de las causas principales por las que la emisión sucede a longitudes de ondas mayores que la absorción, ya que influye en el fenómeno conocido como relajación por efecto de disolvente. La diferencia que existe entre la absorción y emisión es llamada desplazamiento de Stokes. Los efectos del disolvente y el ambiente sobre el espectro de fluorescencia son complejos, ya que intervienen más factores además de la constante dieléctrica, por lo que los cambios generados en un espectro de emisión no se pueden atribuir a un solo factor, sino al resultado de las diversas interacciones presentes, como son: 1) polaridad y viscosidad del disolvente, 2) velocidad de relajación del disolvente, 3) cambios conformacionales, 4) rigidez del entorno local, 5) transferencia interna de carga, 6) transferencia de protones y reacciones llevadas a cabo en el estado excitado, 7) interacciones fluoróforo-fluoróforo y 8) cambios en las velocidades de desactivación radiativa y no radiativa (9).

1.2.2 Solvatocromismo positivo

Los compuestos se denominan solvatocrómicos cuando existe un desplazamiento en sus espectros de absorción y emisión, dependiente de la polaridad del disolvente. Un desplazamiento hacia longitudes de onda más largas se denomina batocrómico, mientras que uno a longitudes más cortas se conoce como hipsocrómico. Este fenómeno sucede porque las moléculas del disolvente tienen la capacidad de reordenarse alrededor del fluoróforo, lo que se conoce como capa de solvatación, tanto en el estado excitado como en el basal, y así estabilizarlo o desestabilizarlo (12).

El solvatocromismo positivo se refiere al desplazamiento batocrómico en el espectro de emisión de un fluoróforo que se presenta al aumentar la polaridad del disolvente en el

cual se encuentra (13). Los fluoróforos que presentan solvatocromismo positivo poseen un momento dipolar mayor en el estado excitado que en el estado basal $\mu_e > \mu_b$. Después de la absorción las moléculas del disolvente pueden reordenarse alrededor del momento dipolar del estado excitado. Mientras más grande sea la polaridad del disolvente, mejor podrá estabilizarlo, lo que disminuirá su energía observándose una emisión a longitudes de onda mayores. Este efecto es más notorio mientras mayor sea el momento dipolar del estado excitado (9). El solvatocromismo es más marcado en el espectro de fluorescencia que en el espectro de absorción, debido a que la absorción ocurre en un periodo de tiempo demasiado corto, por lo que las moléculas de disolvente no pueden reacomodarse alrededor del fluoróforo para estabilizarlo. Es decir, la absorción sucede desde el estado de Franck-Condon (estado localmente excitado, inmediato a la absorción). Por el contrario, cuando sucede la emisión ya transcurrió el tiempo necesario para que las moléculas de disolvente se encuentren orientadas alrededor del estado excitado del fluoróforo, disminuyendo así su energía. Y aumentando la energía del estado basal, ya que las moléculas polares no logran estabilizarlo (9,14).

La mayoría de los fluoróforos que presentan solvatocromismo positivo tienen en su estructura un grupo donador de electrones y un grupo aceptor. Esto permite el desplazamiento de carga desde los grupos donadores a los aceptores, lo que genera que en el estado excitado el momento dipolar sea mayor que en el estado basal. De esta manera mientras más polar sea el disolvente más estabiliza al estado excitado. Este proceso es conocido como relajación por efecto de disolvente (13).

La relajación por el disolvente no sucede en el mismo periodo de tiempo para todos los disolventes, es un proceso que depende de la viscosidad del medio. Si el tiempo requerido para la reorganización de las moléculas de disolvente alrededor del soluto es corta con respecto al tiempo de vida del estado excitado, la emisión no ocurrirá desde el estado Frank-Condon, sino desde las moléculas del soluto en equilibrio con su capa de solvatación, es decir, el estado S_1 relajado por el disolvente. En cambio, si el medio es muy viscoso para permitir la reorganización molecular, entonces sucederá primero la emisión antes que la relajación, lo cual genera que el espectro de fluorescencia se

parezca al del estado de Frank-Condon, y se vería similar a un espectro de emisión en un medio no polar. Para que un fluoróforo pueda funcionar como sonda de polaridad es necesario que el proceso de relajación se lleve a cabo completamente antes de que suceda la emisión, de lo contrario habrá una mal interpretación sobre la polaridad del medio (12).

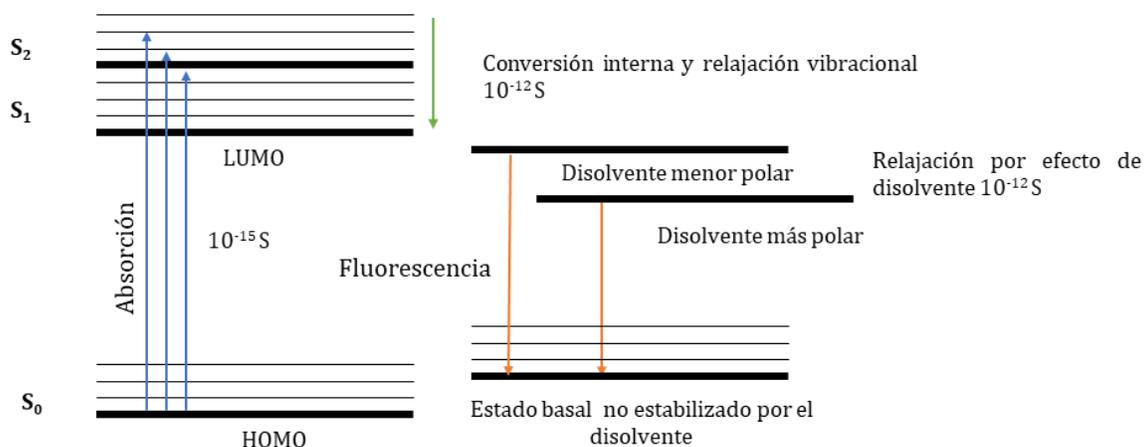


Imagen 1.4 Explicación gráfica de la estabilización del fluoróforo en el estado excitado por efecto del disolvente. Se ejemplifican los tiempos promedio en segundos para un fluoróforo.

1.2.3 Solvatocromismo negativo

El solvatocromismo negativo se refiere al fenómeno donde la absorción y emisión de luz de una sustancia sufre un desplazamiento hipsocrómico a medida que se disuelve en medios con elevada polaridad (15). Los compuestos que presentan esta propiedad se caracterizan por encontrarse en una forma zwitteriónica en el estado basal(16). Poseen una estructura molecular que les permite sufrir una transferencia de carga fotoinducida. Esta estructura consta de un átomo donador, un puente y un átomo aceptor. Cuando sucede la excitación el átomo donador, que en el estado basal se encontraba con una carga parcial negativa, dona un par de electrones lo que genera una estructura de resonancia neutra. Esto provoca que el momento dipolar en el estado excitado disminuya. De esta manera, los disolventes polares solo estabilizan el estado basal, disminuyendo la energía del orbital HOMO, mientras que en el estado excitado no

existe estabilización por parte de las moléculas del disolvente, esto aumenta la brecha energética entre HOMO y LUMO, lo que se observa en el espectro como un desplazamiento hacia el azul (16). Las moléculas que presentan solvatochromismo negativo son de gran interés para la creación de sondas solvatocrómicas. Los pigmentos de Reinhardt son las mejores moléculas con solvatochromismo negativo y al presentar un desplazamiento de Stokes tan amplio son muy sensibles a los ligeros cambios en la polaridad de un medio, sin embargo, estas presentan la desventaja de no ser fluorescentes, por lo que no es factible su uso en el monitoreo de células. Por esta razón, hoy en día los esfuerzos se centran en el diseño y síntesis de una sonda fluorescente lo suficientemente sensible para permitir el monitoreo de los pequeños cambios de la micropolaridad del ambiente subcelular, ver Imagen 1.5.

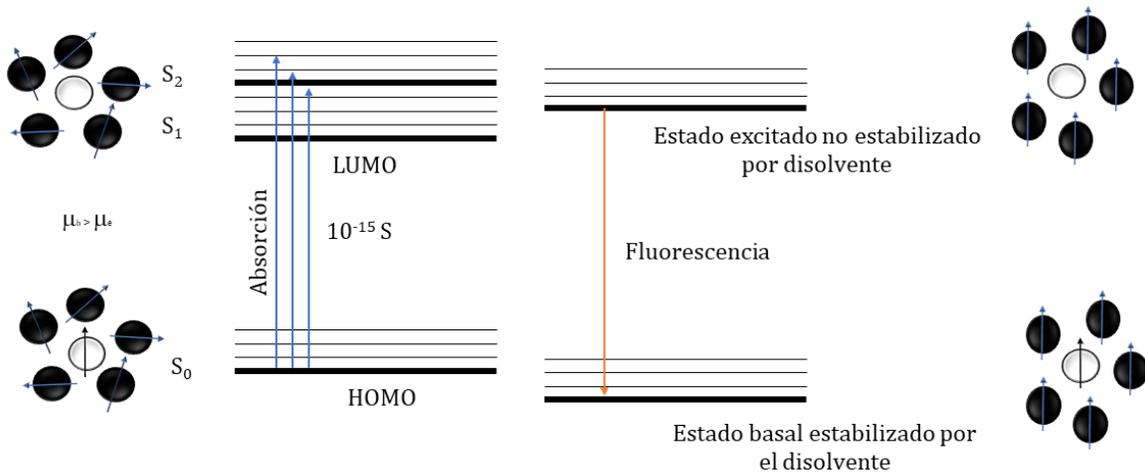


Imagen 1.5 Descripción gráfica de la estabilización por disolvente en el solvatochromismo negativo. El momento dipolar en el estado basal μ_b es mayor que el del estado excitado μ_e , lo que genera una mayor estabilización del estado basal por moléculas de disolvente polares.

1.3 SONDAS FLUORESCENTES DE MARCAJE SUBCELULAR

1.3.1 Sondas fluorescentes

A principios del siglo XX comenzó el uso de fluoróforos para teñir muestras biológicas y examinarlas bajo un microscopio. En este momento solo era posible la observación de

células no vivas. Hoy en día gracias a las sondas fluorescentes el estudio de la dinámica en células vivas tanto *in vitro* como *in vivo* ha avanzado. Obtener información sobre la función celular, la fisiopatología de muchas enfermedades y otros procesos celulares dinámicos es crucial para avanzar en los campos de la biología celular, diagnóstico clínico y el desarrollo de nuevas terapias.

Las sondas fluorescentes son moléculas diseñados para emitir luz cuando se encuentran en condiciones específicas. Están compuestas por un fluoróforo, componente que les proporciona las propiedades fluorescentes. La elección del fluoróforo depende de la longitud de onda a la que se desea emita la sonda y la fotoestabilidad que se requiere. Para que una sonda sea selectiva debe poseer un dominio que le permita interactuar únicamente con la molécula objetivo. El reconocimiento puede darse por una reacción química o interacciones no covalentes. La finalidad de una sonda es que solo emita luz en presencia de su objetivo. También pueden funcionar mediante otros mecanismos, por ejemplo, cambios en su espectro de emisión.

Los espectros de fluorescencia son muy sensibles al medio en el que se encuentran, por lo que las sondas fluorescentes no solo sirven para monitorear una sola molécula objetivo, sino que también pueden ser utilizados para censar el ambiente celular, tomando ventaja de que cada organelo celular posee un microambiente celular único, como son: macromoléculas, tipos y concentraciones de sales, temperatura, pH, viscosidad y polaridad (17). En los últimos 30 años se han desarrollado muchas sondas para monitorear el entorno subcelular, sin embargo, aún queda un largo camino que recorrer (18). Actualmente las estrategias están centradas en lograr una alta selectividad, explotando las propiedades fisicoquímicas de los fluoróforos para que se unan específicamente a péptidos, lípidos, y oligosacáridos objetivo (18). Sin embargo, desentrañar los procesos fisiológicos celulares mediante sondas fluorescentes es todo un desafío debido a la distribución desigual en los microambientes celulares, su alta citotoxicidad, baja especificidad y estabilidad (17).

1.3.2 Aplicaciones de sondas fluorescentes

El uso de sondas fluorescentes en la actualidad se centra en la obtención de bioimágenes que permitan monitorear procesos dinámicos celulares de importancia biológica y médica. Por ejemplo, el estudio de productos del metabolismo de lípidos en los distintos organelos celulares brinda información esencial para comprender la homeostasis energética y descifrar procesos metabólicos por los cuales una célula mantiene su integridad. Diversos estudios han sugerido que el estrés oxidativo en distintos organelos genera cambios en la micropolaridad del ambiente de estos, lo cuales pueden relacionarse con enfermedades como cáncer, obesidad y diabetes (19). Debido a que los cambios generados son muy ligeros y tomando en cuenta que el ambiente celular es un medio acuoso, las sondas fluorescentes con solvatocromismo positivo presentan desventajas, debido a que en agua su emisión disminuye drásticamente y no son capaces de cambiar su emisión significativamente ante ligeros cambios de polaridad (18). Con esto en mente, Kajiwara y colaboradores propusieron la síntesis de una sonda con solvatocromismo negativo para estudiar el microambiente de diversos organelos membranosos celulares. Esta sonda cambia sus características de absorción y emisión dependiendo de la micropolaridad del ambiente en el que se encuentra. Su solvatocromismo negativo les brinda una gran sensibilidad a los cambios en el entorno circundante y a diferencia de sus homólogas solvatofluorocrómicas positivas, su fluorescencia no disminuye en medios acuosos. Estas características la hacen óptima para monitorear las variaciones sutiles de polaridad producidas en las gotas lipídicas durante el metabolismo de lípidos (19).

El diseño de sondas fluorescentes es un proceso complejo que requiere una cuidadosa consideración de varios parámetros para garantizar su eficacia y especificidad. Como se puede observar en la Imagen 1.6, en el diseño de una sonda solvatocrómica negativa se debe tomar en cuenta que su estado basal esté favorecido hacia la forma zwitteriónica (panel a, Imagen 1.6), por lo que los autores exploraron diversos fluoróforos (paneles b y c). Un de las ventajas de contar con una sonda solvatocrómica negativa es que emite a

dos longitudes de ondas distintas dependiendo de cual estructura de resonancia esté más favorecida, esto permite el cruce de ambos canales para obtener información sobre la polaridad en el medio en el que se encuentra. Observemos en el análisis espectrofotométrico a pesar de ser pequeño el desplazamiento hipsocrómico de la sonda (41 nm), es suficiente para observar su respuesta tanto en el canal verde como en el rojo (paneles d y e) en microscopía de fluorescencia. La mezcla de ambos canales va a proporcionar un parámetro que se puede relacionar directamente con la polaridad del organelo (panel f).

Las sondas actuales han permitido la obtención de imágenes por microscopía de fluorescencia en modelos *in vitro* e *in vivo* que han aportado mucho a nuestra comprensión sobre diversos procesos celulares, ejemplo de ello se muestra en la Imagen 1.7 para la sonda de 3a-azapiren-4-ona (AP-C12). No obstante, siguen exhibiendo muchas desventajas que limitan el proceso, entre ellas: las altas concentraciones requeridas para la obtención de imágenes, los largos tiempos de penetración celular y baja fotoestabilidad (20). El fluoróforo ideal para la mayoría de las aplicaciones contaría con un rendimiento cuántico cercano a 1, sería observable a cualquier longitud de onda en todos los microscopios, no mostraría toxicidad, no se fotoblaquearía bajo ninguna potencia de iluminación y funcionaría en todos los sistemas biológicos. Sin embargo, es imposible que exista un fluoróforo con estas características. Pero sí nos abre el panorama sobre lo que se deben tomar en cuenta en el desarrollo de nuevas sondas: 1) aumentar su desempeño en sistemas biológicos y 2) hacer coincidir λ_{abs} y λ_{em} con fuentes de excitación comunes y conjuntos de filtros utilizados en sistemas de imágenes (21).

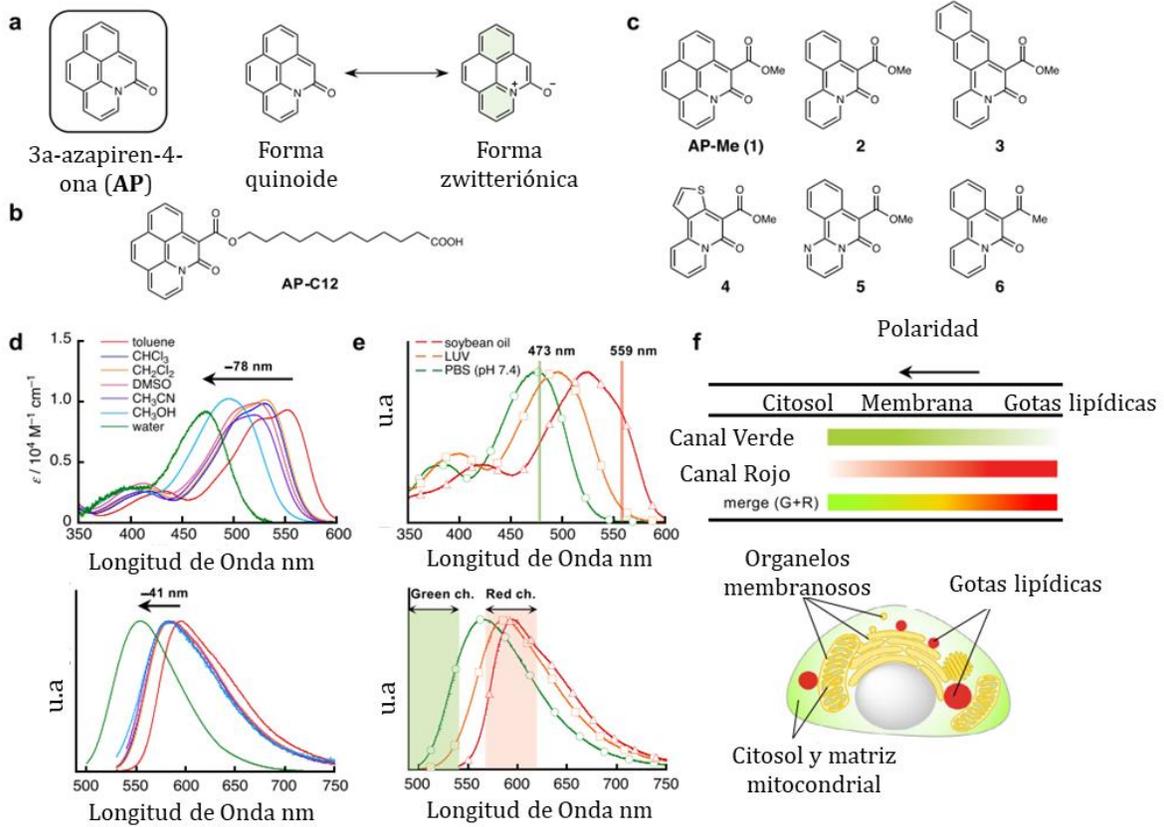


Imagen 1.6 Sondas fluorescentes derivadas de 3a-azapiren-4-ona con solvatocromismo negativo para el estudio in vitro de la micropolaridad en organelos membranosos y gotas lipídicas.

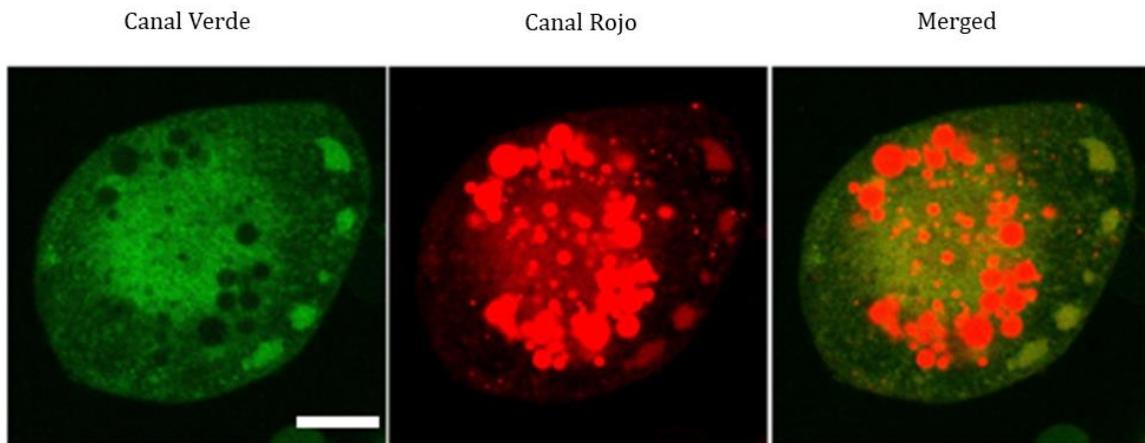


Imagen 1.7 Observación en microscopio confocal de los canales verde y rojo en adipocitos marcados con la sonda de 3a-azapiren-4-ona (AP-C12).

1.4 MICROSCOPIA DE IMAGEN

1.4.1 Introducción a la microscopia óptica

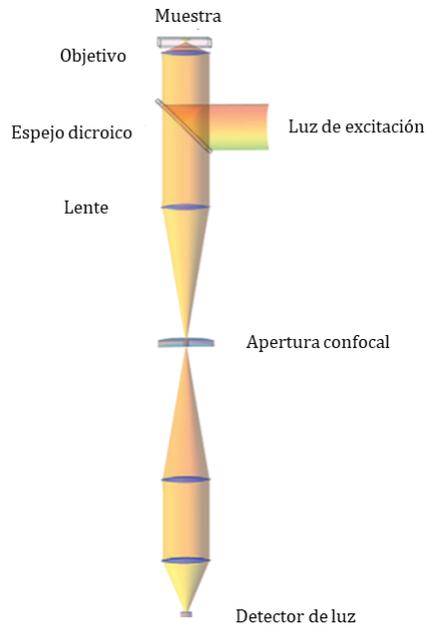
La microscopía es una técnica que consiste en ampliar estructuras que no son observables a simple vista (22). Ha desempeñado un papel importante en el estudio de las células, desde la apreciación de animálculos por Van Leeuwenhoek con un microscopio simple, hasta detalles de eventos celulares con una variedad de sofisticados sistemas de imágenes (23).

Se divide en dos grandes ramas con base en el tipo de radiación utilizada para obtener imágenes: la óptica y la electrónica. La microscopía óptica utiliza las propiedades refractivas de la luz para ampliar muestras, mientras que la microscopía electrónica utiliza electrones para el mismo propósito (24). Dentro de los microscopios ópticos tenemos el de campo claro y el de contraste de fases, si bien ambos permiten observar la morfología celular y algunos organelos, para el estudio del metabolismo y otros procesos celulares se requieren de técnicas más sensibles. La microscopía de fluorescencia se desarrolló para superar estas limitaciones y proporcionar una técnica de obtención de imágenes más versátil e informativa.

Un microscopio de fluorescencia es un instrumento óptico altamente especializado que aprovecha las propiedades fluorescentes de algunas moléculas para el análisis de muestras biológicas o materiales. Este tipo de microscopía normalmente emplea una lámpara de alta intensidad, como una lámpara de xenón o mercurio, para la emisión de fotones de un amplio espectro, donde incluye las longitudes de onda específicas para llevar a cabo la excitación de los fluoróforos. Antes de llegar el haz de luz a la muestra, pasa a través de un filtro de excitación, el cual transmite selectivamente la longitud de onda de excitación deseada, impidiendo el paso de otras longitudes de onda. El filtro de excitación garantiza que sólo la luz con las características adecuadas llegue a la muestra. El rayo de luz de excitación se dirige hacia la muestra mediante un espejo dicróico, también conocido como un divisor de haz. Este componente óptico tiene como función reflejar la luz de excitación y permitir el paso de los fotones emitidos. El filtro de emisión tiene como objetivo bloquear cualquier luz de excitación restante y solo permitir el paso

de los fotones emitidos. Finalmente, un fotodetector adecuado captura la fluorescencia. Este detector convierte la luz entrante en una señal eléctrica, la cual es amplificada y procesada para posteriormente crear una imagen en un monitor de computadora (23). Además, los microscopios de fluorescencia confocal incluyen una pequeña abertura antes del detector. Así restringe la detección de luz a un plano focal específico, lo que garantiza que la luz que llega al detector provenga únicamente del punto equivalente de la muestra donde se centró la luz de excitación. La microscopía confocal de fluorescencia permite escanear la muestra o capturar imágenes en varios planos focales y así reconstruir imágenes fluorescentes tridimensionales de la muestra (25).

La introducción de la microscopía de fluorescencia ha llevado al desarrollo de una gran variedad de moléculas fluorescentes que se han adaptado en términos de especificidad para objetivos como proteínas, lípidos, iones u organelos (23). Se han convertido en herramientas indispensables en la biología moderna porque proporcionan información dinámica sobre la localización y la cantidad de moléculas de interés, lo que permite monitorear procesos fisiológicos en tejidos y células *in vivo*. Actualmente se puede teñir las células con más de una sonda fluorescentes simultáneamente (26). Esto ha llevado a la microscopía de fluorescencia a ser actualmente la técnica microscópica más utilizada en el campo de la biomedicina para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y terapias, por lo que en la actualidad el objetivo es sintetizar sondas que permitan observar procesos subcelulares en organismos vivos con una resolución espacial y temporal cada vez más acertada.



1.4.2 Aplicaciones en microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una técnica ampliamente utilizada para la obtención de bioimágenes. A lo largo de los años han ayudado a comprender las bases del metabolismo celular (27).

Las biomembranas constituyen la base de todos los compartimentos de las células vivas y, por tanto, la exploración de su organización lipídica es esencial para comprender el estado y actividad celular. Sin embargo, la detección y la obtención de imágenes de la organización de los lípidos en distintos organelos es un desafío. En 2021 Danylchuk y colaboradores sintetizaron una serie de sondas utilizando como base Rojo de Nilo para marcar el retículo endoplásmico, las mitocondrias, los lisosomas, el aparato de Golgi, la membrana plasmática y las gotas lipídicas. Estas sondas se diseñaron con la finalidad de ser sensibles a la micropolaridad. Las membranas celulares se componen de la fase Líquida ordenada (L_o) y Líquida desordenada (L_d). L_o juega un papel crucial en la formación de microdominios lipídicos, tiene una alta concentración de colesterol y lípidos saturados como esfingomielina, se encuentra mayormente en la membrana

plasmática y en menor medida en las membranas de los organelos. Por otro lado, la fase L_d está principalmente compuesta por lípidos insaturados.

Los fluoróforos solvatocrómicos pueden informar sobre el estado físico de las biomembranas, sus alteraciones durante la apoptosis, inanición y estrés oxidativo. Así como distinguir células sanas de cancerosas. Debido a su sensibilidad a la hidratación de la membrana, sus propiedades dieléctricas, y relajación de solventes, los fluoróforos solvatocrómicos son particularmente adecuados para sondear el orden de los lípidos utilizando microscopía de fluorescencia confocal. Mediante experimentos de colocalización con marcadores de organelos comerciales y las sondas solvatocrómicas es posible obtener bioimágenes que aporten información sobre la polaridad local del organelo objetivo (18). Además, es posible llevar a cabo un análisis ratiométrico, el cual consiste en cuantificar la intensidad de las señales en la muestra para obtener información sobre la distribución y abundancia del parámetro a analizar. Esto permite un análisis preciso, cuantitativo y 3D de las muestras, lo que convierte a la microscopía confocal de fluorescencia en una herramienta valiosa para una amplia gama de aplicaciones.

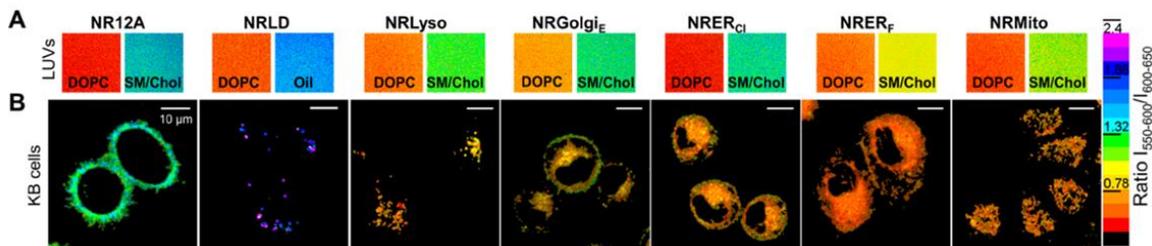


Imagen 1.9 Imágenes confocales ratiométricas que presentan las fases L_o (fosfolípidos DOPC: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina) y L_d (SM/Chol: Esfingomielina/Colesterol) para la calibración de las sondas sintetizadas por (18) utilizando microscopía confocal de proporción de canales de fluorescencia (ratiométrica).

1.5 SONDAS MITOCONDRIALES NERNSTIANAS

Las sondas fluorescentes Nernstianas, como el éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE) y el éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM), han sido diseñados con el

propósito de medir el potencial de membrana absoluto a través de un mecanismo de redistribución según la ecuación de Nernst (ver Imagen 1.10). La premisa subyacente es que estos cationes lipofílicos altamente fluorescentes y permeables se distribuirán a través de la membrana celular de manera proporcional al potencial de membrana. En una célula u organelo polarizado, se espera que haya una concentración más elevada de la sonda en el interior en comparación con el exterior. Este principio permite, por medio de la microscopía confocal y otros métodos de análisis de imágenes, medir con precisión la intensidad de fluorescencia dentro y fuera de la célula, lo que proporciona la capacidad de determinar el potencial de membrana absoluto. Aunque la lenta velocidad de redistribución a través de la membrana plasmática limita su uso en mediciones rápidas, estos compuestos encuentran una aplicación significativa en la evaluación del potencial de membrana mitocondrial en células vivas, siendo utilizados por diversos laboratorios en estudios cualitativos y cuantitativos tanto en microscopía de imágenes como en citometría.

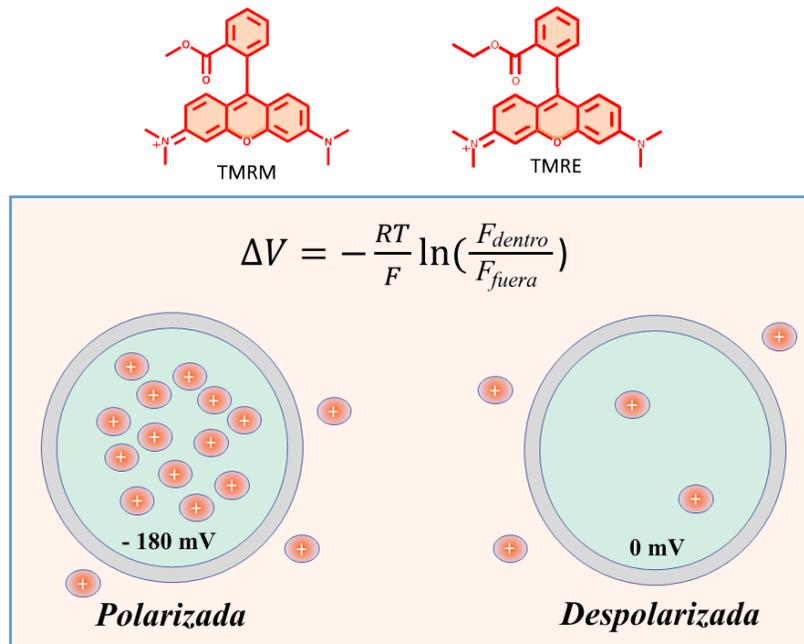


Imagen 1.10 Sondas fluorescentes de tipo Nernstiano TMRM y TMRE ilustrando su mecanismo de localización subcelular en membranas, por ejemplo, mitocondriales con un potencial V de -180 mV (membrana polarizada), el cual localiza una concentración alta de cationes lipofílicos TMR de acuerdo a la ecuación de Nernst y cuya concentración disminuye al despolarizar (menor potencial V) la membrana.

Similar al mecanismo Nernstiano ampliamente utilizado para sondas mitocondriales, donde el potencial de membrana impulsa la orientación mitocondrial mediante interacciones principalmente electrostáticas, en nuestro grupo de trabajo visualizamos que la distribución en equilibrio entre dos fases líquidas inmiscibles (la llamada ley de distribución de Nernst) (28), como las presentes en los compartimentos citosólico y de membranas lipídicas, podría ser la fuerza impulsora para acumular la sonda molecular en dichas membranas lipofílicas a través de un escenario de partición monomérica (fase altamente lipofílica) y autoasociativa o de agregados moleculares (fase acuosa), Imagen 1.11.

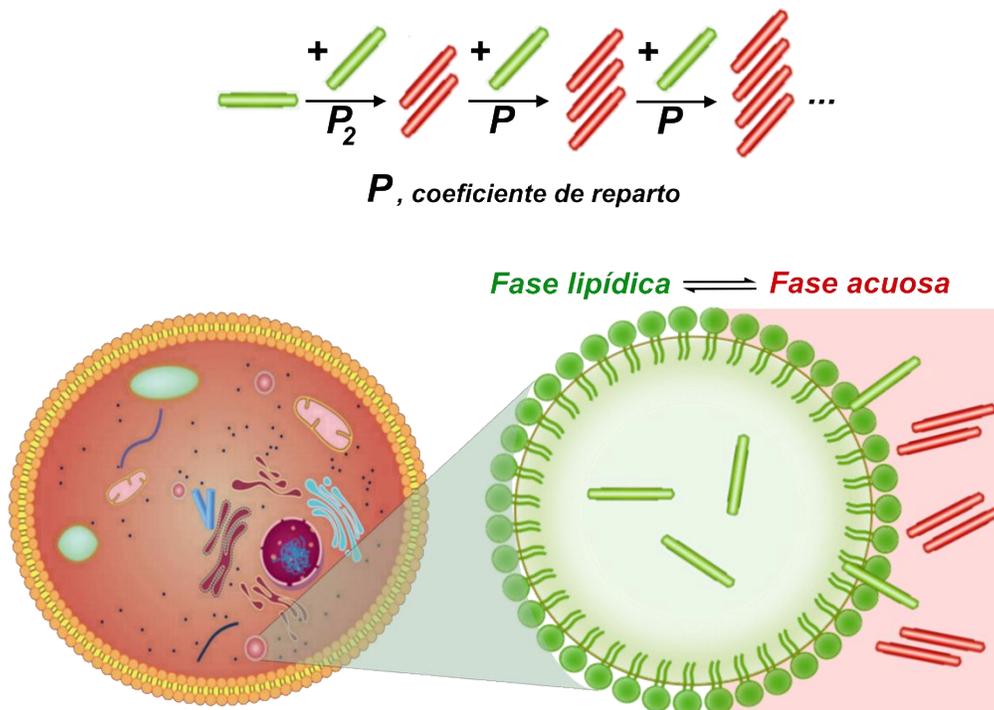


Imagen 1.11 Representación esquemática del modelo de distribución de moléculas en dos fases, lipídica y acuosa en un equilibrio determinado por el coeficiente de reparto (P), utilizando como ejemplo una membrana de monocapa lipídica subcelular. En un escenario simple, dicho equilibrio puede ser isodésmico, es decir, la asociación paso por paso se simplifica a $P_2 = P$. En este mecanismo, las especies moleculares coexisten en su forma monomérica (en la fase lipídica, color verde) y en su fase autoasociada o agregada (en la fase acuosa, color rojo).

El coeficiente de reparto de Nernst (P) en las membranas lipídicas se define como la constante de equilibrio para la distribución de especies entre la fase lipídica (membranas biológicas) y la fase acuosa (citosólica circundante). Con ello, las sondas fluorescentes Nernstianas clásicas (guiadas por carga) podrían fortalecer su localización en mitocondria debido a una contribución de sus características de distribución de fases. Un fenómeno que actualmente está en estudio en el grupo de investigación.

CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS

Postulamos que mediante el diseño de sondas fluorescentes mitocondriales de tipo Nernstiano, acompañadas de sus correspondientes sondas de retención mitocondrial vía hidrólisis de un grupo éster, es factible aprovechar el solvatocromismo negativo y la agregación dependiente de la ley de distribución de Nernst. Al capitalizar las diferencias en las propiedades físicas y químicas entre la membrana mitocondrial y el medio citosólico, estas sondas ofrecerán un monitoreo altamente selectivo y sensible del potencial de membrana mitocondrial. Además, la capacidad de localizarlas de manera independiente de dicho potencial a través de la retención molecular por hidrólisis promete abrir nuevas perspectivas en la investigación de procesos mitocondriales, así como en la comprensión de su implicación en la fisiología celular y las enfermedades asociadas.

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal es diseñar, sintetizar y caracterizar sondas fluorescentes mitocondriales de tipo Nernstiano con solvatocromismo negativo destinadas a la exploración y el análisis de la dinámica mitocondrial, con un énfasis en la distribución molecular diferenciada entre un ambiente lipofílico como las membranas mitocondriales y uno hidrofílico, como el ambiente citosólico. Estas sondas proporcionarán herramientas altamente selectivas y sensibles para investigar los procesos mitocondriales y su impacto en la fisiología celular y las patologías asociadas.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Síntesis de sondas fluorescentes mitocondriales Nernstianas y con solvatocromismo negativo: desarrollar sondas dependientes de potencial utilizando un balance lipofílico y catiónico en las moléculas para localizarse en dicho organelo.
2. Desarrollar una sonda Nernstiana dependiente de potencial con una función éster para retención mitocondrial por hidrólisis de dicha función química.
3. Desarrollar una sonda fluorescente basada en la Ley de Distribución de Nernst (monómero \rightleftharpoons agregado molecular) que sea capaz de revelar diferencias entre las membranas mitocondriales y el ambiente citosólico por agregación molecular.
4. Análisis de datos de espectroscopia de UV-Vis y fluorescencia: analizar los datos generados en espectroscopia óptica mediante titulaciones de los perfiles de respuesta a la agregación molecular y al solvatocromismo negativo.

5. Evaluación *in vitro*: probar las sondas desarrolladas en modelos biológicos relevantes para demostrar su aplicabilidad en la investigación mitocondrial y su potencial utilidad en estudios de fisiología y patología celular.

CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA

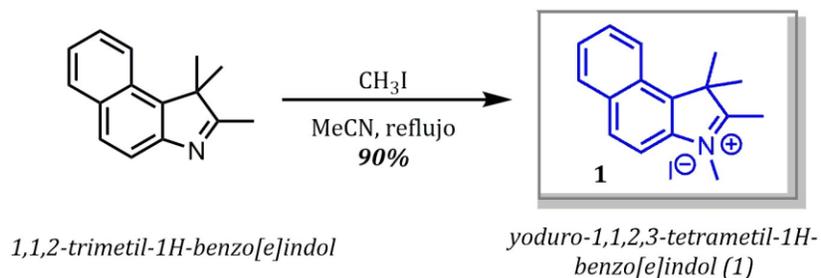
4.1 METODOLOGÍA SÍNTETICA

Las materias primas y disolventes utilizados son de origen comercial y fueron obtenidos de sigma aldrich, fueron utilizados sin purificación extra. Los disolventes se secaron mediante métodos estándar o se destilaron antes de su uso. Las reacciones fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa fina, la fase estacionaria fue de gel de sílice prerrevestida (ALUGRAM SIL G/UV254), se revelaron mediante exposición a una lámpara UV a longitudes de onda λ 254 nm y λ 365 nm. Los espectros infrarrojos se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum 400 FT-IR/FT-FIR, el número de onda se informa en cm^{-1} . Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se obtuvieron en un equipo modelo Jeol Eclipse-300 MHz y Bruker Avance III de 400 MHz utilizando CDCl_3 y CD_3SOCD_3 como disolventes. Los datos para ^1H NMR se informan de la siguiente manera: desplazamiento químico como partes por millón en el campo (δ), integración, multiplicidad (s=singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, m = multiplete). Los espectros de masas se obtuvieron mediante la técnica DART+ de alta resolución en un espectrómetro Jeol JMS-T100LC y los valores de las señales se expresan en unidades de masa/carga (m/z), seguidos de la intensidad relativa con referencia a un pico de base del 100%, los espectros se encuentran en el apartado de caracterización.

4.1.1 Síntesis de yoduro-1,1,2,3-tetrametil-1*H*-benzo[e]indol (1)

Para la síntesis de esta sal se disolvió 1 g de 1,1,2-trimetilben[e]indol (4,78 mmol) en 30 ml de acetonitrilo, posteriormente se añadieron 3 equivalentes (Eq) de yoduro de metilo (2.04 g, 14.34 mmol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriando para

promover la precipitación del producto. Por último, se lavó con acetado de etilo frío y se secó a vacío. Se obtuvo un sólido grisáceo que corresponde al compuesto 1 puro (1,51 g (90%). RMN ¹H (300 MHz, CD₃SOCD₃, δ, ppm): 8,37 (d, J=8,1 Hz, 1H), 8,30 (d, J=9,0 Hz, 1H), 8,22 (d, J=7,8 Hz, 1H), 8,12 (d, J=9,0 Hz, 1H), 7,81-7,69 (m, 2H), 4,11 (s, 3H), 2,90 (s, 3H), 1,80 (s, 6H). RMN ¹³C (75 MHz, CD₃SOCD₃, δ, ppm): 196,5, 140,1, 137,1, 133,6, 131,1, 130,3, 129,0, 127,7, 124,0, 113,8, 55,8, 35,9, 21,9, 14,9.

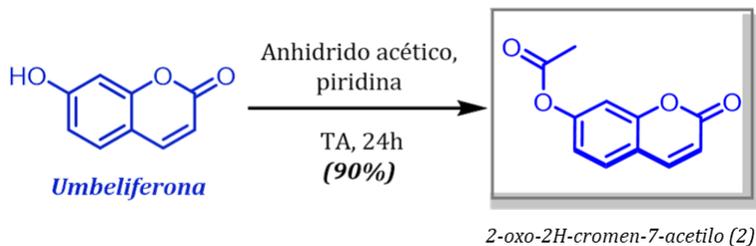


Esquema 4.1. Síntesis de yoduro-1,1,2,3-tetrametil-1H-benzo[e]indol.

4.1.2 Síntesis de 2-oxo-2H-cromen-7-acetilo (2)

Para llevar a cabo la acetilación de la 7-hidroxicumarina se añadieron 0.5 g de 7-hidroxicumarina (3,08 mmol) en 10 ml de diclorometano seco, 5 Eq de anhídrido acético (1 ml, 15 mmol) y 0.4 Eq de piridina (0,1 ml, 1,24 mmol). La reacción se llevó a cabo en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas. La reacción se siguió mediante cromatografía en capa fina, utilizando un sistema de elución 8:2 Hexano-Acetato de etilo. Cuando la 7-hidroxicumarina se consumió por completo, la mezcla de reacción tomó un color café claro. El disolvente se eliminó a presión reducida y los sólidos se disolvieron en 10 ml de agua. Para eliminar el ácido acético, subproducto de la reacción, se neutralizó con NaHCO₃ y posteriormente se extrajo tres veces con 15 ml de acetato de etilo. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio para eliminar las moléculas de agua que pudieron haber quedado atrapadas, finalmente se eliminó mediante presión reducida. Se obtuvo un sólido blanco el cual corresponde a 7-acetoxicumarina puro (0,6 g, 95%). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 7,70 (d, J=9,6 Hz, 1H), 7,48 (d, J=8,4 Hz, 1H), 7,11 (d, J=2,2 Hz, 1H), 7,04 (dd, J₁=8,4 Hz, J₂=2,2 Hz, 1H),

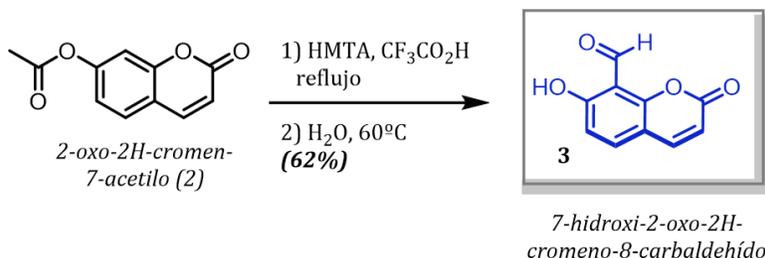
6,39 (d, J=9,6 Hz, 1H), 2,30 (s, 3H). RMN 13C (75 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 168,7, 160,3, 154,7, 153,1, 128,6, 118,4, 116,7, 116,1, 110,4, 21,1.



Esquema 4.2. Condiciones de reacción para la síntesis de 2-oxo-2H-cromen-7-acetilo.

4.1.3 síntesis de 7-hidroxi-2-oxo-2H-cromeno-8-carbaldehído (3)

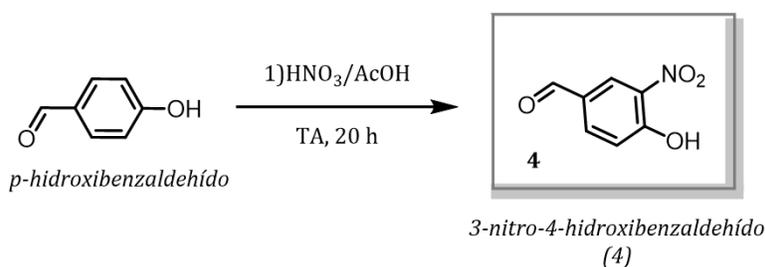
Para la formilación del núcleo de cumarina se colocó un matraz bola en baño de hielo, se añadió el compuesto 2 (0,5 g, 2,44 mmol) en 10 ml de ácido trifluoroacético (TFA), posteriormente se añadió hexametilentetramina (0,68 g, 4,88 mmol). La solución se dejó en agitación y reflujo durante 16 horas. Se observó un cambio de color de incoloro a amarillo transcurrido este tiempo. Posteriormente, la mezcla de reacción se dejó enfriando hasta temperatura ambiente, se eliminó el TFA a presión reducida y se añadieron 10 ml de agua y se calentó a 60 °C durante 30 minutos para llevar a cabo la hidrólisis de la imina y obtener el formilo. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriando a temperatura ambiente. Se observó la formación de un precipitado, el cual se filtró y lavó con agua fría, el compuesto 3 se obtuvo en forma de sólido amarillo (0,27 g, 62%). Cuando la precipitación del producto no es efectiva, es posible purificarlo mediante cromatografía en columna, utilizando un sistema 7:3 hexano-acetato, de esta forma, el producto se obtiene como un sólido color beige. RMN 1H (300 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 12,21 (s, 1H), 10,59 (s, 1H), 7,65 (d, J=9,6 Hz, 1H), 7,59 (d, J=8,9 Hz, 1H), 6,88 (d, J=8,9 Hz, 1H), 6,32 (d, J=9,6 Hz, 1H). RMN 13C (75 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 192,9, 165,5, 159,1, 156,7, 143,4, 136,0, 114,7, 113,4, 110,8, 106,6, 77,3, 77,0, 76,7.



Esquema 4.3. Condiciones de reacción para la síntesis de 7-hidroxi-2-oxo-2H-cromeno-8-carbaldehído.

4.1.4 Síntesis de 3-nitro-4-hidroxibenzaldehído (4)

En un matraz bola fondo plano en baño de hielo y se dejó enfriar por aproximadamente 10 minutos, posteriormente se agregaron 1.2 g de 4-hidroxibenzaldehído (9.8mmol). Gota a gota, en agitación vigorosa, se añadieron 3.5ml de HNO₃ al 70%. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 20 horas. Conforme el tiempo iba transcurriendo, se observaba la formación de un precipitado de color amarillo. Al finalizar la reacción, el sólido obtenido es lavado con 2 porciones de 700μl de ácido acético 70% y 3 porciones de 5 ml de agua destilada. Se dejó filtrando al vacío toda la noche para eliminar los restos de ácido. El 3-nitro-4-hidroxibenzaldehído se obtiene como un sólido amarillo (0,83g, 51%). Faltan datos RMN.

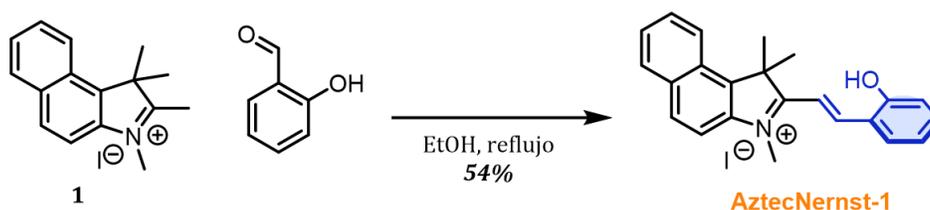


Esquema 4.4. Condiciones de reacción para la síntesis de 3-nitro-4-hidroxibenzaldehído.

4.1.5 Síntesis de AztecNernst-1 (AN-1)

En un matraz bola se agregaron 0,05 g de 4-hidroxibenzaldehído (0,409 mmol) 0,144 g de la sal de benzoindolinio (0,409 mmol) y se disolvieron en 7 ml de etanol absoluto. La

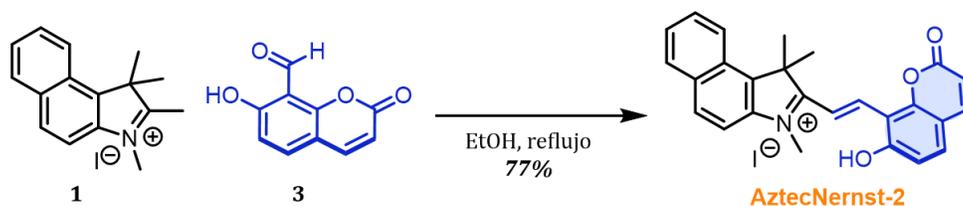
mezcla de reacción se llevó a reflujo y se dejó 12 h. Una vez concluido el tiempo de reacción se observó la formación de un precipitado, el cual se purificó mediante filtración a vacío y lavados con etanol frío. La sonda AztecNernst-1 se obtuvo como un sólido de color naranja (0,1 g, 54%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3SOCD_3 , δ , ppm): 11,05 (s, 1H), 8,59 (d, $J=16,6$ Hz, 1H), 8,45 (d, $J=8,4$ Hz, 1H), 8,30 (d, $J=9,0$ Hz, 1H), 8,22 (d, $J=8,2$ Hz, 1H), 8,17 (d, $J=8,2$ Hz, 1H), 8,11 (d, $J=9,0$ Hz, 1H), 7,83-7,69 (m, 3H), 7,48 (t, $J=8,4$ Hz, 1H), 7,06 (d, $J=8,2$ Hz, 1H), 7,01 (d, $J=7,5$ Hz, 1H), 4,22 (s, 3H), 1,99 (s, 6H). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3SOCD_3 , δ , ppm): 183,1, 159,4, 147,6, 140,1, 138,4, 135,8, 133,7, 131,5, 130,6, 130,3, 129,0, 127,7, 127,2, 123,7, 121,9, 120,6, 117,3, 113,9, 112,2, 54,1, 35,5, 26,3.



Esquema 4.5. Condiciones de reacción para la síntesis de AztecNernst-1.

4.1.6 Síntesis de AztecNernst-2 (AN-2)

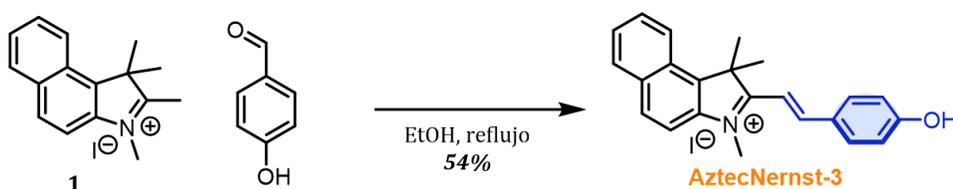
En un matraz bola se añadieron 50 mg del compuesto 3 (0,263 mmol) y 92 mg del compuesto (0,263 mmol) en etanol absoluto (7 ml). Al igual que para la síntesis de AztecNernst-1, se calentó a reflujo durante 12 horas. Una vez concluida la reacción se observó la presencia de un precipitado. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, el sólido naranja resultante se filtró, se lavó con etanol y se secó para dar 106 mg (75%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3SOCD_3 , δ , ppm): 8,60 (d, $J=16,7$ Hz, 1H), 8,50 (d, $J=8,6$ Hz, 1H), 8,31 (d, $J=9,0$ Hz, 1H), 8,22 (d, $J=7,8$ Hz, 1H), 8,14 (d, $J=16,7$ Hz, 1H), 8,12 (d, $J=9,5$ Hz, 1H), 8,08 (d, $J=9,5$ Hz, 1H), 7,81 (d, $J=8,6$ Hz, 1H), 7,81-7,70 (m, 2H), 7,07 (d, $J=8,6$ Hz, 1H), 6,42 (d, $J=9,5$ Hz, 1H), 4,18 (s, 3H), 2,02 (s, 6H). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 182,9, 162,0, 159,3, 154,6, 144,9, 140,5, 139,5, 138,0, 134,0, 133,2, 130,9, 130,0, 128,4, 127,2, 126,7, 123,3, 115,5, 113,3, 113,2, 112,1, 111,7, 109,0, 53,5, 34,8, 25,6.



Esquema 4.6. Condiciones de reacción para la síntesis de AztecNernst-2.

4.1.7 Síntesis de AztecNernst-3 (AN-3)

Este compuesto se obtuvo mediante la condensación de 4-hidroxibenzaldehído (compuesto 4) (0,05 g, 0,409 mmol) y el compuesto 1 (0,144 g, 0,409 mmol) en etanol absoluto (7 ml). El producto se purificó como descrito para las sondas AN-1 y 2, se obtuvo como un sólido de color naranja (0,11 g, 54%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3SOCD_3 , δ , ppm): 8,44 (d, $J=16,3$ Hz, 1H), 8,40 (d, $J=8,4$ Hz, 1H), 8,27 (d, $J=9,0$ Hz, 1H), 8,20 (d, $J=8,4$ Hz, 1H), 8,14 (d, $J=8,7$ Hz, 2H), 8,07 (d, $J=9$ Hz, 1H), 7,79 (t, $J=8,2$ Hz, 1H), 7,70 (t, $J=8,2$ Hz, 1H), 7,50 (d, $J=16,3$ Hz, 1H), 6,98 (d, $J=8,7$ Hz, 1H), 4,21 (s, 3H), 2,00 (s, 6H). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3SOCD_3 , δ , ppm): 182,9, 163,4, 153,2, 140,1, 138,0, 134,0, 133,6, 131,3, 130,6, 128,9, 127,5, 127,3, 126,7, 123,6, 116,9, 113,7, 109,5, 54,0, 26,9.

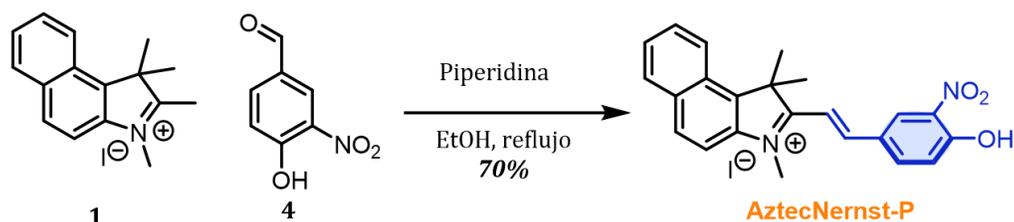


Esquema 4.7. Condiciones de reacción para la síntesis de AztecNernst-3.

4.8 Síntesis de AztecNernst-P (AN-P)

Este compuesto se obtuvo mediante la condensación de 4-hidroxi-3-nitrobenzaldehído (0,05 g, 0,299 mmol), el compuesto 1 (0,105 g, 0,299 mmol) y en 7ml de etanol absoluto, se añadió piperidina como catalizador (30 μl , 0,299 mmol) para que la reacción se llevara a cabo satisfactoriamente. Transcurridas las 12 h, a diferencia de las sondas AN-

1,2 y 3, no se observaba claramente la formación de un precipitado. La mezcla de reacción se dejó en hielo y posteriormente se lavó con etanol absoluto frío, sin embargo, la cantidad de precipitado obtenido fue muy bajo (0,03g). Se realizó una placa de cromatografía en capa fina y se observó que en las aguas madre provenientes de la filtración aún había gran cantidad del producto, por lo que se decidió purificar por cromatografía en columna, utilizando un sistema 95:5 diclorometano-metanol, de esta manera se obtuvieron 0,1 g de un sólido negro iridiscente, lo cual corresponde a un rendimiento de 70%. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 8,59 (s, 1H), 8,38 (d, $J=15,4$ Hz, 1H), 8,30 (d, $J=8,3$ Hz, 1H), 8,15 (d, $J=8,9$ Hz, 1H), 8,11 (d, $J=8,3$ Hz, 1H), 8,00 (bs, 1H), 7,86 (d, $J=8,9$ Hz, 1H), 7,74-7,68 (m, 1H), 7,57-7,55 (m, 1H), 6,95 (d, $J=15,4$ Hz, 1H), 6,46 (d, $J=9,3$ Hz, 1H), 3,95 (s, 3H), 1,96 (s, 6H). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3SOCD_3 , δ , ppm): 179,5, 172,2, 153,2, 140,5, 135,4, 132,6, 130,9, 130,5, 128,5, 127,7, 126,1, 123,1, 116,7, 112,8, 102,1, 52,3, 33,2, 26,8.

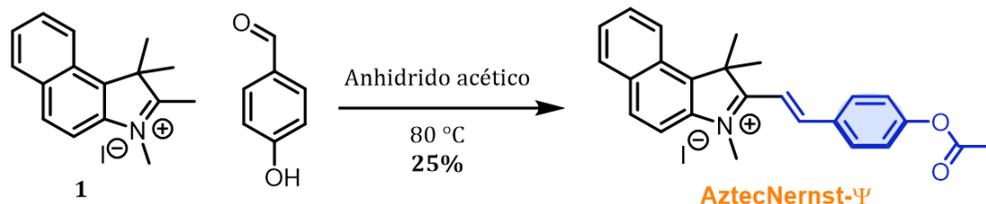


Esquema 4.8. Condiciones de reacción para la síntesis de AztecNernst-P.

4.1.9 Síntesis de AztecNernst- ψ (AN- ψ)

En un matraz bola se añadieron 0,05 g de 4-hidroxi-3-benzaldehído (0,409 mmol) y 0,144 g del compuesto 1 (0,409 mmol) utilizando como disolvente anhídrido acético (7 ml), se dejó reaccionando a reflujo por 12 h. El producto se purificó mediante cromatografía en columna, utilizando un sistema de elución de 95:5 DCM, se obtuvo AztecNernst- ψ en forma de un sólido de color café iridiscente (0,05 g, 25%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 8,50 (d, $J=16,5$ Hz, 1H), 8,43 (d, $J=8,5$ Hz, 1H), 8,30 (d, $J=8,5$ Hz, 2H), 8,29 (s, 1H), 8,22 (d, $J=7,9$ Hz, 1H), 8,12 (d, $J=8,9$ Hz, 1H), 7,82 (t, $J=7,1$ Hz, 1H), 7,73 (t, $J=7,1$ Hz, 1H), 7,72 (d, $J=16,5$ Hz, 1H), 7,38 (d, $J=8,5$ Hz, 2H), 4,29 (s, 3H), 2,32 (s,

3H), 2,01 (s, 6H). ^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3SOCD_3 , δ , ppm): 183,1, 169,7, 154,5, 151,3, 140,0, 138,8, 133,8, 132,8, 132,3, 131,5, 130,6, 129,1, 127,9, 127,2, 123,8, 123,4, 114,0, 113,4, 54,5, 35,8, 25,5, 21,5.



Esquema 4.9. Condiciones de reacción para la síntesis de AztecNernst- Ψ .

4.2 EXPERIMENTOS EXPECTROFOTOMÉTRICOS

Los disolventes utilizados para las mediciones fueron grado reactivo y en algunos casos grado HPLC. Todas las mediciones se realizaron a 25 °C. Se preparó una solución Stock 5mM de cada sonda en 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). El contenido final de DMSO se mantuvo en menos del 1 % en cada medición. Los espectros de UV-Vis fueron obtenidos en celdas de cuarzo utilizando un espectrofotómetro de arreglo de diodos Thermo Scientific Evolution. Los espectros de fluorescencia también fueron obtenidos en celdas de cuarzo, utilizando un espectrofluorómetro FS5 Edinburgh Instruments.

4.2.1 Evaluación de las propiedades solvatocrómicas

Para los experimentos de solvatocromismo se utilizaron los disolventes que se muestran en la tabla 4.1. Para cada medición se añadieron 3 ml del disolvente en cuestión y 5 μl de AztecNernst-3 y P, y 10 μl de AztecNernst-1 y 2.

Disolvente	ϵ
Dioxano	2.22
Tetracloruro de carbono (CCl ₄)	2.24
Tolueno	2.38
Tetrahidrofurano (THF)	7.52
Diclorometano (DCM)	8.93
Octanol	10.30
i-propanol	20.18
Acetona	21.01
EtOH	24.65
MeOH	33.00
Acetonitrilo (ACN)	36.64
DMSO	46.68
Agua	80.40
N-metilformamida (NMF)	189

Tabla 4.1. Disolventes utilizados en el análisis solvatocrómico y sus constantes dieléctricas

4.2.2 Determinación de pK_a

Para la valoración ácido-base se utilizaron disoluciones previamente valoradas de HCl 0.1 mM y NaOH 0.2 mM. En un matraz deprecipitado se agregaron 15 ml de agua destilada, a la cual se le añadió 20 μ L de cada sonda. Se agregó el volumen de HCl necesario para bajar el pH de la disolución a aproximadamente 2. Posteriormente, se iba agregando poco a poco un volumen conocido de NaOH para aumentar el pH. Se realizó medición de absorción y emisión cada 0.5 unidades de pH. Este procedimiento se realizó para las sondas AztecNernst-1, 2, 3 y P.

4.2.3 Evaluación de la capacidad de formar agregados

Se utilizó la mezcla de disolventes THF-Agua y Hexano-Cloroformo (CHCl_3) Para cada medición se fue variando la concentración expresada en % v/v de THF y Hexano, respectivamente, en un volumen final de 3 ml. Se evaluó la absorción y emisión aumentando la concentración en un 10%. El volumen de las sondas que se añadió para cada medición fue: 5 μl de AztecNernst-3 y P, y 10 μl de AztecNernst-1 y 2.

4.2.4 Evaluación de la respuesta a microviscosidad local

Se utilizó el sistema de disolventes Glicerol-Agua. Para cada medición se fue variando la concentración expresada en % v/v de glicerol, en un volumen final de 3 ml. Se evaluó la absorción y emisión aumentando la concentración en un 10%. El volumen de las sondas que se añadió para cada medición fue: 5 μl de AztecNernst-3 y P, y 10 μl de AztecNernst-1 y 2.

4.3 CULTIVO CELULAR Y MICROSCOPIA DE IMAGEN

La línea celular con la que se trabajó fue U-251, derivada de glioblastoma humano (U-251 MG cell line human, # 09063001, Merck, USA). Las células se cultivaron como monocapas a una densidad de 10000 células por pozo en cajas de 8 pozos de 10 mm con fondo de vidrio de la marca ibidi (μ -Slide 8 well high Glass Bottom, #80807, ibidi GmbH, Germany). El medio utilizado fue RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, la incubadora se configuró a una temperatura de 37 °C y 5 % de CO_2 . Los tratamientos celulares que se realizaron para microscopía de imagen fueron con: 1) cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona (150 nM CCCP), 2) 10% NaCl y 3) 1 μM ácido oleico.

Para los estudios de localización las células se prepararon lavándose con PBS y se cambió el medio nuevamente. El Stock de las sondas para microscopía fue de 5 mM en 2 ml de DMSO. Se añadió 1 μl para cada una de las sondas. La configuración confocal que

se utilizó para todos los experimentos de microscopía fue la siguiente: Texas Red, $\lambda_{exc}=590\text{nm}$ $\lambda_{em}=615\text{ nm}$, proteína verde fluorescente (PVF) $\lambda_{exc}=488\text{ nm}$, $\lambda_{em} = 520\text{ nm}$ y DAPI $\lambda_{exc} = 358\text{ nm}$, $\lambda_{em} = 450\text{ nm}$. Los datos fueron analizados utilizando el programa Fiji (ImageJ).

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DISEÑO DE LAS SONDAS FLUORESCENTES

En tiempos recientes, los fluoróforos han ganado una amplia aceptación como herramientas valiosas para monitorear las alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Este parámetro tiene una importancia fisiológica significativa, ya que está estrechamente relacionado con la capacidad de una célula para producir ATP a través de la fosforilación oxidativa. Por lo tanto, $\Delta\Psi_m$ sirve como un indicador crucial del estado de una célula ya sea que esté sana o experimentando daño. Explotando esta característica crítica de la membrana, los fluoróforos suelen consistir en compuestos catiónicos lipofílicos que se distribuyen a través de las membranas siguiendo la ley de potencial de Nernst, lo que conduce a su acumulación en el espacio de la matriz mitocondrial. Esta acumulación ocurre en una relación inversa con $\Delta\Psi_m$, donde un $\Delta\Psi_m$ más negativo o polarizado resulta en una mayor acumulación del fluoróforo y viceversa.

Para lograr resultados óptimos, es esencial adherirse meticulosamente a las especificaciones técnicas e implementar medidas de control al utilizar estos fluoróforos. Esto garantiza una interpretación adecuada del comportamiento del fluoróforo en relación con $\Delta\Psi_m$. Sin embargo, los fluoróforos existentes para la detección de $\Delta\Psi_m$ aún presentan ciertas limitaciones y restricciones. Estas incluyen la vulnerabilidad a interferencias, desafíos para lograr una detección cuantificable y fluctuaciones en las señales de fluorescencia debido a diversos factores, como cambios en la concentración del fluoróforo, desplazamientos en el potencial de membrana o estrés celular.

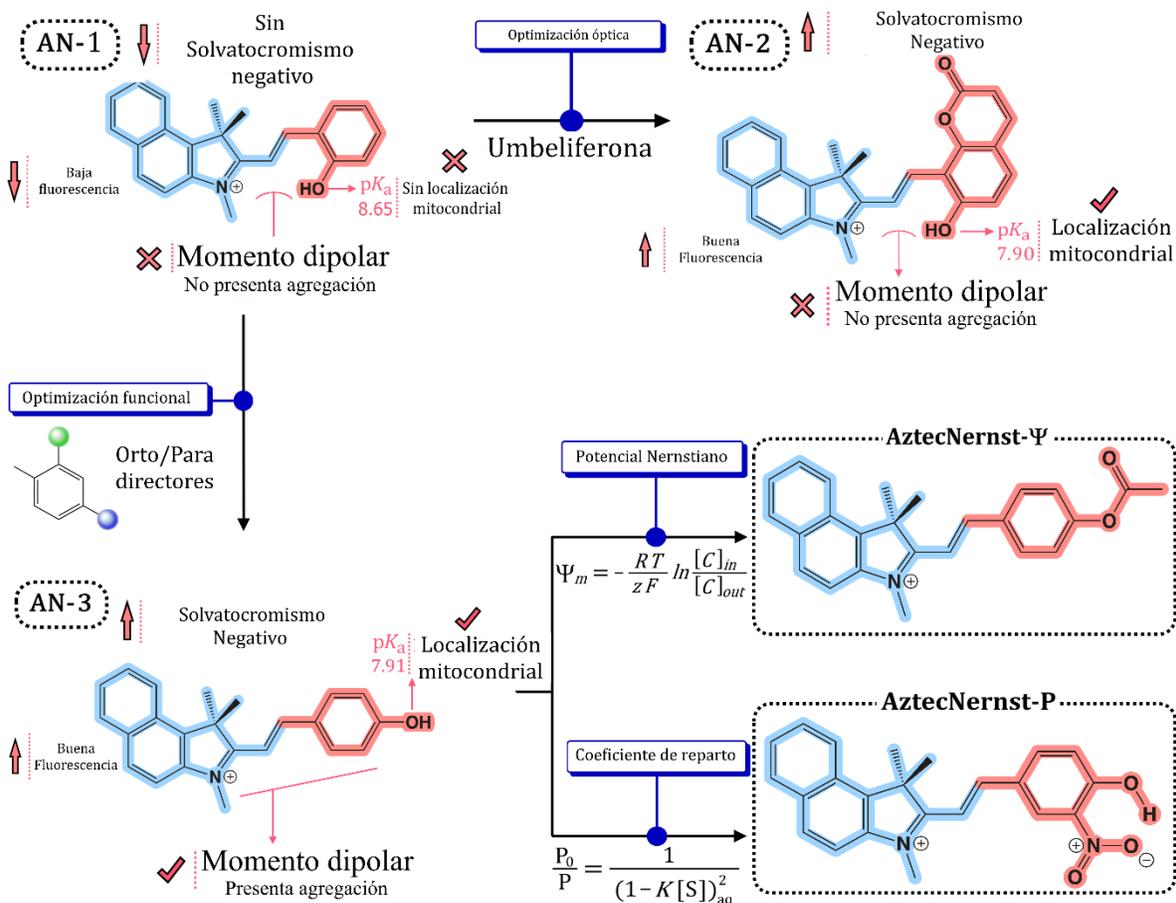
La retención mitocondrial mediante el uso de funciones hidrolizables, como ésteres o agentes enmascarantes (como derivados de fenchona, carvona y borneol), se ha implementado para resolver el problema nernstiano. Esto implica que cuando las células se cargan con fluoróforos nernstianos que presentan una función hidrolizable, la membrana mitocondrial se vuelve permeable. Luego, a medida que el fluoróforo se acumula en la matriz mitocondrial, las enzimas esterasas tienen el potencial de hidrolizarlos, permitiendo su retención dentro del organelo al neutralizar la carga del fluoróforo.

A pesar de que el mecanismo de retención mitocondrial es una opción viable para fines de microscopia de imágenes, sigue siendo problemático, ya que muchas de las funciones hidrolizables, como los ésteres acetoximetílicos (AM), son excepcionalmente inestables o lábiles. En consecuencia, una parte significativa de los colorantes hidrolizados (neutros en carga) termina localizándose fuera de las mitocondrias o en el citoplasma.

Similar al mecanismo del potencial nernstiano bien establecido y comúnmente empleado para la orientación mitocondrial, en el cual el potencial de membrana guía la localización mitocondrial a través de interacciones electrostáticas, planteamos la hipótesis de que la distribución de equilibrio entre dos fases inmiscibles, representadas por el citosol y las membranas hidrofóbicas, podría optimizar el mecanismo impulsor para la acumulación de la sonda molecular dentro de la membrana mitocondrial, la llamada 'ley de distribución de Nernst' (29). Esta acumulación ocurriría a través de un escenario que implica el reparto de monómeros en la fase altamente lipofílica y la autoasociación o agregación molecular en la fase acuosa, y que sigue la ecuación escrita en el Esquema 5.1 (recuadro de AztecNernst-P) para un equilibrio determinado por la constante el coeficiente de reparto o partición, P .

Por lo tanto, aquí presentamos el primer enfoque de química de fluoróforos para avanzar en el monitoreo de la dinámica mitocondrial mediante el uso de una ley de partición nernstiana que funciona simultáneamente con los mecanismos de orientación y retención del potencial nernstiano, como se muestra en la Imagen 5.1. El coeficiente de partición nernstiano dentro de la membrana mitocondrial se define como la constante de equilibrio que rige la distribución de especies entre la fase lipofílica

(membrana-matriz mitocondrial) y la fase citosólica adyacente. Para ilustrar el concepto de partición de autoasociación, aplicamos el formalismo detallado por K. A. Connors (29).



Esquema 5.1. Propuesta *AztecNernst* para localización mitocondrial comparando la respuesta a potencial vs. agregación.

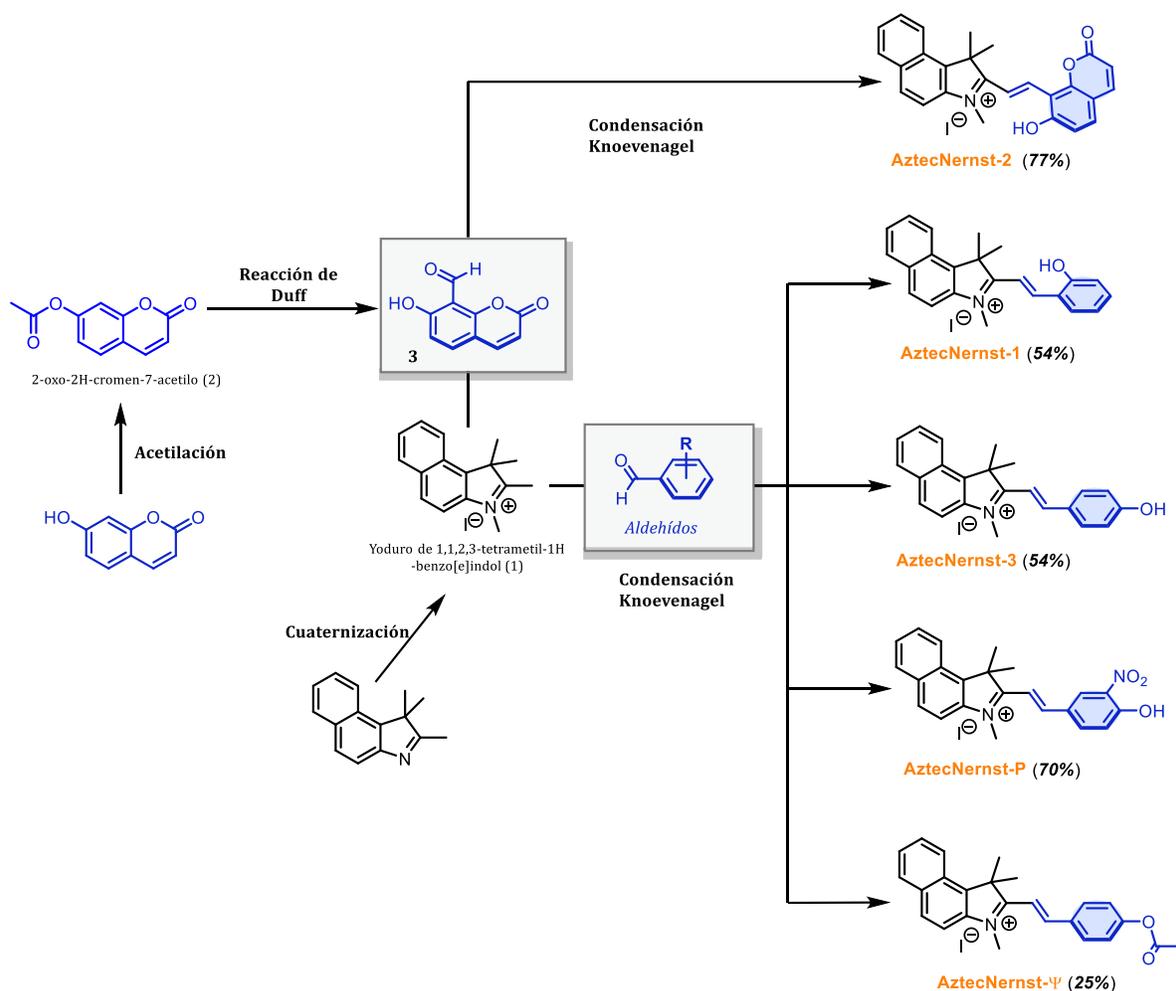
Así, se sintetizaron las sondas fluorescentes derivadas del benz[e]indolinio, denominadas **AztecNernst-P** y **AztecNernst-Ψ** (Esquema 5.2), con el objetivo de mejorar su rendimiento bioanalítico para la orientación mitocondrial. Por lo tanto, fue crucial ajustar cuidadosamente el comportamiento de agregación de las sondas. El esqueleto de benz[e]indolinio se eligió debido a su equilibrio catiónico-hidrofóbico adecuado para teñir las mitocondrias. Además, sus propiedades dieléctricas se mejoran cuando se expanden con sistemas longitudinales π , lo que resulta en el desarrollo de

propiedades de agregación atribuidas al acoplamiento Coulómbico (Hestand & Spano, 2018).. En efecto, el modelo de estados esenciales propuesto por Painelli (31), describe la agregación de un cromóforo no solo por transferencia de carga (intramolecular) sino también por el acoplamiento Coulómbico intermolecular derivado de momentos dipolares significativos.

Es importante de resaltar que la arquitectura molecular de los **AztecNernst** puede mostrar un desplazamiento hipsocrómico en su máximo de emisión con el aumento de la polaridad del solvente, es decir, un solvocromismo negativo. El solvocromismo negativo es una propiedad beneficiosa para llevar a cabo bioimagen y análisis de membranas hidrofóbicas en entornos acuosos, ya que provoca un desplazamiento espectral hacia longitudes de onda más largas (batocrómico) en entornos lipídicos y no polares.

5.2 SÍNTESIS DE LA FAMILIA AZTECNERNST

Todas las sondas pertenecientes a la familia AztecNernst contienen en su estructura un núcleo de benz[e]indolinio y uno de fenol funcionalizado unidos mediante un doble enlace, a excepción de AztecNernst-2, donde se intercambié el núcleo de fenol por el de 7-hidroxicumarina, Esquema 5.2. El yoduro de 1,1,2,3-tetrametil-1*H*-benzo[e]indol (1) se sintetizó mediante una reacción de cuaternización del 1,1,2,3-tetrametil-1*H*-benzo[e]indol comercial, como se describe en la sección 4.1.1. Para la obtención de 7-hidroxi-2-oxo-2*H*-cromeno-8-carbaldehído (3) se partió de la 7-hidroxicumarina, también conocida como umbeliferona, para realizar la formilación en la posición 8 del núcleo de cumarina fue necesario realizar una reacción de Duff, como se describe en el apartado 4.1.3. Sin embargo, para poder llevar a cabo exitosamente esta reacción, primero fue necesario proteger el grupo hidroxilo en la posición 7, la protección se logró realizando una acetilación, sección 4.1.2. La nitración del 4-hidroxibenzaldehído en la posición 3 se llevó a cabo de manera efectiva utilizando la mezcla ácido nítrico/ácido acético. 10 ml de ácido acético glacial a temperatura ambiente, como se describe en la sección 4.1.4



Esquema 5.2. Ruta de síntesis planteada para la obtención de la familia de sondas fluorescentes AztecNernst.

En la síntesis de todos los compuestos finales se llevó a cabo una condensación tipo Knoevenagel, sección 4.1.5-4.1.9. Vale la pena mencionar que para esta reacción no se utilizaron instrumentos de eliminación de agua. Los rendimientos obtenidos para las sondas AztecNernst-1 a 3 son bastante buenos (54-77%). Sin embargo, el rendimiento para AztecNernst-P, obtenido bajo las condiciones descritas para AztecNernst-1 a 3 fueron muy bajas. Se hipotetizó que la presencia del grupo nitro en el benzaldehído disminuye la reactividad del aldehído. Con base en esto para aumentar el carácter electrofílico del carbonilo se añadió piperidina como catalizador. Esto solucionó el problema y se obtuvo AztecNernst-P con un buen rendimiento (70%). Para la obtención

de AztecNernst- ψ se diseñó una ruta de síntesis que consistía en la protección del p-hidroxibenzaldehído utilizando anhídrido acético en DCM como disolvente y con 0.1 Eq de piridina como catalizador. Posteriormente se llevaría a cabo la condensación tipo Knoevenagel con el compuesto (1) para obtener el compuesto final. Sin embargo, esta metodología no fue factible, a pesar de que se intentó variando las condiciones de reacción, el éster se hidrolizaba por lo que no fue posible obtener el compuesto siguiendo esta metodología. Para solucionar este problema se propuso llevar a cabo una reacción multicomponente, donde la acetilación del hidroxilo y la condensación sucederían bajo las mismas condiciones de reacción. Esta metodología permitió la obtención del producto deseado, aunque en un rendimiento bajo.

5.3 CARACTERIZACIÓN

5.3.1 Caracterización de yoduro-1,1,2,3-tetrametil-1*H* benzo[*e*]indol (1)

Para la obtención del compuesto 1 se llevó a cabo una reacción de cuaternización del 1,1,2-trimetil-1*H*-benzo[*e*]-indol, bajo las condiciones que se describen en la sección 4.2.1. Debido a que el intermediario (1) ya ha sido reportado, su caracterización se realizó exclusivamente por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C . El análisis de las señales de los espectros se muestra enseguida. Para el espectro de ^1H -RMN la señal con desplazamiento en 1,75 ppm presenta multiplicidad de singulete, integra para seis hidrógenos, los cuales corresponden a los hidrógenos de los dos metilos situados en la posición 1 del anillo de benzoindolinio. Los hidrógenos correspondientes al metilo presente en la posición 2 del anillo, también poseen una multiplicidad de singulete, debido a que no se acoplan con otros hidrógenos, y se encuentra a 2,89 ppm, ya que, al estar más cerca al nitrógeno con carga positiva se encuentran más desplazados. La señal con multiplicidad singulete que aparece a 4,08 ppm integra para tres, por lo que corresponde a los hidrógenos del grupo metilo unido al nitrógeno del anillo, su gran desplazamiento se debe a que el nitrógeno está retirando mucha densidad electrónica

de estos hidrógenos, lo que los desprotege y provoca que aparezca a mayores desplazamientos. En la región de los hidrógenos aromáticos se puede observar la presencia de 6 señales, las cuales corresponden a los 6 hidrógenos del benzoindolinio. La señal que aparece a 8,37 ppm presenta una multiplicidad de doblete, integra para uno y presenta una constante de acoplamiento de 8,1 Hz. Por otro lado, tenemos una señal con multiplicidad de triplete que aparece a 7,79 ppm, también integra para uno, y su constante de acoplamiento es de 8,1 Hz, se concluye que estas señales corresponden a los hidrógenos en las posiciones 9 y 8, respectivamente. La señal que aparece a 7,71 ppm tiene multiplicidad de triplete e integra para uno, con base en su multiplicidad solo puede corresponder al hidrógeno de la posición 7 del anillo. El doblete que aparece a 8,22 ppm corresponde al hidrógeno de la posición 6, el cual se encuentra acoplado con el hidrógeno de la posición 7 con una constante de aproximadamente 7,8 Hz. Finalmente contamos con las señales en forma de doblete que aparecen a 8,30 y 8,12, las cuales están acopladas entre sí, por lo que corresponden a los hidrógenos en la posición 5 y 4, respectivamente.

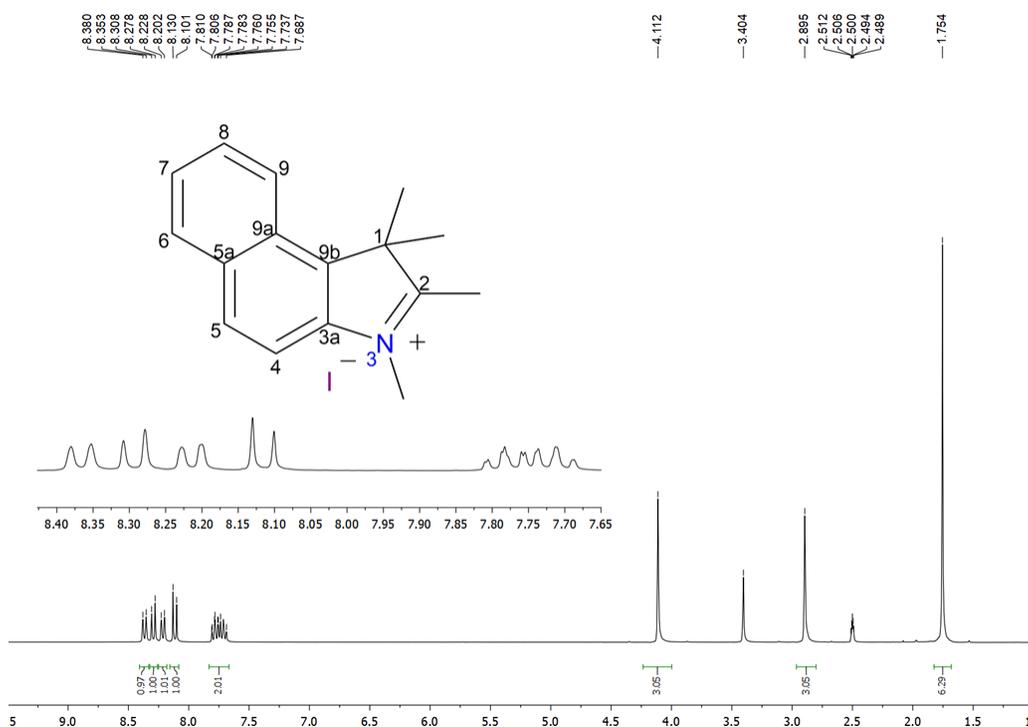


Figura 5.1. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de yoduro-1,1,2,3-tetrametil-1H-benzo[e]indol obtenido de un equipo de 300 MHz en CD_3SOCD_3 .

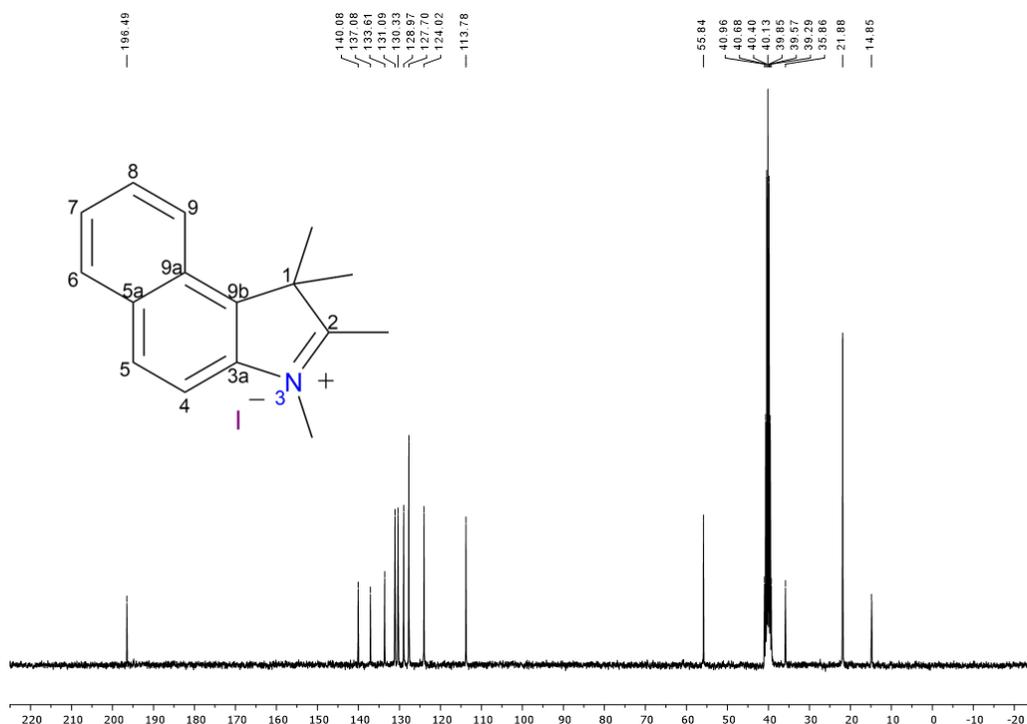


Figura 5.2. Espectro de ^{13}C -RMN de yoduro-1,1,2,3-tetrametil-1H-benzo[e]indol obtenido de un equipo de 75 MHz en CD_3SOCD_3 .

En el espectro de ^{13}C -RMN, encontramos la presencia de 14 carbonos distintos, los cuales corresponden a los 16 carbonos presentes en la molécula, ya que cuenta con carbonos equivalentes. La señal que aparece desplazada a 196,49 ppm corresponde al carbono 2 del anillo de benzoindolinio, debido a que es un carbono aromático unido a un nitrógeno cuaternario, se desplaza a campo bajo. Los carbonos aromáticos se encuentran entre 140,0 y 113,78 ppm. La molécula 1 presenta 10 carbonos aromáticos, sin embargo, en el espectro solo aparecen 9 carbonos, esto debido a que los carbonos en la posición 7 y 9 son magnéticamente equivalentes y ambos aparecen a 130,33 ppm. El carbono que aparece desplazado a 14,85 ppm corresponde al del metilo unido al carbono 2. Mientras que los carbonos de los metilos unidos al carbono 1, son magnéticamente iguales, por lo que ambos aparecen en una misma señal a 21,88 ppm. La señal que aparece a 35,86 ppm es un carbono alifático, por lo que corresponde al carbono 1 del anillo. Finalmente, la señal en 55,84 ppm corresponde al carbono del metilo unido en la posición 3 del sistema, el cual aparece más desplazado que un metilo

común debido a que se encuentra más desprotegido al estar unido directamente a un nitrógeno cuaternario.

5.3.2 Caracterización de 2-oxo-2H-cromen-7-acetilo (2)

La protección de la 7-hidroxicumarina se llevó a cabo como se menciona en el apartado 4.2.2. Debido a que el intermediario (2) ya ha sido reportado, su caracterización se realizó exclusivamente por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C . El análisis de las señales se muestra enseguida. Para el espectro de ^1H -RMN la señal con desplazamiento de 2,33 ppm con multiplicidad de singulete e integral de 3, corresponde a los hidrógenos del metilo del acetato. Todos los demás hidrógenos presentes en la molécula pertenecen a un sistema aromático, Para el espectro de ^1H -RMN, las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos aparecen entre 7,70 y 6,39 ppm.

La señal que se observa en 6,39 ppm presenta una multiplicidad de doblete, e integra para un hidrógeno. Debido a que es el hidrógeno más desplazado hacia campo alto, se concluye que pertenece al hidrógeno de la posición 3 del núcleo de cumarina. Posee una constante de acoplamiento de 9,6 Hz, y debido a que debe estar acoplado al hidrógeno vecino, se puede concluir que la señal para el hidrógeno 4 se encuentra a 7,70 ppm, ya que comparten la misma constante de acoplamiento. Por otro lado, la señal que se encuentra a 7,04 muestra una multiplicidad de doble de dobles, lo que indica se está acoplando a dos hidrógenos con distinta constante. El único hidrógeno que puede mostrar esta multiplicidad corresponde al de la posición 6. La constante de acoplamiento mayor de esta señal es de 8,4 Hz, la cual debe corresponder al acoplamiento con el hidrógeno de la posición 5, por lo que la señal para este corresponde al doblete que se encuentra a 7,48 ppm. La constante de acoplamiento más pequeña del hidrógeno 6 corresponde a su acoplamiento con el hidrógeno de la posición 8, cuya señal presenta multiplicidad de doblete y aparece a 7,11 ppm.

En el espectro de ^{13}C -RMN, la señal que aparece a 160,34 ppm corresponde al carbonilo del núcleo de cumarina. Los carbonos aromáticos aparecen entre, 154,67 y 110,45 ppm. Las señales que nos indican que la reacción de protección se llevó a cabo son la que

aparece a 168,72 ppm, la cual corresponde al carbonilo del acetato, y la señal en 21,10 ppm al metilo de este.

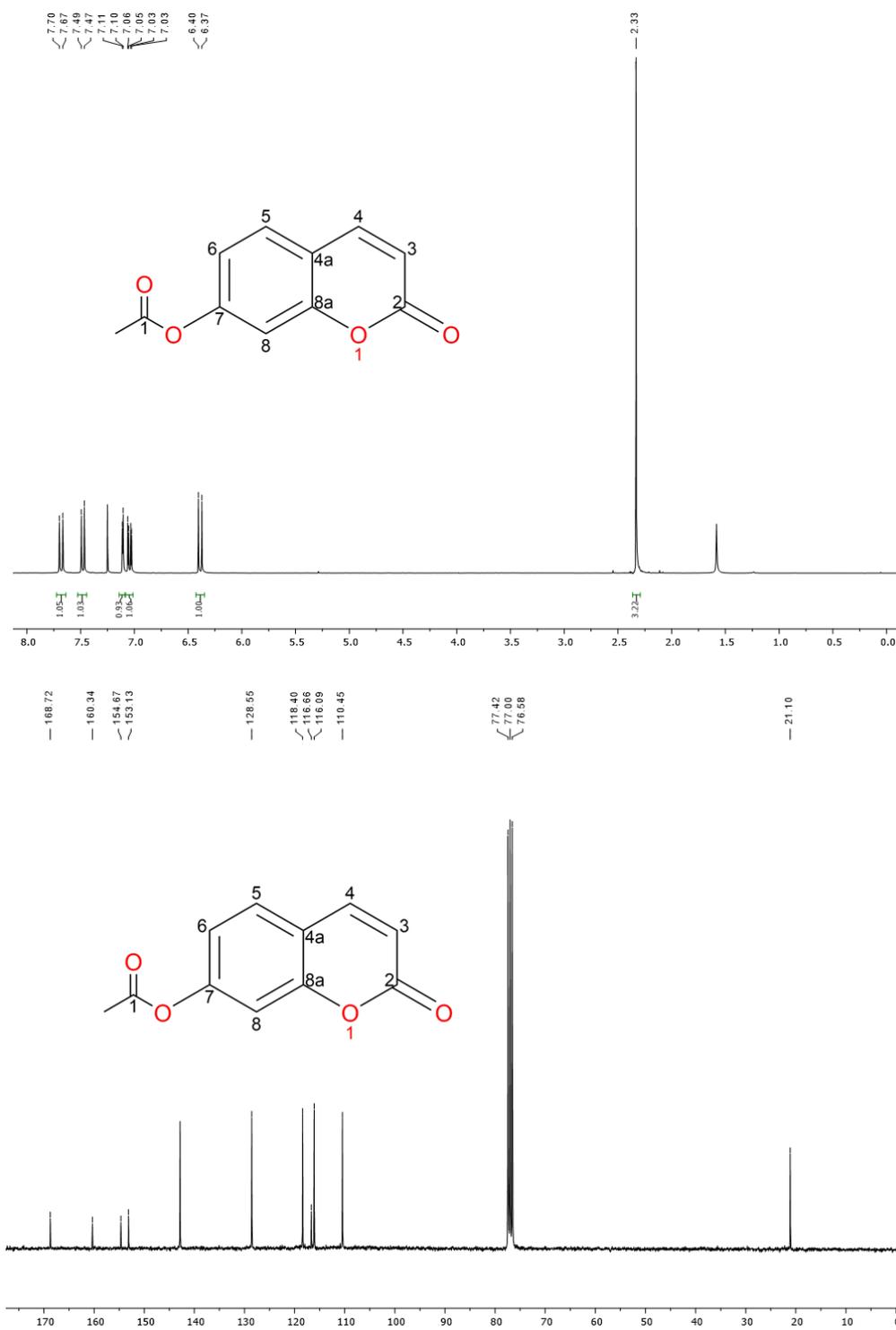


Figura 5.3. Espectros de $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ de 2-oxo-2H-cromen-7-acetilo obtenido en CDCl_3 de un equipo de 300 MHz y 75 MHz, respectivamente.

5.3.3 Caracterización de 7-hidroxi-2-oxo-2H-cromeno-8-carbaldehído (3)

Para la formilación en la posición orto al aldehído se llevó a cabo la reacción de Duff como se describe en el apartado 4.2.3. Dado que el intermediario (3) ya ha sido reportado, su caracterización se realizó exclusivamente por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C . El análisis de las señales se muestra enseguida. Para el espectro de ^1H -RMN las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos aparecen entre 7,65 y 6,32 ppm. La señal que se observa en 6,32 ppm presenta una multiplicidad de doblete, e integra para un hidrógeno. Debido a que es el hidrógeno más desplazado hacia campo alto, se concluye que pertenece al hidrógeno de la posición 3 del núcleo de cumarina. Posee una constante de acoplamiento de 9,6 Hz, y debido a que debe estar acoplado al hidrógeno vecino, se puede concluir que la señal para el hidrógeno 4 se encuentra a 7,65 ppm, ya que comparten la misma constante de acoplamiento.

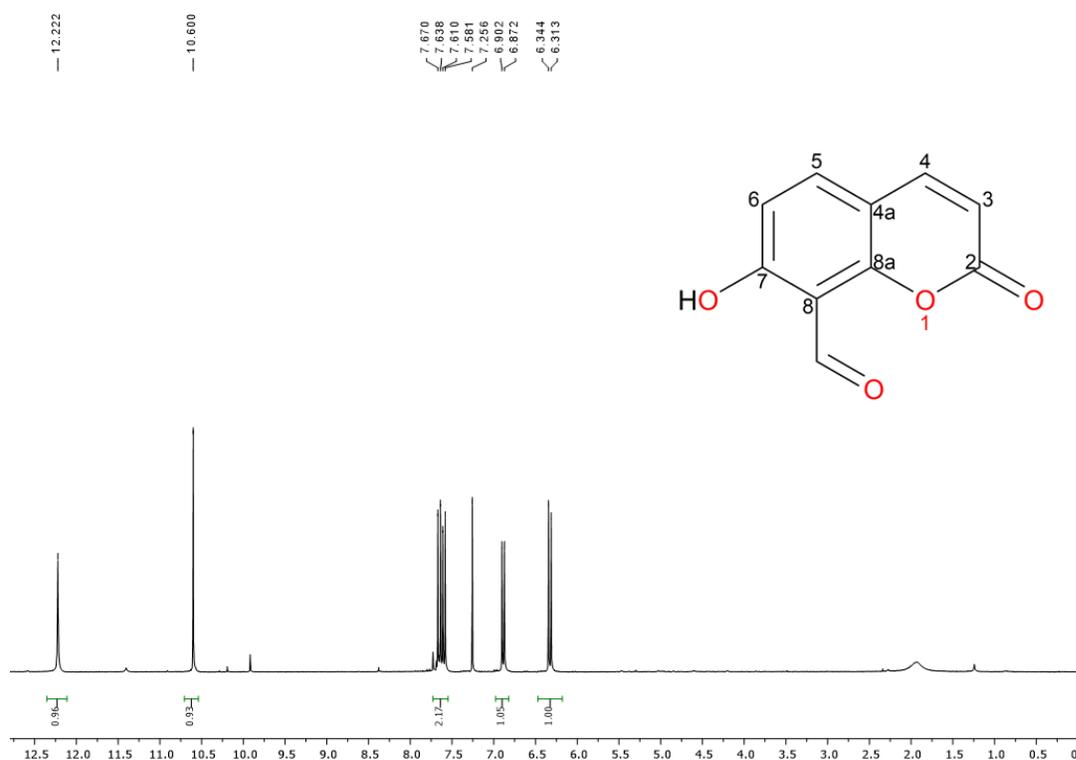


Figura 5.4. Espectro de ^1H -RMN de 7-hidroxi-2-oxo-2H-cromeno-8-carbaldehído obtenido en CDCl_3 de un equipo de 300 MHz.

Por otro lado, la señal que se encuentra a 6,88 ppm también muestra una multiplicidad de doblete lo que indica que solo acopla a un hidrógeno, esta señal comparte constante de acoplamiento 8,9 Hz con el doblete que se encuentra a 7,59 ppm, con esto se concluye que estas señales pertenecen a los hidrógenos de la posición 6 y 5, respectivamente. El singulete que aparece a 12,22 ppm nos confirma que la formilación se llevó a cabo ya que corresponde al hidrógeno del formilo. Además, la desprotección también ocurrió bajo las mismas condiciones debido a que aparece la señal del hidroxilo a 10,60 ppm. En el espectro de ^{13}C -RMN podemos observar la presencia de 10 señales, las cuales corresponden a los 10 carbonos presentes en la molécula. A 192,22 ppm aparece el carbono del formilo, mientras que a 165,47 ppm se encuentra el carbono del núcleo de cumarina unido al hidroxilo. La siguiente señal, 159,11 ppm corresponde al carbonilo de la cumarina. Los demás carbonos de la molécula aparecen a desplazamiento entre 143 y 108 ppm. Figura X.

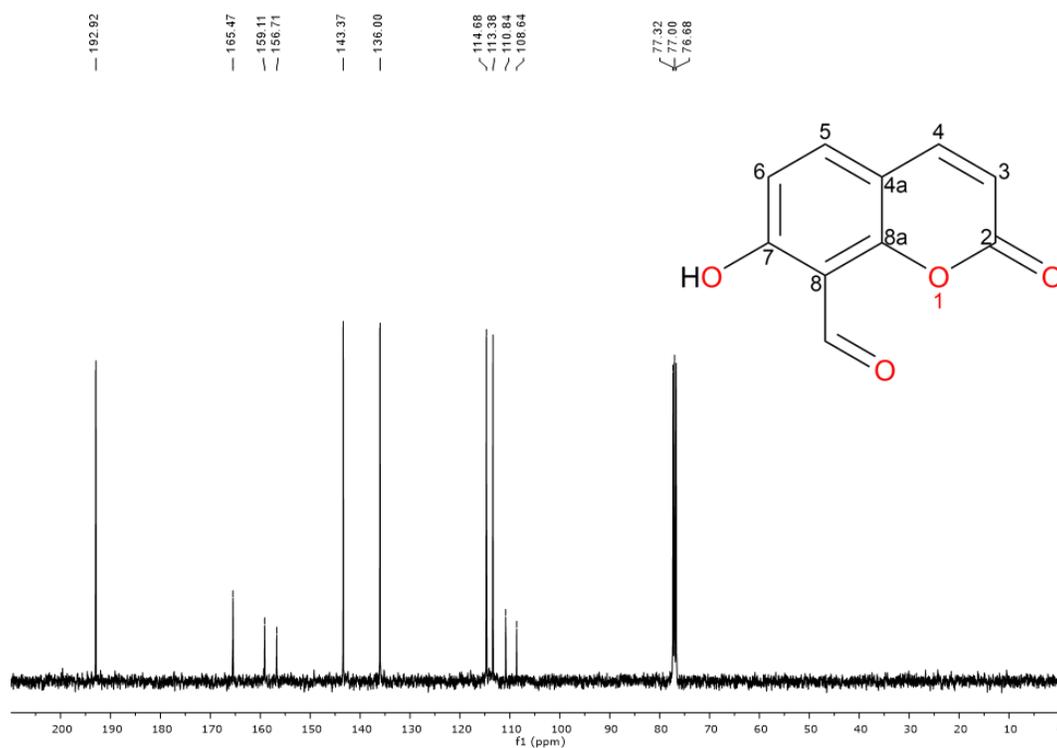


Figura 5.5. Espectro de ^{13}C -RMN de 7-hidroxi-2-oxo-2H-cromeno-8-carbaldehído obtenido en CDCl_3 de un equipo de 75 MHz.

5.3.5 Caracterización de AztecNernst-1

La síntesis de la sonda **AztecNernst-1** se llevó a cabo mediante una condensación tipo Knoevenagel como se describe en el apartado 4.2.5. Su caracterización se realizó mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , análisis de masas e infrarrojo (IR). IR (ATR, cm^{-1}): 3300, 3123, 1592, 1251. El análisis de masas fue obtenido mediante la técnica ESI-TOF. Calculado $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{NO}$: 328.17014. Encontrado: 328.16944 (2.13 ppm).

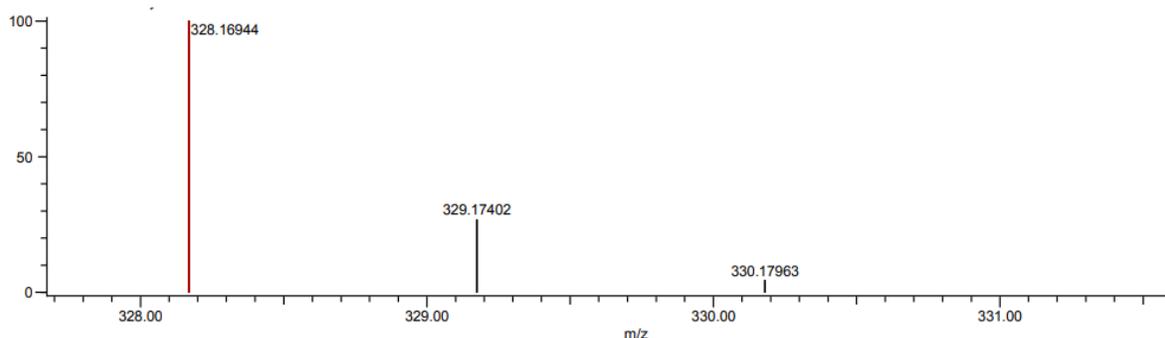


Figura 5.6. Análisis por espectrometría de masas DART+ de AztecNernst-1

Para el espectro de ^1H -RMN la señal con desplazamiento en 1,99 ppm presenta multiplicidad de singulete, integra para seis hidrógenos, los cuales corresponden a los hidrógenos de los dos metilos situados en la posición 1 del anillo de benzoindolinio. La señal con multiplicidad de singulete que aparece a 4,22 ppm integra para tres, por lo que corresponde a los hidrógenos del grupo metilo unido al nitrógeno del anillo, su gran desplazamiento se debe a que el nitrógeno está retirando mucha densidad electrónica de estos hidrógenos, lo que los desprotege y provoca que aparezca a mayores desplazamientos. La señal que aparece a 8,59 ppm con multiplicidad de doblete, integra para uno y presenta una constante de acoplamiento de 16,6 Hz, el valor de la constante indica que corresponde al hidrógeno que está formando el doble enlace entre ambos núcleos. La señal que corresponde al otro hidrógeno del doble enlace se encuentra a 7,75 ppm. Tomando como referencia los valores obtenidos para el compuesto (1), la señal con multiplicidad de doblete en 8,45 ppm, integra para uno y corresponde al hidrógeno de la posición 9. Las señales para los hidrógenos 7 y 8 están en el multiplete

que aparece a 7,83-7,69 ppm. El doblete que aparece a 8,22 ppm corresponde al hidrógeno de la posición 6. Las señales con multiplicidad de doblete que aparecen a 8,30 y 8,12, las cuales están acopladas entre sí, corresponden a los hidrógenos en la posición 5 y 4. Las señales que aparecen a 8,17, 7,48, 7,06 y 7,01 ppm corresponden a los hidrógenos del núcleo de fenol. El singulete a 11,05 ppm corresponde al hidroxilo.

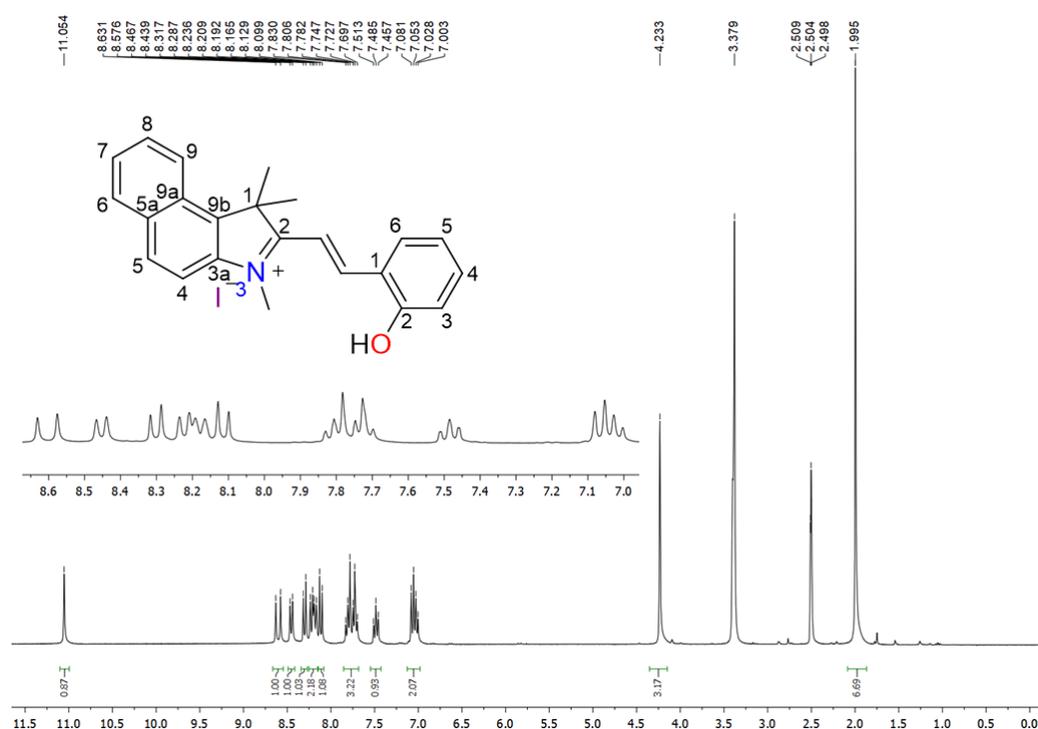


Figura 5.7. Espectro de ^1H -RMN de AztecNerst-1 obtenido de un equipo de 300 MHz en CD_3SOCD_3 .

En el espectro de ^{13}C -RMN se observan 22 señales que corresponden a los 23 carbonos presentes en **AztecNerst-1**, debido a que los carbonos de los metilos en la posición 1 del núcleo de benzoindolinio son magnéticamente equivalentes. La señal a 183,19 ppm pertenece al carbono 2 del núcleo de benzoindol, esta señal aparece campo abajo debido a que se encuentra muy desprotegido por el efecto electroattractor del nitrógeno cuaternario. La siguiente señal, a 159,37 ppm, corresponde al carbono 2 del fenol. El carbono del metilo unido al nitrógeno se encuentra muy desplazado, a 54,06 ppm, por la razón explicada anteriormente. El único carbono del núcleo de benzoindolinio que no es aromático se encuentra un desplazamiento de 35,47 ppm y corresponde al carbono

1. Por último, la señal que aparece en 26,32 ppm representa los dos carbonos de los metilos unidos al carbono 1 del benzoindolinio. El resto de los carbonos se encuentran en la región de los aromáticos, conforme lo esperado.

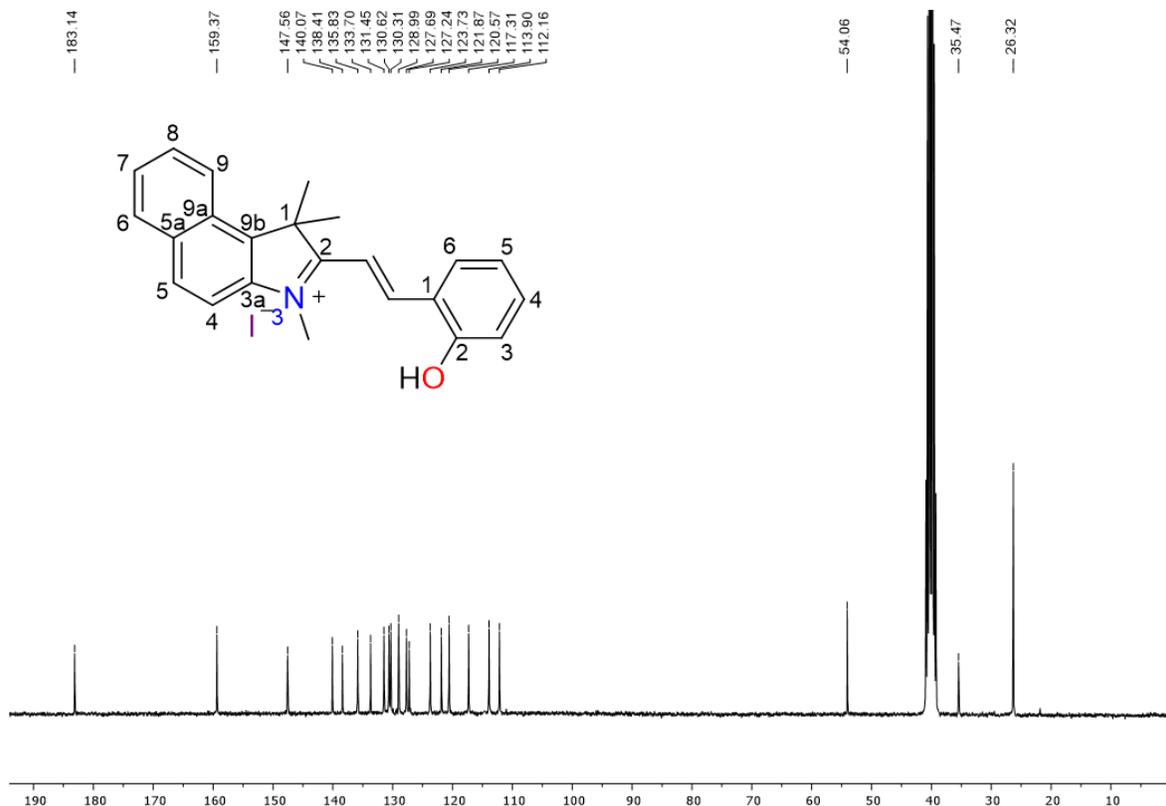


Figura 5.8. Espectro de ¹³C-RMN de AztecNerst-1 obtenido de un equipo de 75 MHz en CD₃SOCD₃.

5.3.6 Caracterización de AztecNerst-2

La síntesis de la sonda **AztecNerst-2** se llevó a cabo mediante una condensación tipo Knoevenagel como se describe en el apartado 4.2.6. Su caracterización se realizó mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C, análisis de masas e infrarrojo (IR). IR (ATR, cm⁻¹): 3447, 1727, 1661, 1520, 1472, 1404, 1349, 1260, 1020. El análisis de masas fue obtenido mediante la técnica ESI-TOF. Calculado C₂₆H₂₂N₃O₃: 396.15997. Encontrado: 396.15930 (1.68 ppm).

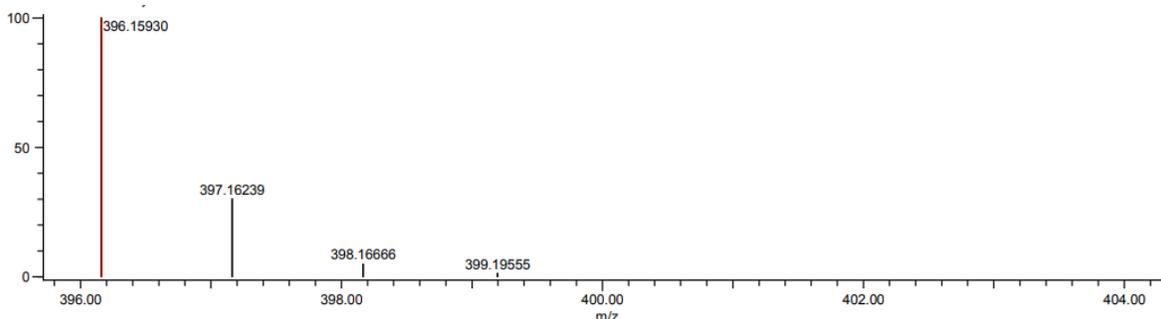


Figura 5.9. Análisis por espectrometría de masas DART⁺ de AztecNernst-2

Para el espectro de ¹H-RMN la señal con desplazamiento en 2,02 ppm presenta multiplicidad de singulete, integra para seis hidrógenos, los cuales corresponden a los hidrógenos de los dos metilos situados en la posición 1 del anillo de benzoindolinio. La señal con multiplicidad de singulete que aparece a 4,18 ppm integra para tres, por lo que corresponde a los hidrógenos del grupo metilo unido al nitrógeno del anillo, su gran desplazamiento se debe a que el nitrógeno está retirando mucha densidad electrónica de estos hidrógenos, lo que los desprotege y provoca que aparezca a mayores desplazamientos. La señal que aparece a 8,60 ppm con multiplicidad de doblete, integra para uno y presenta una constante de acoplamiento de 16,7 Hz, el valor de la constante indica que corresponde al hidrógeno que está formando el doble enlace entre ambos núcleos. La señal que corresponde al otro hidrógeno del doble enlace es un doblete está escondido entre las demás señales, pero se corresponde a las señales que aparecen a 8,168 y 8,113 ppm. Tomando como referencia los valores obtenidos para el compuesto (1), la señal con multiplicidad de doblete en 8,51 ppm, integra para uno y corresponde al hidrógeno de la posición 9. Las señales para los hidrógenos 7 y 8 están en el multiplete que aparece a 7,81-7,70 ppm. El doblete que aparece a 8,22 ppm corresponde al hidrógeno de la posición 6. Las señales con multiplicidad de doblete que aparecen a 8,31 y 8,12, las cuales están acopladas entre sí, corresponden a los hidrógenos en la posición 5 y 4. A 8,08 ppm se observa una señal con multiplicidad de doblete, la cual por su constante se deduce está acoplada al doblete que aparece a 6,42 ppm, estas señales corresponden a los hidrógenos de los carbonos 2 y 4 del núcleo de cumarina. Finalmente, las señales con multiplicidad de doblete que están acopladas entre sí y se

encuentran a 7,81 y 7,07 ppm corresponden a los hidrógenos en la posición 6 y 5 del núcleo de cumarina. En este caso la señal correspondiente al hidroxilo no apareció en el espectro, esto se puede deber al intercambio Hidrógeno-Deuterio.

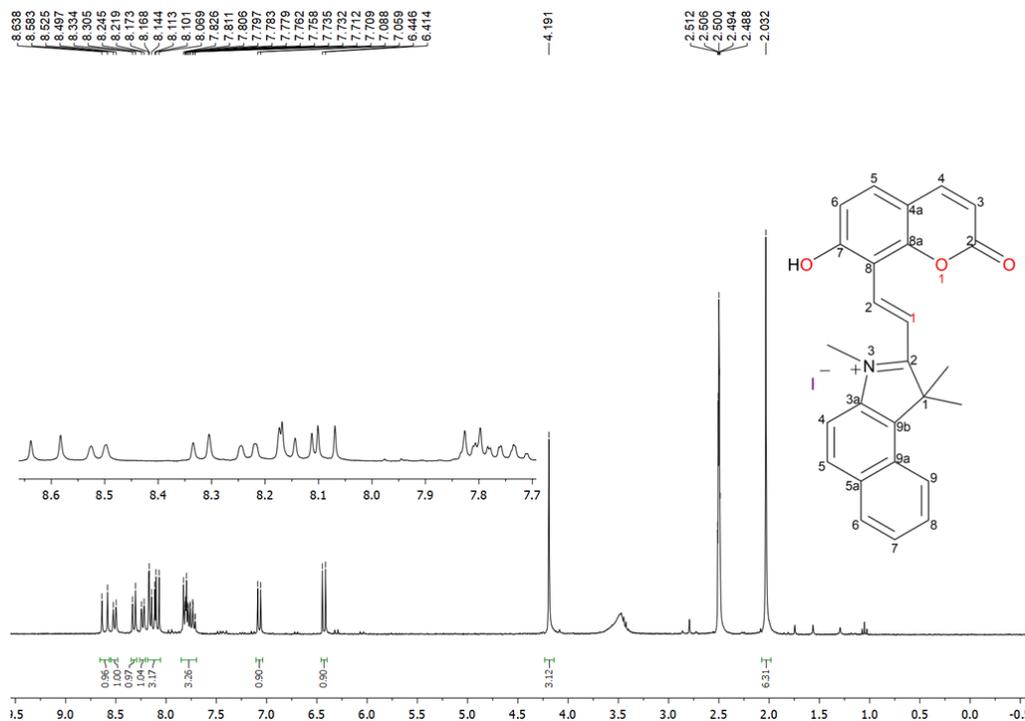


Figura 5.10. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de AztecNernst-2 obtenido de un equipo de 300 MHz en CD_3SOCD_3

Para el espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ se observaron 25 señales esperadas que corresponden a los 26 carbonos de la molécula, ya que los metilos en el carbono 1 del núcleo de benzoindolinio son magnéticamente equivalentes. La señal que aparece a 182,93 ppm corresponde al carbono 2 del núcleo de benzoindolinio. La siguiente señal se encuentra a un desplazamiento de 162,05 ppm y corresponde al carbono 2 del núcleo de cumarina. Las demás señales corresponden al resto de los carbonos presentes en la molécula.

Para el espectro de ^1H -RMN la señal con desplazamiento en 2,00 ppm presenta multiplicidad de singulete, integra para seis hidrógenos, los cuales corresponden a los hidrógenos de los dos metilos situados en la posición 1 del anillo de benzoindolinio. La señal con multiplicidad de singulete que aparece a 4,21 ppm integra para tres, por lo que corresponde a los hidrógenos del grupo metilo unido al nitrógeno del anillo, su gran desplazamiento se debe a que el nitrógeno está retirando mucha densidad electrónica de estos hidrógenos, lo que los desprotege y provoca que aparezca a mayores desplazamientos. La señal que aparece a 8,54 ppm con multiplicidad de doblete, integra para uno y presenta una constante de acoplamiento de 16,3 Hz, el valor de la constante indica que corresponde al hidrógeno que está formando el doble enlace entre ambos núcleos. La señal que corresponde al otro hidrógeno del doble enlace se encuentra a 7,50 ppm. A 8,40 ppm se encuentra una señal con multiplicidad de doblete, integra para uno y corresponde al hidrógeno de la posición 9. Las señales que aparecen a 7,70 y 7,79 presentan multiplicidad de triplete. Los únicos hidrógenos que pueden presentar esta multiplicidad se encuentran en la posición 7 y 8 del núcleo de benzoindolinio. La señal con multiplicidad de doblete que aparece a 8,20 ppm corresponde al hidrógeno de la posición 6. Los dobletes que aparecen a 8,27 y 8,07 ppm, están acopladas entre sí, por lo que corresponden a los hidrógenos en la posición 5 y 4. A 8,14 ppm aparece un doblete que integra para 2 hidrógenos y están acoplados a los hidrógenos que aparecen con una multiplicidad de doblete a un desplazamiento de 6,68 ppm, la cual también integra para dos, por lo tanto, estas señales corresponden a los hidrógenos del núcleo de fenol. En este caso la señal correspondiente al hidroxilo no apareció en el espectro, esto se puede deber al intercambio Hidrógeno-Deuterio que sucede.

En el espectro de ^{13}C -RMN se observan 20 señales que corresponden a los 23 carbonos presentes en **AztecNernst-3**, debido a que los carbonos de los metilos en la posición 1 del núcleo de benzoindolinio, 6 y 2, 5 y 3 del núcleo de fenol son magnéticamente equivalentes. La señal a 182,79 ppm pertenece al carbono 2 del núcleo de benzoindol, esta señal aparece campo abajo debido a que se encuentra muy desprotegido por el efecto electroatractor del nitrógeno cuaternario. La siguiente señal, a 163,44 ppm, corresponde al carbono 1 del fenol. El carbono del metilo unido al nitrógeno se

encuentra muy desplazado, a 53,95 ppm, por la razón explicada anteriormente. El único carbono del núcleo de benzoindolinio que no es aromático se encuentra un desplazamiento de 35,09 ppm y corresponde al carbono 1. Por último, la señal que aparece en 25,95 ppm representa los dos carbonos de los metilos unidos al carbono 1 del benzoindolinio. El resto de los carbonos se encuentran en la región de los aromáticos, conforme lo esperado.

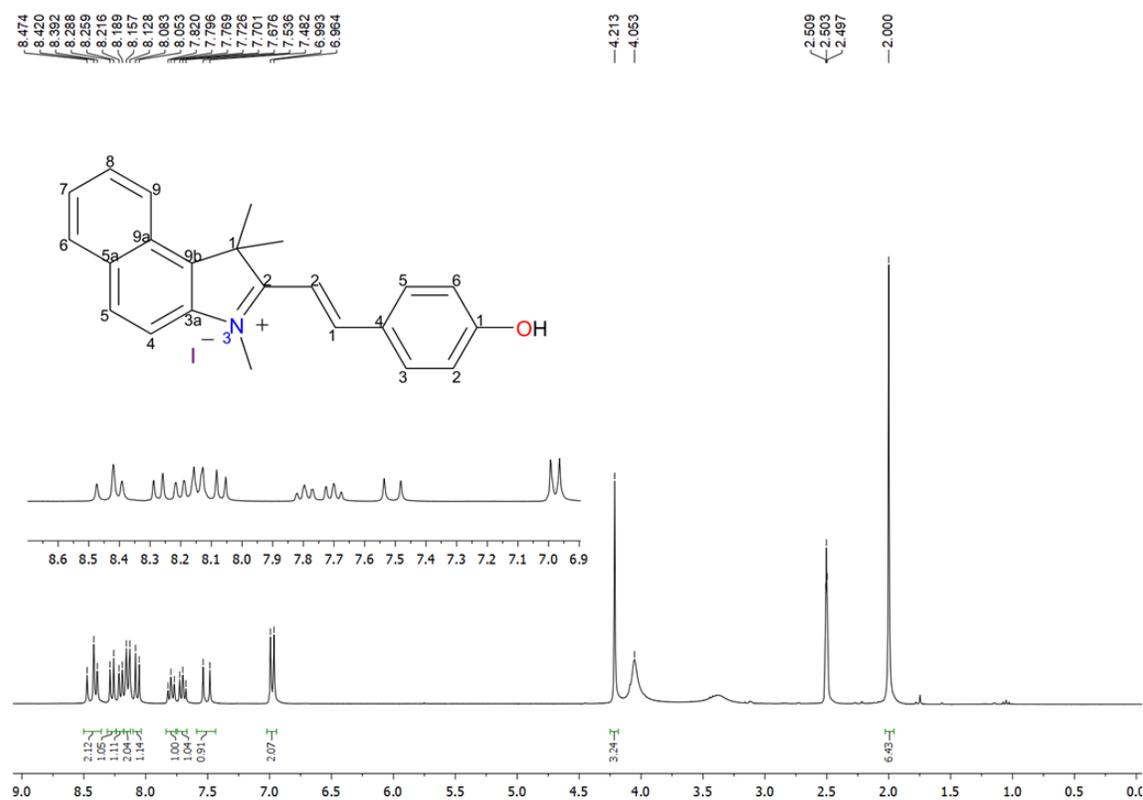


Figura 5.13. Espectro de ¹H-RMN de AztecNernst-3 obtenido de un equipo de 300 MHz en CD₃SOCD₃

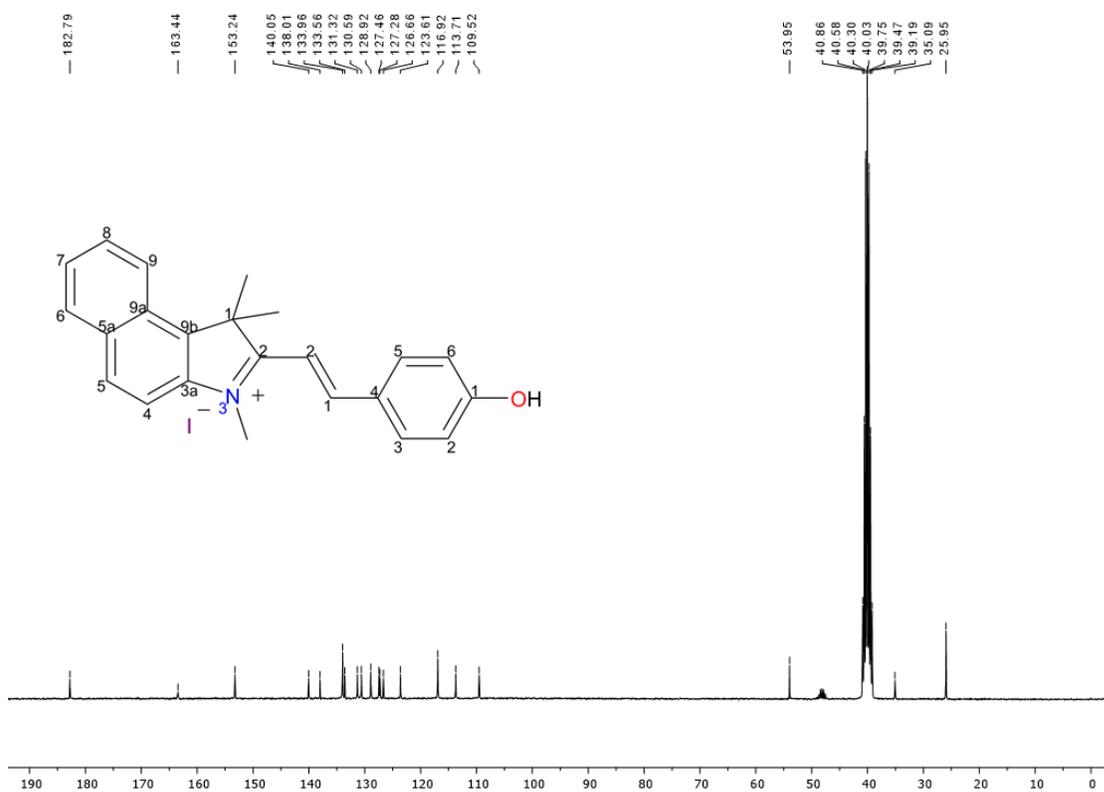


Figura 5.14. Espectro de ^{13}C -RMN de AztecNernst-3 obtenido de un equipo de 75 MHz en CD_3SOCD_3

5.3.8 Caracterización de AztecNernst-P

La síntesis de **AztecNernst-P** se llevó a cabo mediante una condensación tipo Knoevenagel como se describe en el apartado 4.2.8. Su caracterización se realizó mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , análisis de masas e infrarrojo (IR). IR (ATR, cm^{-1}): 3054, 2977, 1621, 1588, 1557, 1261. El análisis de masas fue obtenido mediante la técnica ESI-TOF. Calculado $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3$: 373.15522. Encontrado: 373.15467 (1.46 ppm).

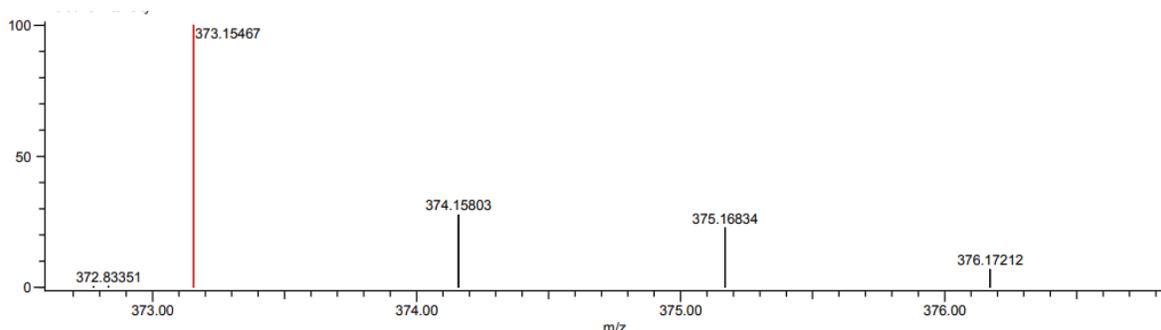


Figura 5.15. Análisis por espectrometría de masas DART⁺ de AztecNernst-P

Para el espectro de ^1H -RMN la señal con desplazamiento en 1,96 ppm presenta multiplicidad de singulete, integra para seis hidrógenos, los cuales corresponden a los hidrógenos de los dos metilos situados en la posición 1 del anillo de benzoindolinio. La señal con multiplicidad de singulete que aparece a 3,95 ppm integra para tres, por lo que corresponde a los hidrógenos del grupo metilo unido al nitrógeno del anillo, su gran desplazamiento se debe a que el nitrógeno está retirando mucha densidad electrónica de estos hidrógenos, lo que los desprotege y provoca que aparezca a mayores desplazamientos. La señal que aparece a 8,38 ppm con multiplicidad de doblete, integra para uno y presenta una constante de acoplamiento de 15,4 Hz, el valor de la constante indica que corresponde al hidrógeno que está formando el doble enlace entre ambos núcleos. La señal que corresponde al otro hidrógeno del doble enlace se encuentra a 6,95 ppm. Las señales con multiplicidad de doblete que aparecen a 8,30 y 8,11 ppm, están acopladas entre sí, y corresponden a los hidrógenos en la posición 5 y 4. A 8,15 ppm se encuentra una señal con multiplicidad de doblete, integra para uno y corresponde al hidrógeno de la posición 9. Los multipletes que se encuentran entre 7,74 y 7,75 integran para un hidrógeno cada uno, debido a su multiplicidad se concluye que corresponden a los hidrógenos de la posición 7 y 8 del núcleo de benzoindolinio. La señal con multiplicidad de doblete que aparece a 7,86 ppm corresponde al hidrógeno de la posición 6. A 8,00 ppm aparece una señal cuya multiplicidad no se aprecia, por su integral y desplazamiento se concluye corresponde al hidrógeno 5 del núcleo de fenol. El singulete que aparece a 8,59 ppm corresponde al hidrógeno de la posición 3 del núcleo de fenol, este aparece campo abajo debido al gran efecto desprotector que

genera el sustituyente nitro. El doblete que se encuentra a 6,49 ppm corresponde al hidrógeno 2 del fenol. En este caso la señal correspondiente al hidroxilo no apareció en el espectro, esto se puede deber al intercambio Hidrógeno-Deuterio que sucede.

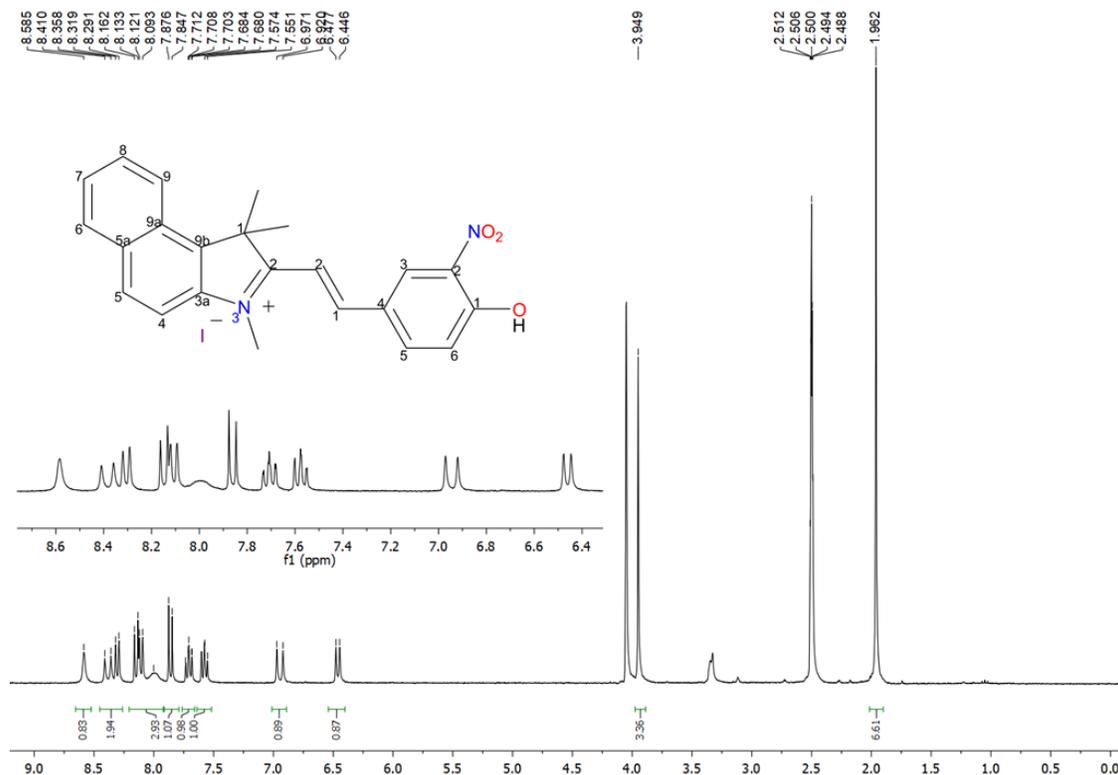


Figura 5.16. Espectro de ^1H -RMN de AztecNernst-3 obtenido en CD_3SOCD_3 de un equipo de 300 MHz

En el espectro de ^{13}C -RMN se observan 18 señales que corresponden a los 23 carbonos presentes en **AztecNernstN-3**, debido a que los carbonos de los metilos en la posición 1, 9 y 7, 5 y 4 del núcleo de benzoindolinio pueden ser magnéticamente equivalentes. La señal a 179,47 ppm pertenece al carbono 2 del núcleo de benzoindol, esta señal aparece campo abajo debido a que se encuentra muy desprotegido por el efecto electroatractor del nitrógeno cuaternario. La siguiente señal, a 172,22 ppm, corresponde al carbono 1 del fenol. El carbono del metilo unido al nitrógeno se encuentra muy desplazado, a 52,33 ppm, por la razón explicada anteriormente. El único carbono del núcleo de benzoindolinio que no es aromático se encuentra un desplazamiento de 33,18 ppm y corresponde al carbono 1. Por último, la señal que aparece en 62,62 ppm representa los dos carbonos de los metilos unidos al carbono 1

del benzoindolinio. El resto de los carbonos se encuentran en la región de los aromáticos, conforme lo esperado.

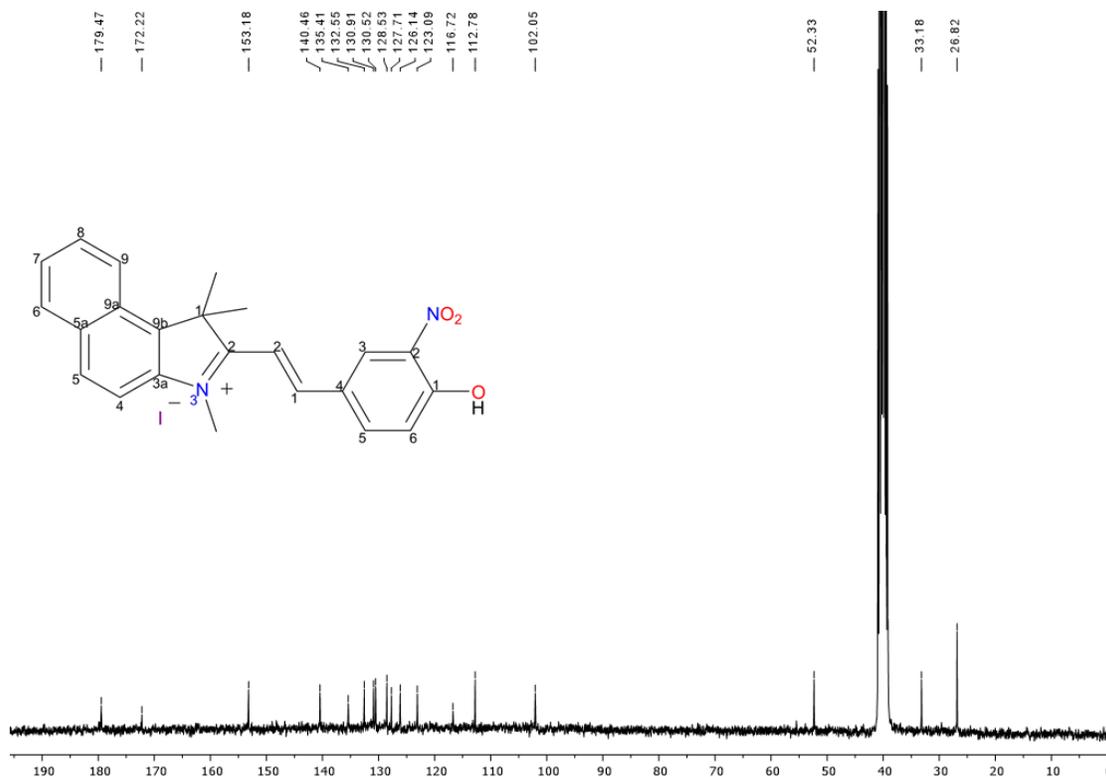


Figura 5.17. Espectro de ^{13}C -RMN de AztecNernst-3 obtenido en CD_3SOCD_3 de un equipo de y 75 MHz,

5.3.9 Caracterización de AztecNernst- ψ

La síntesis de **AztecNernst- ψ** se llevó a cabo mediante una condensación tipo Knoevenagel como se describe en el apartado 4.2.8. Su caracterización se realizó mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , análisis de masas e infrarrojo (IR). IR (ATR, cm^{-1}): 3150, 1762, 1614, 1595, 1577, 1540, 1198. El análisis de masas fue obtenido mediante la técnica ESI-TOF. Calculado $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{NO}_2^+$: 373.18070, Encontrado: 370.18064 (0.16 ppm).

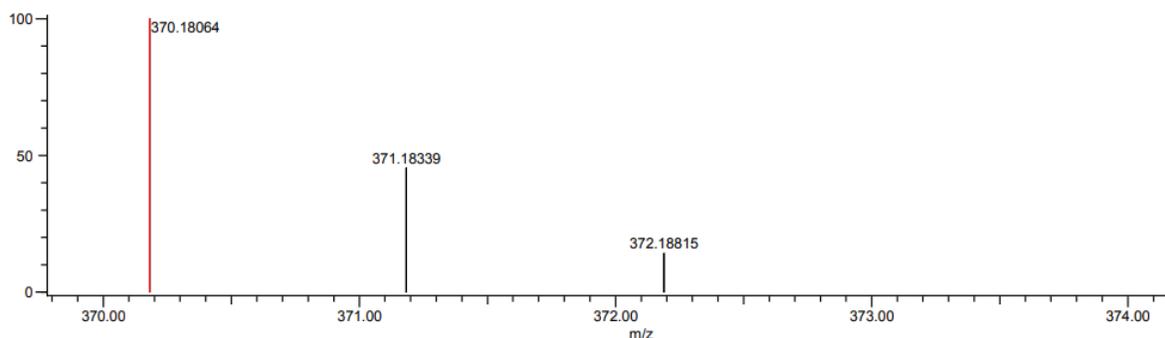


Figura 5.18. Análisis por espectrometría de masas DART⁺ de AztecNernst-P

Para el espectro de ^1H -RMN la señal con desplazamiento en 2,01 ppm presenta multiplicidad de singulete, integra para seis hidrógenos, los cuales corresponden a los hidrógenos de los dos metilos situados en la posición 1 del anillo de benzoindolinio. El singulete que aparece a 2,32 ppm corresponde al metilo del acetato. La señal con multiplicidad de singulete que aparece a 4,29 ppm integra para tres, por lo que corresponde a los hidrógenos del grupo metilo unido al nitrógeno del anillo, su gran desplazamiento se debe a que el nitrógeno está retirando mucha densidad electrónica de estos hidrógenos, lo que los desprotege y provoca que aparezca a mayores desplazamientos. La señal que aparece a 8,50 ppm con multiplicidad de doblete, integra para uno y presenta una constante de acoplamiento de 16,5 Hz, el valor de la constante indica que corresponde al hidrógeno que está formando el doble enlace entre ambos núcleos. La señal que corresponde al otro hidrógeno del doble enlace se encuentra a 7,72 ppm. Las señales con multiplicidad de doblete que aparecen a 8,29 y 8,12 corresponden a los hidrógenos en la posición 5 y 4. A 8,22 ppm se encuentra una señal con multiplicidad de doblete, integra para uno y corresponde al hidrógeno de la posición 6. Los multipletes que se encuentran entre 7,82 y 7,73 ppm integran para un hidrógeno cada uno, debido a su multiplicidad se concluye que corresponden a los hidrógenos de la posición 7 y 8 del núcleo de benzoindolinio. La señal con multiplicidad de doblete que aparece a 8,43 ppm corresponde al hidrógeno de la posición 9. Las señales con multiplicidad de doblete que se encuentra a 7,38 y 8,30 ppm integra cada una para dos hidrógenos, por lo que corresponden a las señales 2,35 y 6 del núcleo de benceno.

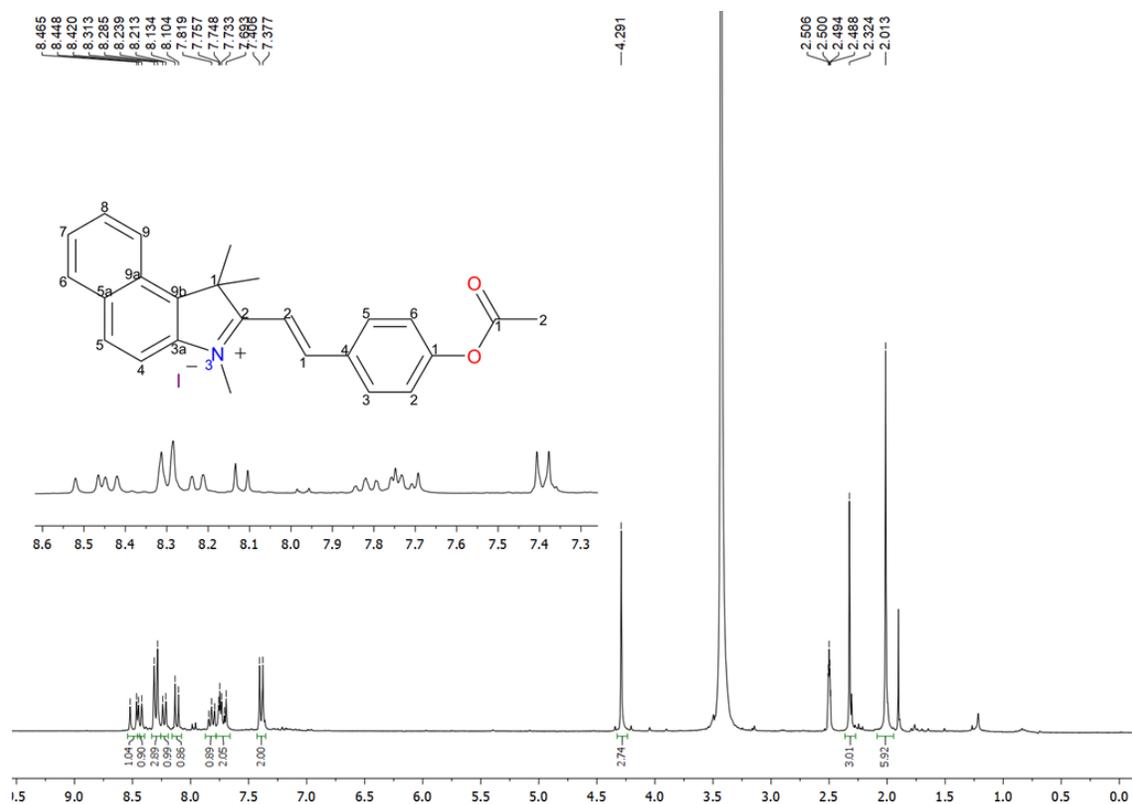


Figura 19. Espectro de ^1H -RMN de AztecNernst- ψ obtenido de un equipo de 300 MHz en CD_3SOCD_3

En el espectro de ^{13}C -RMN se observan 22 señales que corresponden a los 25 carbonos presentes en **AztecNernst- ψ** , debido a que los carbonos de los metilos en la posición 1 del núcleo de benzoindolinio, y los carbonos 5 y 3, 6 y 2 del núcleo de benceno son magnéticamente equivalentes. La señal a 183,14 ppm pertenece al carbono 2 del núcleo de benzoindol, esta señal aparece campo abajo debido a que se encuentra muy desprotegido por el efecto electroatractor del nitrógeno cuaternario. La siguiente señal se encuentra a 169,66 ppm y corresponde al carbonilo del acetato unido en la posición 1 al núcleo de benceno. El carbono del metilo unido al nitrógeno se encuentra muy desplazado, a 54,45 ppm, por la razón explicada anteriormente. El único carbono del núcleo de benzoindolinio que no es aromático se encuentra un desplazamiento de 35,78 ppm y corresponde al carbono 1 de este núcleo. Por último, las señales que aparecen a 25,50, 21,52 ppm corresponden a los metilos del carbono 1 del núcleo de benzoindolinio y del acetato, respectivamente. El resto de los carbonos se encuentran en la región de los aromáticos, conforme lo esperado.

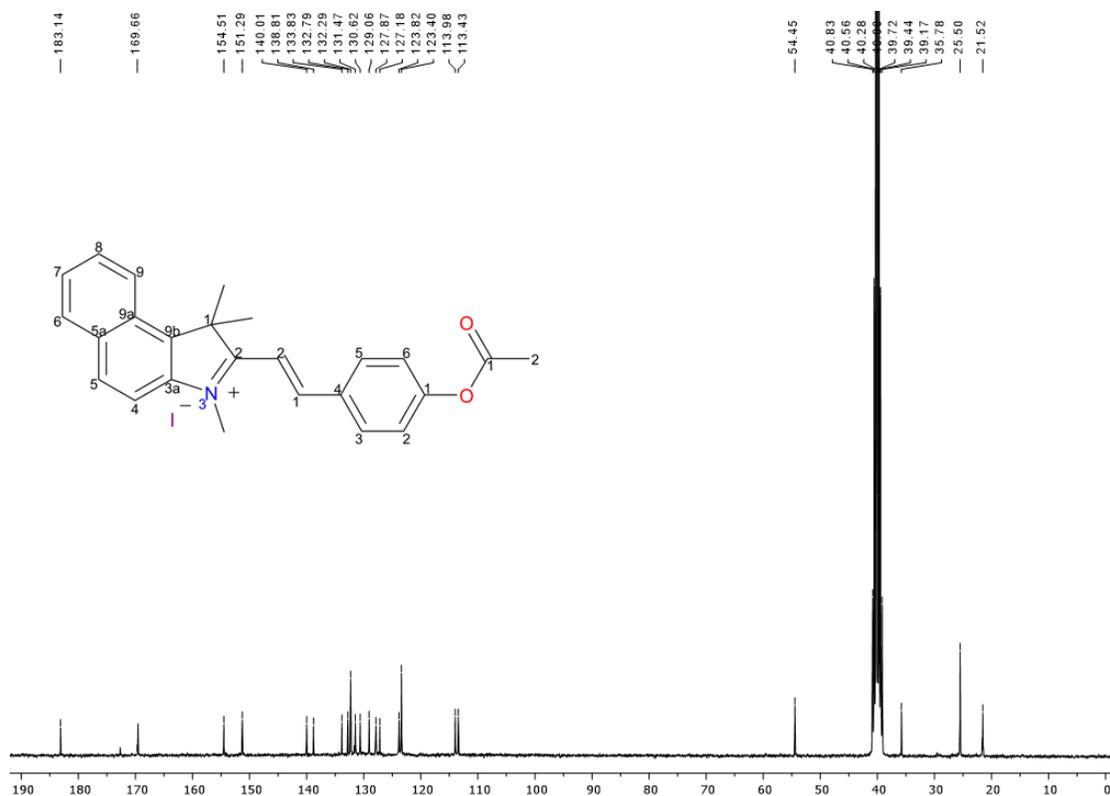


Figura 20. Espectro de ^1H -RMN de AztecNernst- Ψ obtenido de un equipo de 75 MHz en CD_3SOCD_3

5.4 CARACTERIZACIÓN FOTOFÍSICA

Se determinaron las propiedades fotofísicas de la familia de sondas fluorescentes AztecNernst, con la finalidad de evaluar los cambios en sus propiedades de absorción y emisión dependiendo de su entorno molecular. Las mediciones espectrofotométricas fueron llevadas a cabo bajo los parámetros que se describen en sección 4.2. Sin embargo, no todas las sondas mostraron respuestas significativas, por lo que los espectros que no brindaron información relevante se encuentran en anexos.

5.4.1 Solvatochromismo

Las sondas que presentan solvatochromismo negativo son más útiles para evaluar la polaridad en el microambiente de los organelos celulares debido a que permiten

observar las membranas de polaridad media y las regiones acuosas más polares en diferentes canales en microscopía de fluorescencia (19). Considerando este principio, las sondas fueron diseñadas para presentar solvatocromismo negativo. Para evaluar las propiedades solvatocrómicas se midieron los espectros de emisión y de absorción para las 5 sondas empleando disolventes de distinta polaridad. Se encontró que AztecNernst-2 y AztecNernst-P presentaron un solvatocromismo negativo significativo.

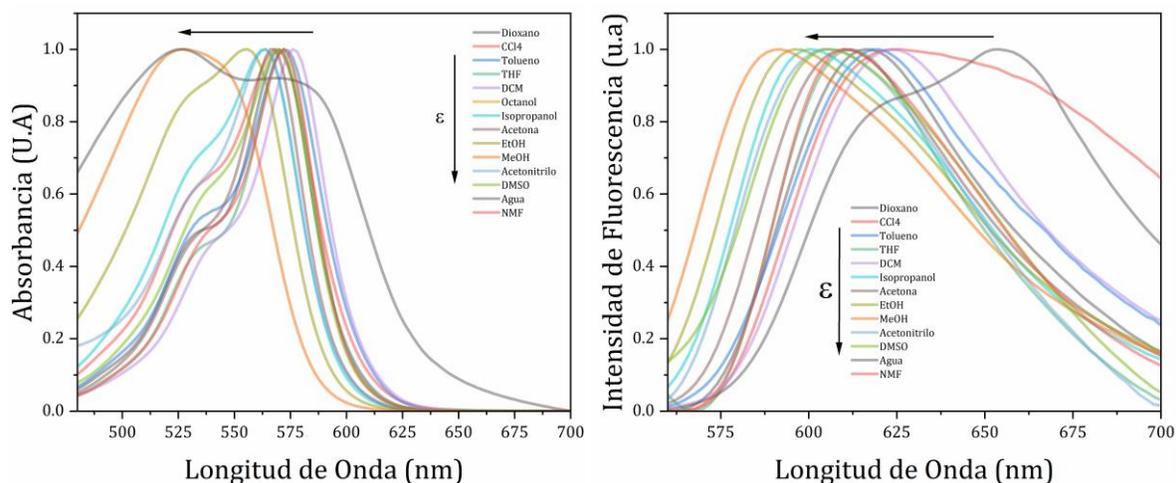


Imagen 5.1. Espectro de absorción normalizada (izquierda) y emisión normalizada (derecha) para la sonda AztecNernst-P evaluada en disolventes con constante dieléctrica creciente.

La posición de los máximos de absorción y fluorescencia se modificó en función del disolvente. Para los espectros de absorción UV-Vis, AztecNernst-P presentó un desplazamiento hipsocrómico cambiando de 580 nm en diclorometano (DCM) a 520 nm en metanol, mientras que para los espectros de emisión la longitud de onda máxima se observó en 655 nm para dioxano (o diclorometano en 625 nm) vs. 585 nm en metanol. Si bien el solvatocromismo negativo se observa tanto para disolventes polares próticos como apróticos el desplazamiento hipsocrómico más homogéneo se observó entre DCM-MeOH, tanto para absorción como para emisión. Se realizó una curva de variación continua con el sistema DCM-MeOH para evaluar el desplazamiento de los máximos de absorción y de emisión. Los resultados para la curva fueron los esperados, como se puede observar en la Imagen 5.2 conforme se incrementa el porcentaje de MeOH se presenta un desplazamiento hacia la izquierda en el máximo de la banda tanto

de absorción como de emisión. El mayor desplazamiento se observó en los espectros de absorción UV-Vis con 1690 cm^{-1} (ca. 55 nm), comparado con 1350 cm^{-1} (ca. 50 nm) de desplazamiento observados en los perfiles de fluorescencia.

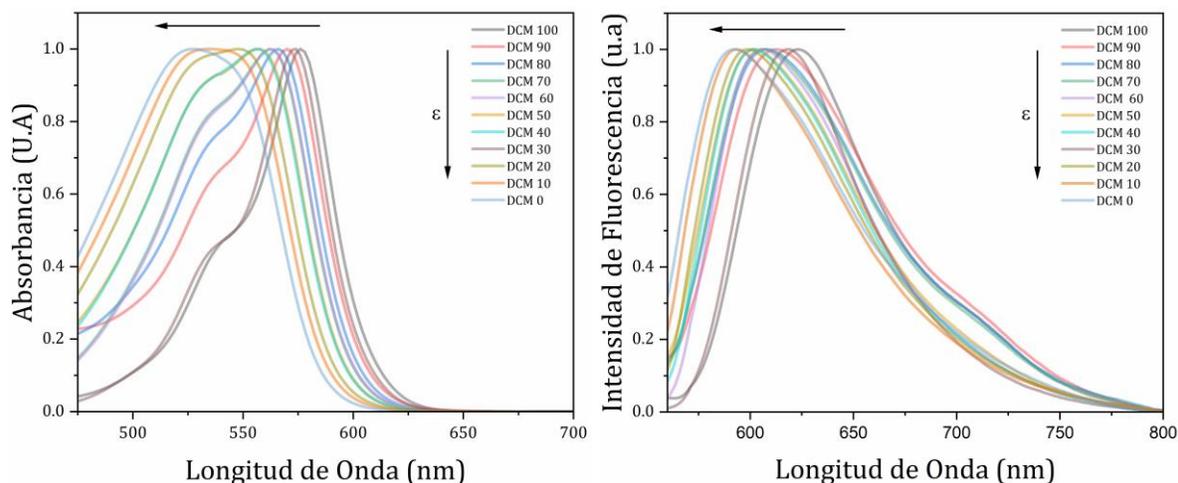


Imagen 5.2. Espectro de absorción normalizada (izquierda) y emisión normalizada (derecha) para la sonda AztecNernst-P evaluada para la variación continua del sistema DCM-MeOH % v/v.

Los desplazamientos presentados en los espectros de absorción y emisión de AztecNernst-P están relacionados con el diferente grado de solvatación de las moléculas en el estado excitado según su polaridad. La polaridad de los disolventes está estrechamente relacionada con la constante dieléctrica, la cual es una propiedad que describe qué tan bien un material puede polarizarse mediante un campo eléctrico externo. Un disolvente con una constante dieléctrica alta puede estabilizar eficazmente moléculas cargadas. En cambio, en los disolventes no polares, los dipolos eléctricos no se alinean fácilmente con un campo eléctrico, por lo cual no estabilizan moléculas con momentos dipolares marcados.

La sonda AztecNernst-P presenta un grupo nitro en su anillo de fenol, el cual al encontrarse en posición orto al hidroxilo por efecto de resonancia puede aumentar la acidez de éste. Anudado a la carga positiva del nitrógeno en el anillo de benzindolinio, la molécula presenta un momento dipolar mayor en el estado basal ya que al desprotonarse, la AztecNernst-P puede coexistir como zwitterión. Por lo tanto, el momento dipolar en el estado excitado puede disminuir con la fotoexcitación,

provocando que los disolventes polares estabilicen más eficientemente el estado basal que el estado excitado, disminuyendo así la energía de emisión (longitudes de ondas más grandes) en disolventes polares.

Sin embargo, como se discutirá más adelante, la acidez del AztecNernst-P no aumentó, sino que prácticamente se mantuvo, esto puede deberse a la formación del anillo de 6 miembros (C-NO-O•••H-O-C) representado en el Esquema 5.1, el cual disminuye la acidez de dicho fenol. Es importante resaltar que si bien también se observó un desplazamiento hipsocrómico en disolventes polares no próticos como el sistema DCM-DMSO, este desplazamiento fue menor, lo cual de hecho puede deberse a que el solvatochromismo negativo observado depende más de los enlaces de hidrógeno que la AztecNernst-P puede formar con el medio, los cuales podrían desestabilizar la geometría del anillo de 6 miembros. Podemos ejemplificar el desplazamiento hipsocrómico debido mayoritariamente a la contribución de la constante dieléctrica con DCM-DMSO, en el cual se observó un desplazamiento de 8 nm en absorción y de 20 nm en emisión, comparado con el sistema DCM-MeOH 49 nm en absorción y de 32 nm en emisión, resultando evidente que la proticidad del medio juega un rol crucial en la geometría del anillo de 6 miembros.

Por su parte, recordemos que el espectro de absorción es menos sensible a la polaridad del medio que el de emisión debido a que la absorción sucede en periodos de tiempos más cortos (*ca.* 10^{-16} s), lo cual no permite el acomodo óptimo de las moléculas de disolvente alrededor de la sonda, en cambio la emisión al suceder en periodos de tiempo más largos (*ca.* 10^{-14} s), permite un acomodo de menor energía en la esfera de solvatación, explicando el mayor desplazamiento hipsocrómico para las sondas solvatochrómicas negativas en el espectro de emisión cuando este se debe principalmente a la constante dieléctrica del disolvente. En cambio, cuando el desplazamiento hipsocrómico depende más de la capacidad de la sonda para formar enlaces de hidrógeno con el disolvente el efecto es opuesto, el mayor desplazamiento se observa en absorción. Esto se debe a que en el caso de las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ la densidad electrónica en un heteroátomo disminuye con la excitación, dando como resultado una disminución en la capacidad del heteroátomo para formar enlaces de hidrógeno,

esperándose un desplazamiento hacia el azul en el espectro de absorción. En efecto, cuanto mayor es la fuerza del enlace de hidrógeno, mayor es el desplazamiento. Por otro lado, la fluorescencia emitida desde un estado singulete $n \rightarrow \pi^*$ siempre será menos sensible a la capacidad del disolvente para formar enlaces de hidrógeno comparando con el proceso de absorción, porque la emisión surge de un estado $n \rightarrow \pi^*$ sin enlaces de hidrógeno (12).

Por otro lado, la sonda AztecNernst-2 también mostró un solvatocromismo negativo significativo, tanto en el espectro de absorción como en el de emisión. Los disolventes de menor constante dieléctrica que más desplazaron la banda de absorción hacia la derecha fueron: tolueno, CCl_4 y dioxano, sin embargo, solo en dioxano fue fluorescente AztecNernst-2. Se realizó la curva de variación continua con el par de disolventes dioxano-etanol. Como se muestra en la Imagen 5.4, AztecNernst-2 no muestra el comportamiento que se observó en AztecNernst-P, donde el desplazamiento hipsocrómico se va observando conforme se aumentaba la concentración del disolvente de mayor polaridad. En este caso, se observaron dos tendencias, de 100-60 % de dioxano las bandas del máximo emisión presentan el desplazamiento hipsocrómico esperado, y a partir de 40 a 0 % de dioxano se observa la activación de una nueva banda de absorción de mayor energía.

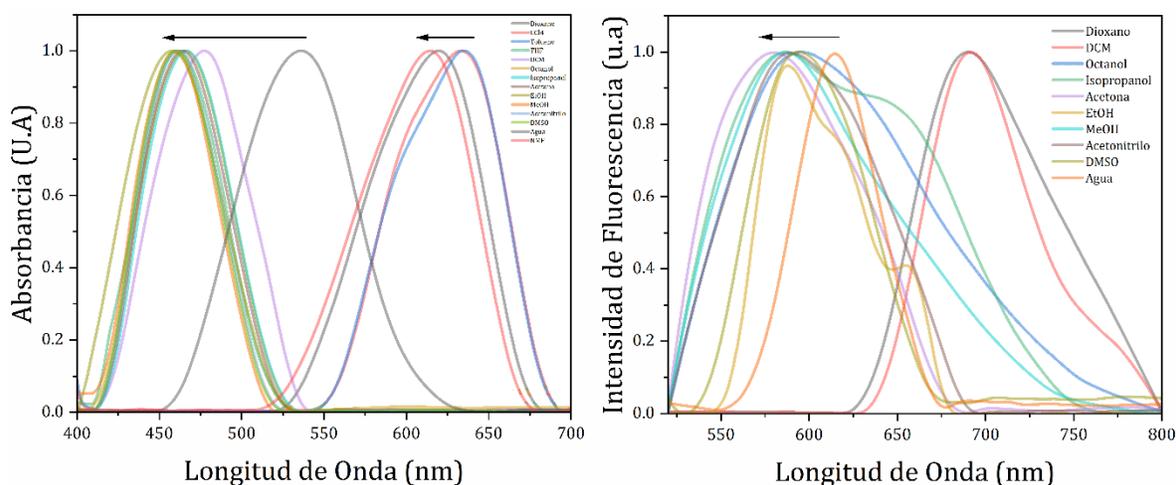


Imagen 5.3 Espectro de absorción normalizada (izquierda) y emisión normalizada (derecha) para la sonda AztecNernst-2 evaluada en disolventes con constante dieléctrica creciente.

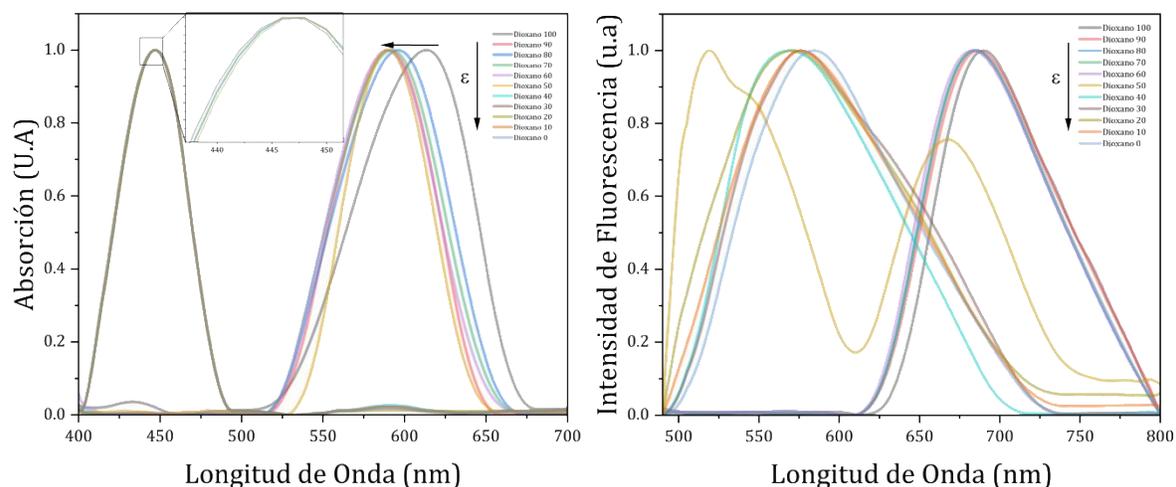


Imagen 5.2. Espectro de absorción normalizada (izquierda) y emisión normalizada (derecha) para la sonda AztecNernst-P evaluada para la variación continua del sistema Dioxano-MeOH % v/v.

5.4.3 Determinación de pK_a

Se realizó la determinación de pK_a de las sondas AztecNernst-1, 2, 3 y P utilizando la siguiente ecuación de equilibrio ácido-base (29).

$$y = \frac{A + Bx10^{pKa-x}}{1 + 10^{pKa-x}}$$

Donde;

$A = \text{Intensidad de fluorescencia}_{AztecNernst}[AztecNernst]$

$B = \text{Intensidad de fluorescencia}_{AztecNernstH}[AztecNernstH]$

$x = pH$

Los valores de pK_a obtenidos espectrofotométricamente para cada sonda se muestran en la Tabla 5.1, mientras que los espectros de emisión a pH variable se muestran en las imágenes 5.5 a 5.8. De manera general, el aumento de pH generó la aparición de una banda desplazada hacia el rojo con la correspondiente disminución de la banda de mayor energía, estos cambios ocurrieron con la preservación de los puntos isobésticos característicos del equilibrio, en este caso, de las especies ácido-base. Como se puede notar, con excepción de la AztecNernst-1, los valores de pK_a para todas las sondas prácticamente se mantuvieron constantes. Si bien se esperaba un aumento de la acidez

para la sonda AztecNernst-P al introducir un grupo nitro (-NO₂) en posición orto a la función fonólica, probablemente la presencia de una interacción de canal de hidrógeno (C-NO-O•••H-O-C) con geometría típica de anillo de 6 miembros impidió el aumento de acidez de dicha función. No obstante, se mantiene como premisa que, en un medio heterogéneo como el ambiente subcelular, el canal de hidrógeno que confiere estabilización al grupo -OH fenólico se puede interrumpir, como sucede en ambientes próticos.

Sonda	pK _a
AztecNernst-1	8.65 ± 0.08
AztecNernst-2	7.90 ± 0.09
AztecNernst-3	7.91 ± 0.03
AztecNernst-P	7.95 ± 0.05

Tabla 5.1. pK_a calculado para cada una de las sondas AztecNernst

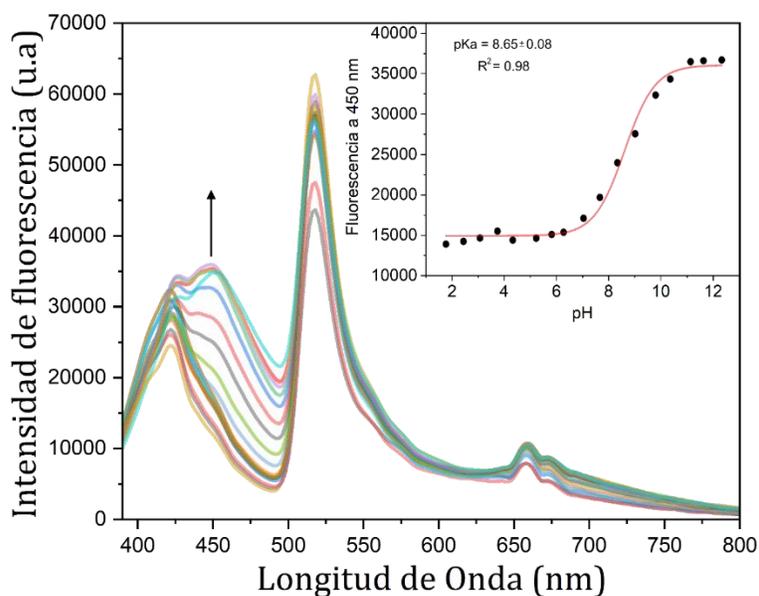


Imagen 5.5. Espectros de emisión de 40 μM AztecNernst-1 a pH variable en medio acuoso (25 °C 0.05 M NaCl). El recuadro muestra el perfil de emisión vs. pH a 450 nm. Las Flechas indican el cambio de las bandas al aumentar el pH.

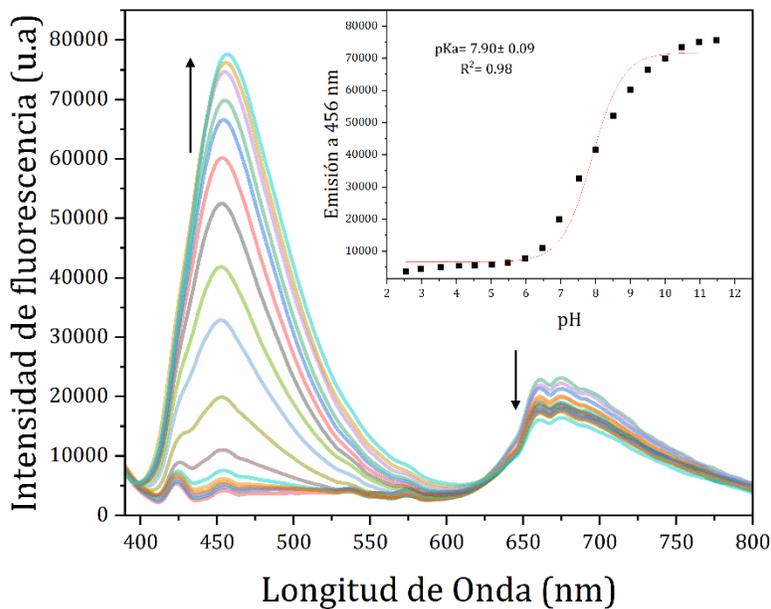


Imagen 5.6. Espectros de emisión de 40 μ M AztecNernst-2 a pH variable en medio acuoso (25 °C 0.05 M NaCl). El recuadro muestra el perfil de emisión vs. pH a 456 nm. Las Flechas indican el cambio de las bandas al aumentar el pH.

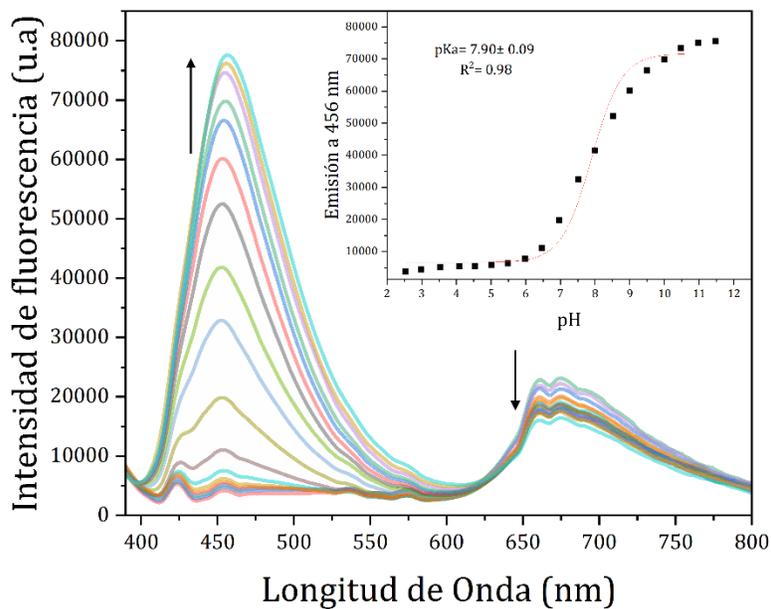


Imagen 5.7. Espectros de emisión de 40 μ M AztecNernst-3 a pH variable en medio acuoso (25 °C 0.05 M NaCl). El recuadro muestra el perfil de emisión vs. pH a 455 nm. Las Flechas indican el cambio de las bandas al aumentar el pH.

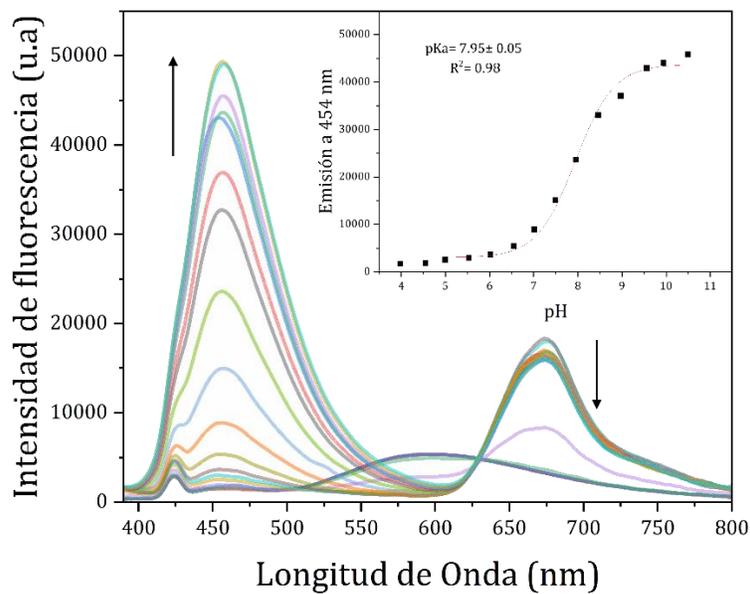


Imagen 5.8. Espectros de emisión de 40 μM AztecNernst-P a pH variable en medio acuoso (25 °C 0.05 M NaCl). El recuadro muestra el perfil de emisión vs. pH a 454 nm. Las Flechas indican el cambio de las bandas al aumentar el pH.

5.4.2 Formación de agregados

Para evaluar si las sondas de la familia AztecNernst (AN) presentaban la capacidad de formar agregados se midió la absorción y emisión en mezclas THF-Agua y Hexano- CHCl_3 . AN-3 y AN-P presentaron resultados interesantes. En el análisis de espectroscopia UV-Vis de la molécula AztecNernst-P, se observó un fenómeno de agregación molecular tipo J, el cual se confirmó mediante la inversión de las transiciones electrónicas 0-0 y 0-1, Imagen 5.9. Este fenómeno se manifestó en el sistema tetrahidrofurano (THF)-agua y en el sistema hexano- CHCl_3 , siendo más claro en el primero. Cuando la molécula AztecNernst-P se encuentra en estado monomérico, se esperaría que la transición 0-0 sea menos energética que la transición 0-1, es decir, un menor radio de las bandas vibrónicas 0-0/0-1. Sin embargo, en presencia de agregación molecular tipo J, las moléculas de AztecNernst-P interactúan entre sí y esto provoca un cambio en las energías de estas transiciones. En este caso, se observó que la transición 0-0 se volvió más energética que la transición 0-1, o un mayor radio 0-0/0-1. Este

comportamiento es característico de la agregación molecular tipo J, y su detección en diferentes condiciones de disolvente proporciona una evidencia sólida de este fenómeno en la molécula AztecNernst-P.

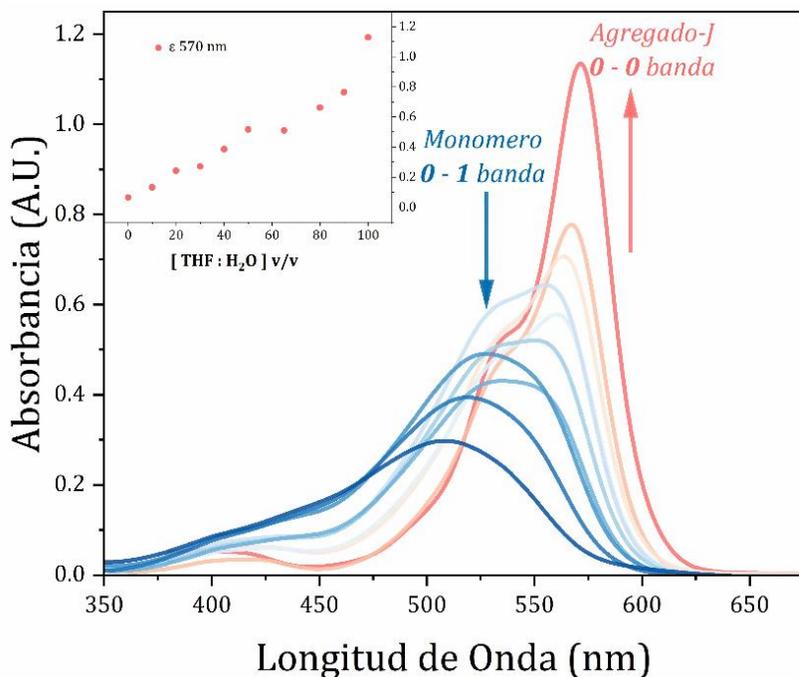


Imagen 5.9. Espectro de absorción para la sonda AztecNernst-P evaluada con variación continua de THF-Agua (v/v) donde se observa el efecto de agregación determinado por el incremento en la relación de señales vibrónicas 0-0/0-1 al aumentar la proporción de agua en el medio (dirección de las flechas), lo cual corresponde agregados tipo J.

Por otra parte, la molécula AztecNernst-P presentó un comportamiento distintivo en espectroscopia de fluorescencia, que se relacionó al fenómeno de formación de excímeros, similar al comportamiento de la molécula de pireno, conocida por su alta eficiencia en la formación de excímeros. Esto se evidenció a través del incremento de una banda de emisión desplazada a menor energía, con una longitud de onda máxima en 625 nm, Imagen 5.10. Notablemente, la banda de mayor energía, que se encontraba alrededor de 440 nm, mostró características estructurales (contornos de Franck-Condon) y no exhibió ninguna variación en su intensidad, ni disminuyendo ni aumentando. Este comportamiento es particularmente valioso en aplicaciones de monitoreo por fluorescencia, ya que sugiere la capacidad de la molécula AztecNernst-P para actuar como una sonda molecular auto-calibrable (también llamadas en inglés *calibrationless probes*). La formación de excímeros y la estabilidad de las transiciones de Franck-Condon en diferentes condiciones son características que hacen que la

molécula AztecNernst-P sea promisoría para aplicaciones en las que se requiere un monitoreo preciso, cuantitativo y autocalibrable mediante fluorescencia.

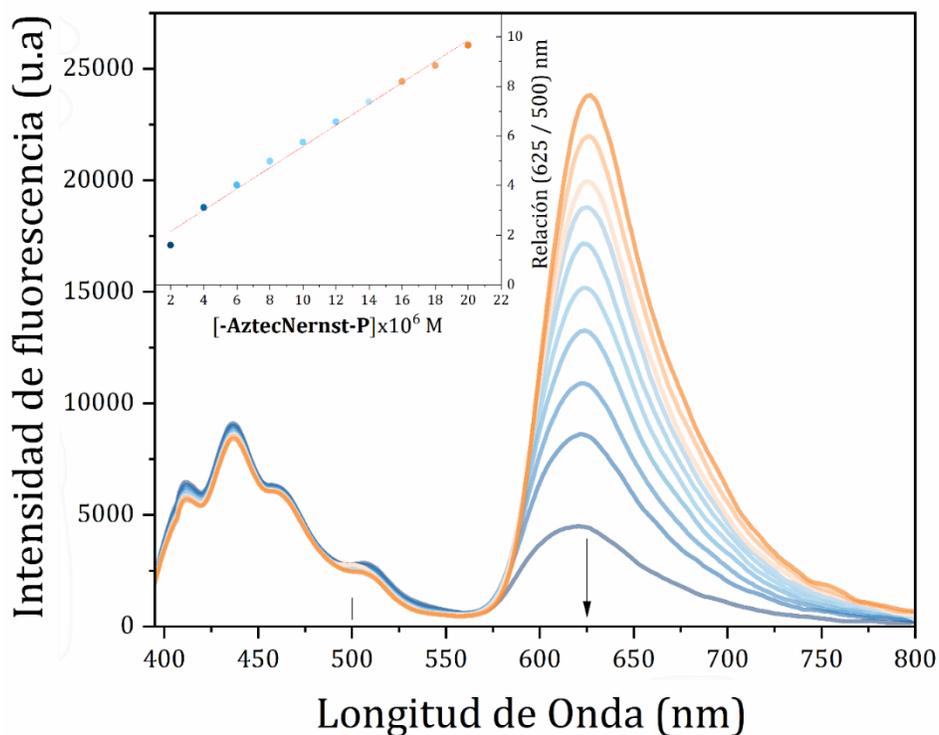


Imagen 5.10. Espectro de absorbancia para la sonda AztecNernst-P evaluada con variación continua de Hexano- CHCl_3 (v/v) de donde se observa la formación de excímeros.

En el análisis de espectroscopia UV-Vis para AztecNernst-3 también mostró el fenómeno de agregación molecular tipo J, la inversión de las transiciones electrónicas 0-0 y 0-1 se observa en la Imagen 5.11. Este fenómeno se manifestó en el sistema tetrahidrofurano (THF) y agua, aunque no de manera óptima probablemente debido a problemas de solubilidad en THF en los puntos iniciales. Sin embargo, no presentó una formación de excímeros como AN-P. Las demás sondas no presentaron información importante, por lo que sus espectros se encuentran en anexos.

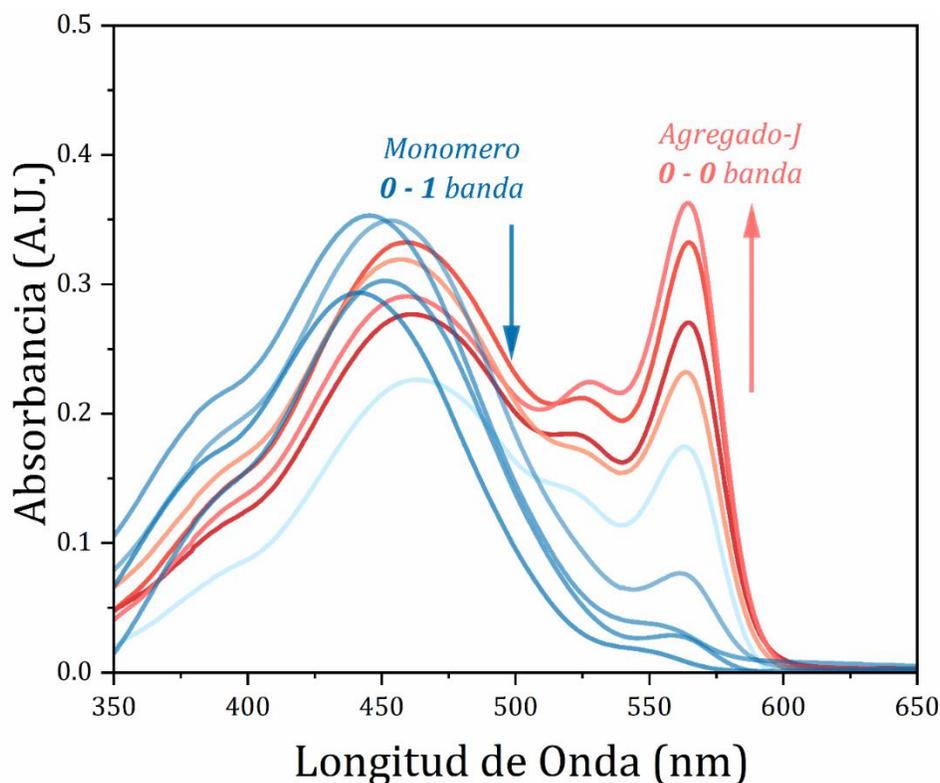


Imagen 5.11. Espectro de absorbanza para la sonda AztecNernst-3 evaluada con variación continua de THF-Agua (v/v) donde se observa la formación de agregados moleculares tipo J.

5.4.3 Microviscosidad local

La microviscosidad de los distintos ambientes subcelulares es un parámetro de suma importancia, debido a que las fluctuaciones anormales están estrechamente asociadas con muchas enfermedades. A pesar de que en la actualidad existen sondas sensibles a la viscosidad, sigue siendo importante el desarrollo de nuevas sondas funcionales que posean alta sensibilidad, bajo ruido y poca o nula citotoxicidad (32). Con esto en mente, el diseño de la familia AztecNernst presenta en su estructura un doble enlace uniendo dos núcleos aromáticos, siendo el núcleo de fenol plano, lo que sugiere que en un medio no viscoso este rota disminuyendo así fluorescencia de la sonda. Sin embargo, si la viscosidad del medio impide esta rotación puede aumentar la intensidad de fluorescencia. Por otra parte, en términos analíticos esto podría implicar también una fuente de interferencia en los registros de señal de intensidad de fluorescencia en

aplicaciones de microscopia de imagen, ya que la dicha variación en la señal puede ser debida a factores no solo relacionados a la agregación molecular o al cambio de polaridad del medio, sino también al ambiente de microviscosidad local. Considerando lo anterior, fue necesario confirmar qué moléculas presentan dependencia de la señal de fluorescencia con la microviscosidad local.

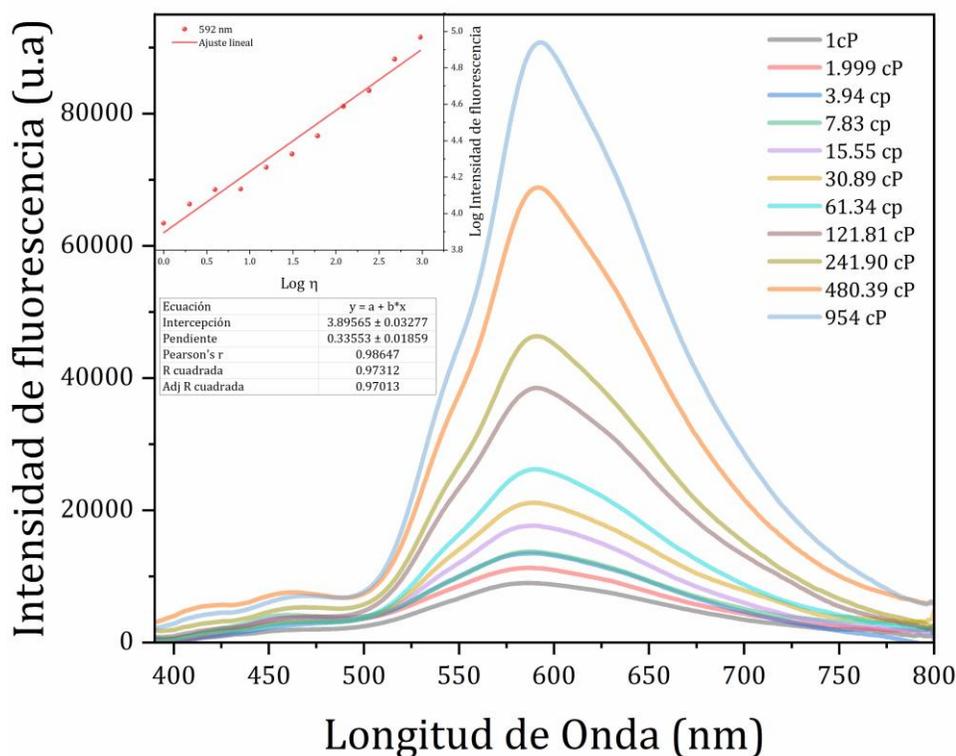


Imagen 5.12. Espectro de emisión para la sonda AztecNernst-3 evaluada en mezclas v/v de Glicerol-Agua donde se observa su respuesta a la viscosidad en el aumento de la banda a 592 nm.

Para determinar la respuesta a la microviscosidad se realizó una aproximación común en la literatura (33) entre dicho parámetro que se relaciona más al movimiento intrínseco de la molécula, tal como la rotación de enlaces o incluso procesos de isomerización, con el parámetro macroscópico correspondiente, relacionado más a la resistencia al flujo, es decir, la viscosidad. Se realizaron experimentos de valoración midiendo las emisiones de fluorescencia de cada una de las sondas en diferentes proporciones de mezclas de agua ($\eta = 1$ cP) y glicerol ($\eta = 954$ cP). Los resultados mostraron que solo el fluoróforo AztecNernst-3 fue sensible a la viscosidad. Como se

muestra en la imagen 5.12, AztecNernst-3 mostró en agua emisiones de fluorescencia muy baja, lo cual se puede atribuir a la rotación del doble enlace de la molécula. Con el aumento de la viscosidad, la intensidad de la banda de emisión a 592 nm aumentó significativamente, lo que podría atribuirse a la rotación restringida del doble enlace en un ambiente de alta viscosidad. Para comprobar cuantitativamente la respuesta de la sonda a la viscosidad se graficó el logaritmo de la intensidad de fluorescencia a 657 nm ($\log I_F$) versus el logaritmo de la viscosidad de la solución ($\log \eta$). Los resultados mostraron cierto acercamiento al comportamiento doble logarítmico común (con un $R^2 = 0.97$) en todo el rango de 1 a 954 cP, lo que indica que AztecNernst es una sonda de fluorescencia sensible a viscosidad y potencialmente se podría utilizar como sonda de microviscosidad local en ambientes subcelulares.

5.4.4 Microscopía de imagen

Los primeros experimentos que se realizaron fueron para determinar si las sondas sintetizadas eran capaces de permear la membrana celular y si presentaban selectividad a mitocondria como se espera por su diseño. Las células fueron cultivadas y tratadas como se describe en la sección 4.3. Para este experimento no se llevó a cabo ningún pretratamiento adicional. Se eligió trabajar con la línea celular U-251 debido a que poseen una buena adherencia a superficie, lo que las hace buena opción para observar estructuras y dinámicas celulares mediante microscopía confocal de fluorescencia. Para este experimento se añadió 5 μM de cada fluoróforo y se procedió a tomar las imágenes correspondientes en el microscopio confocal de fluorescencia.

Las imágenes que se muestran en la Imagen 5.13 son las obtenidas por la tinción con AztecNernst-1. Como se puede observar esta sonda presenta una muy baja fluorescencia, además de haber inducido estrés celular (campo claro, Imagen 5-13), dando una respuesta prácticamente nula tanto en el canal rojo como en el verde. En el canal azul sí muestra un poco de fluorescencia, sin embargo, no se observó selectividad a mitocondrias ni a ningún otro organelo.

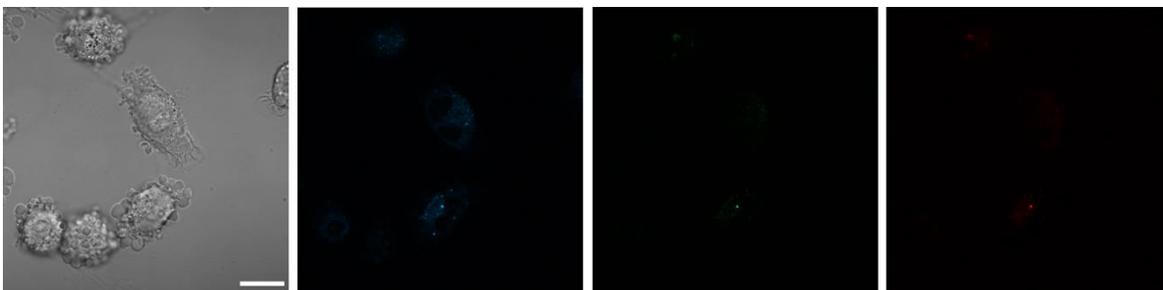


Imagen 5.13. Localización de la Sonda AztecNernst-1. Las imágenes se obtuvieron después de agregar 5 μM en DMSO a un cultivo celular de U251 en medio de 'Dulbecco's Modified Eagle Medium' (DMEM). La configuración confocal que se utilizó de izquierda a derecha fue: campo claro; DAPI $\lambda_{exc} = 358 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$; proteína verde fluorescente (PVF) $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$ y Texas Red, $\lambda_{exc} = 590 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 615 \text{ nm}$. La barra de escala representa 20 μm .

Por otro lado, las imágenes obtenidas de la tinción realizada con AztecNernst-2 sugirieron una mejor tinción subcelular, mostrando fluorescencia en los 3 canales mencionados, particularmente en el canal TexasRed se observa una localización estructurada en filamentos mitocondriales, no obstante, la distribución no fue totalmente limpia evidenciándose un equilibrio con el citosol, Imagen 5.14.

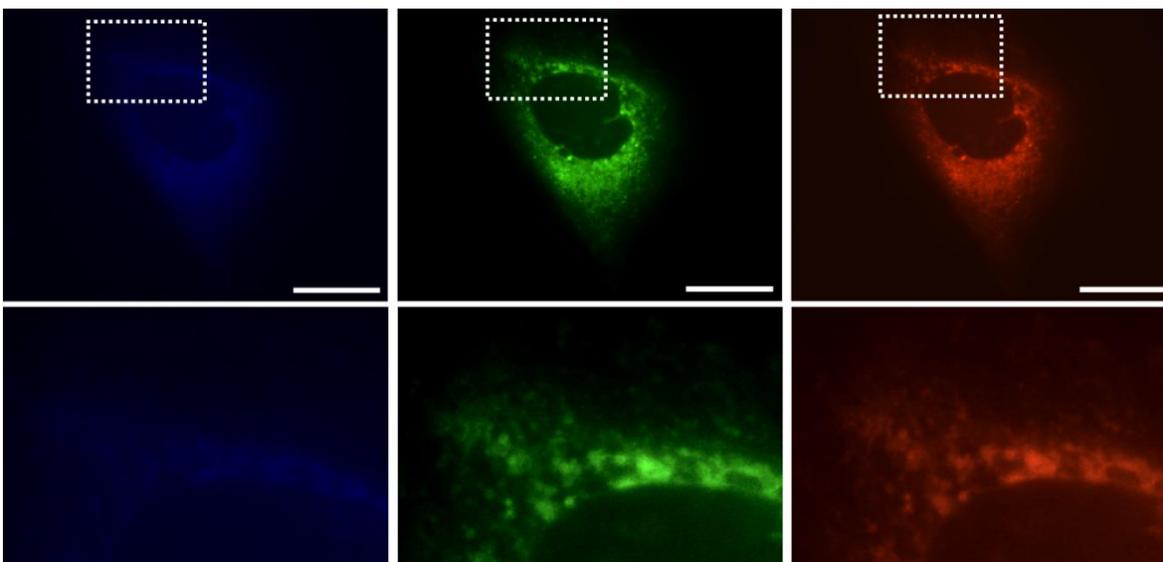


Imagen 5.14. Localización de la Sonda AztecNernst-2. Las imágenes se obtuvieron después de agregar 1 μl de una disolución 5mM preparada en DMSO a un cultivo celular de U251. La configuración confocal que se utilizó de izquierda a derecha fue: DAPI $\lambda_{exc} = 358 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$; proteína verde fluorescente (PVF) $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$ y Cy5 $\lambda_{exc} = 647 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 665 \text{ nm}$. Las barras de escala representan 20 μm .

Para AztecNernst-3 se encontró que presenta mayor fluorescencia que las sondas anteriormente mencionadas. En los canales azul (DAPI), verde (PVF) y rojo (TxR) se puede observar localización mitocondrial, sin embargo, no es muy selectiva, de tal manera que sigue presentando un equilibrio con el ambiente citosólico probablemente debido al equilibrio ácido-base de la sonda, donde a un pK_a menor a 8 existe una fracción de moléculas que se encuentran desprotonadas antes de translocar la membrana mitocondrial. Por otro lado, en los tres canales analizados se observa que marca unos pequeños organelos, los cuales podrían ser gotas lipídicas afines a especies lipofílicas y neutras, Imagen 5.15.

Adicionalmente, en la Imagen 5.16 se muestran las imágenes para la sonda AztecNernst-P, la cual no muestra fluorescencia en el canal azul y es baja en el canal verde. Por otro lado, en el canal rojo se observa que marca las mitocondrias de manera muy clara, por lo que para esta sonda se decidió continuar con un protocolo de bioimagen completo. De manera interesante, el hecho de observar respuesta de fluorescencia en el canal rojo es un indicativo de que el proceso de autoasociación o agregación molecular para generar fluorescencia en el rojo sin el aumento de emisión en el canal verde es eficiente incluso en el ambiente mitocondrial, lo cual apoya la hipótesis de que el mecanismo de reparto de Nernst involucrado en dos ambientes, hidrofílico e hidrofóbico, contribuye a optimizar la localización mitocondrial por una parte (dado el ambiente hidrofóbico de la membrana mitocondrial) y por otro lado a ofrecer una respuesta en un solo canal, lo cual da mayor practicidad en aplicaciones de marcaje mitocondrial.

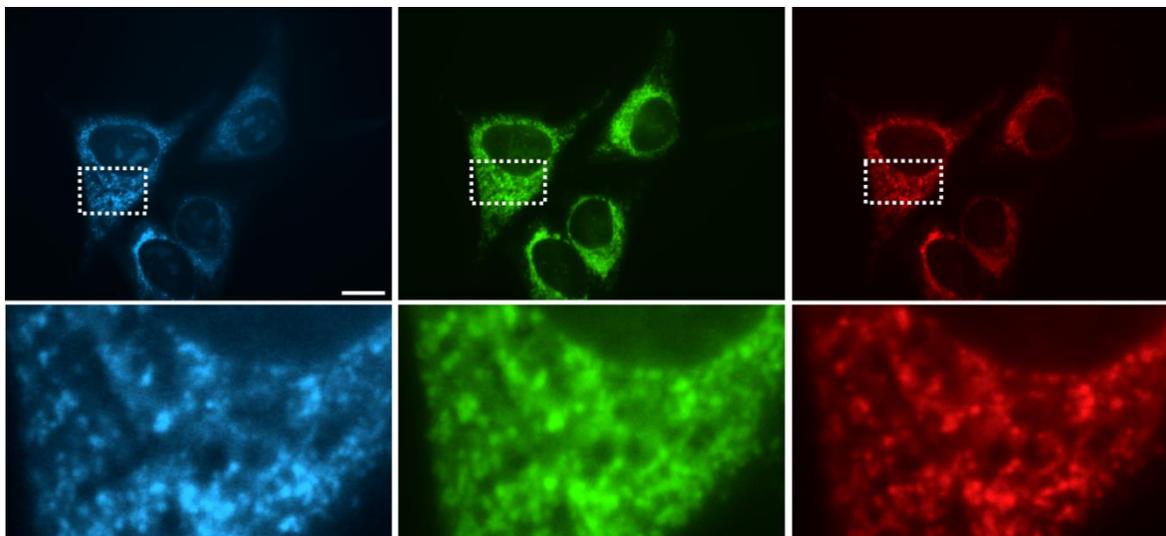


Imagen 5.15. Localización de la Sonda AztecNernst-3. Las imágenes se obtuvieron después de agregar $1\ \mu\text{l}$ de una disolución 5mM preparada en DMSO a un cultivo celular de U251. La configuración confocal que se utilizó de izquierda a derecha fue: DAPI $\lambda_{\text{exc}} = 358\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450\ \text{nm}$; proteína verde fluorescente (PVF) $\lambda_{\text{exc}} = 488\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\ \text{nm}$ y Texas Red, $\lambda_{\text{exc}} = 590\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 615\ \text{nm}$.

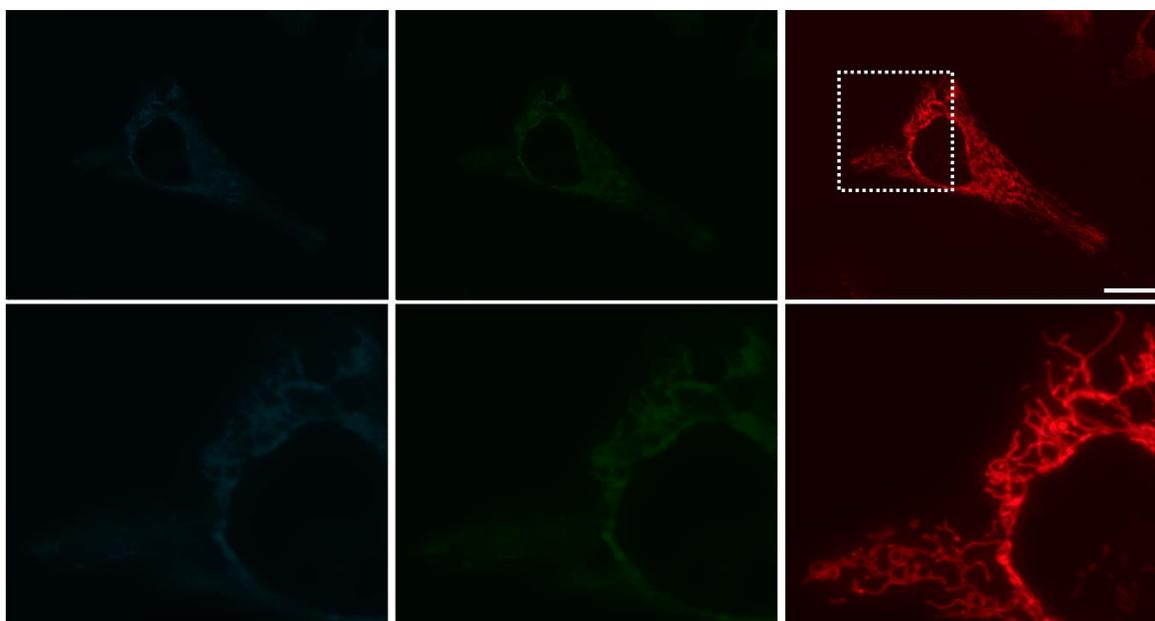


Imagen 5.16. Localización de la Sonda AztecNernst-P. Las imágenes se obtuvieron después de agregar $1\ \mu\text{l}$ de una disolución 5mM preparada en DMSO a un cultivo celular de U251. La configuración confocal que se utilizó de izquierda a derecha fue: DAPI $\lambda_{\text{exc}} = 358\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450\ \text{nm}$; proteína verde fluorescente (PVF) $\lambda_{\text{exc}} = 488\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\ \text{nm}$ y Cy5 $\lambda_{\text{exc}} = 647\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 665\ \text{nm}$. La barra de escala representa $20\ \mu\text{m}$.

Las mitocondrias son el centro respiración aeróbica y las mayores productoras de adenosín trifosfato (ATP) mediante la fosforilación oxidativa generada por la ATP-sintetasa a medida que los protones fluyen a favor de su gradiente electroquímico a través de esta. Presenta un potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de aproximadamente -180 mV (34). Partiendo de este parámetro biofísico las sondas fueron diseñadas para presentar una carga positiva en su estructura. Tomando en cuenta que el pH del citoplasma es de aproximadamente 7.4 y que el pK_a de las sondas es mayor a dicho valor, cuando las sondas entren a la célula se encontrarán en su forma protonada en mayor proporción, por lo que presentarán una carga positiva en el núcleo de benzindolinio lo cual promoverá la interacción de tipo Nernstiana con el potencial de membrana $\Delta\Psi_m$. Una vez dentro, el pH de la matriz mitocondrial es ligeramente alcalino, de 7.8 – 8.0 aproximadamente. Esto significa que, con excepción de AztecNernst-1, la fracción mayor de las sondas estarán desprotonadas, neutralizándose así la carga (35) lo cual generará la retención de aquellas moléculas que estén en su forma no protonada.

Tomando en cuenta lo anterior, el siguiente experimento que se llevó a cabo fue la despolarización de las mitocondrias utilizando cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona (CCCP), el cual es un inhibidor de la fosforilación oxidativa lo que conlleva a estrés oxidativo en la mitocondria y disminuye su potencial (36). Para llevar a cabo este experimento se utilizó la sonda AztecNernst-P, debido a que presentó mejor desempeño en microscopia con localización mitocondrial clara. En primer lugar, se realizó un experimento de colocalización utilizando el marcador comercial de mitocondria MitoTracker™ Green (Invitrogen, M7514) con respuesta de emisión en el canal verde. La colocalización arrojó los resultados esperados al evidenciar un coeficiente de Pearson de 0.978, Imagen 5-17.

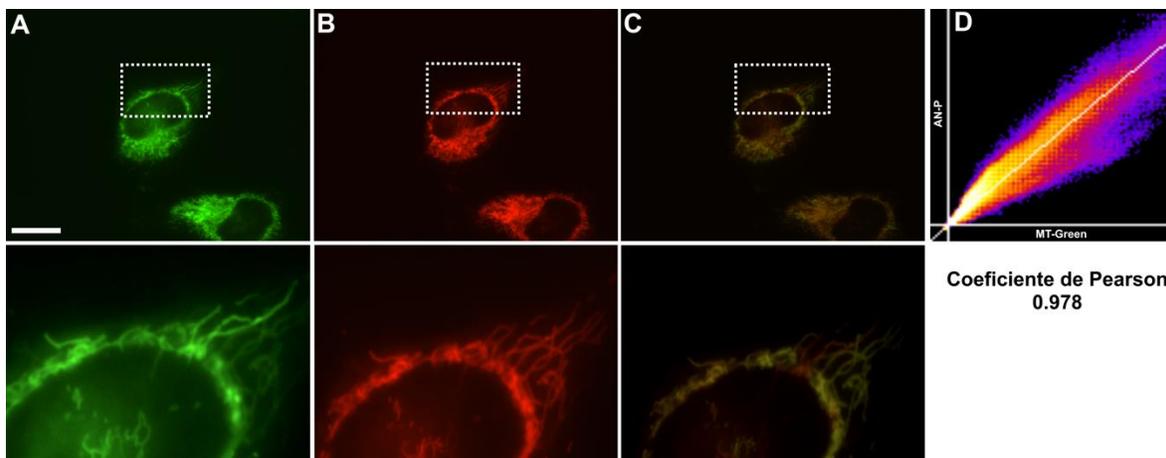


Imagen 5.17. Microscopía de imagen en células vivas U-251 para la colocalización con el marcador comercial MitoTracker™ Green (panel A, PVE, $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$) con la sonda AztecNernst-P (panel B, canal Cy5 $\lambda_{exc} = 647 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 665 \text{ nm}$). El panel C muestra el traslape de canales, mientras que en el panel D se muestra la gráfica de dispersión. El coeficiente de Pearson fue de 0.978 calculado mediante el plugin JACoP del programa Fiji (ImageJ). La barra de escala representa $20 \mu\text{m}$.

A continuación, el siguiente estímulo *in vitro* consistió en despolarizar el potencial de membrana mitocondrial mediante el desacoplante CCCP. Se añadieron de 150 a 500 nM de CCCP y se procedió a tomar las imágenes inmediatamente, Imagen 5-18, panel A. Posteriormente, se esperaron 5 minutos, y se volvieron a tomar las imágenes, panel B. Y posteriormente se tomaron las imágenes a tiempos de 10, 20 y 30 min, paneles C – E. Es importante resaltar que no se observaron diferencias significativas en este ensayo de despolarización mitocondrial, es decir, aún con estímulos fuertes del desacoplante la localización mitocondrial se mantuvo. Lo anterior indica de manera directa que las sondas no interactúan con el potencial mitocondrial al balancear una carga neutra, particularmente en el caso de la sonda AztecNernst-P, donde la localización mitocondrial fue muy limpia, es decir, no presenta distribución en el citosol, solo en la mitocondria, ver Imagen 5.16 canal rojo.

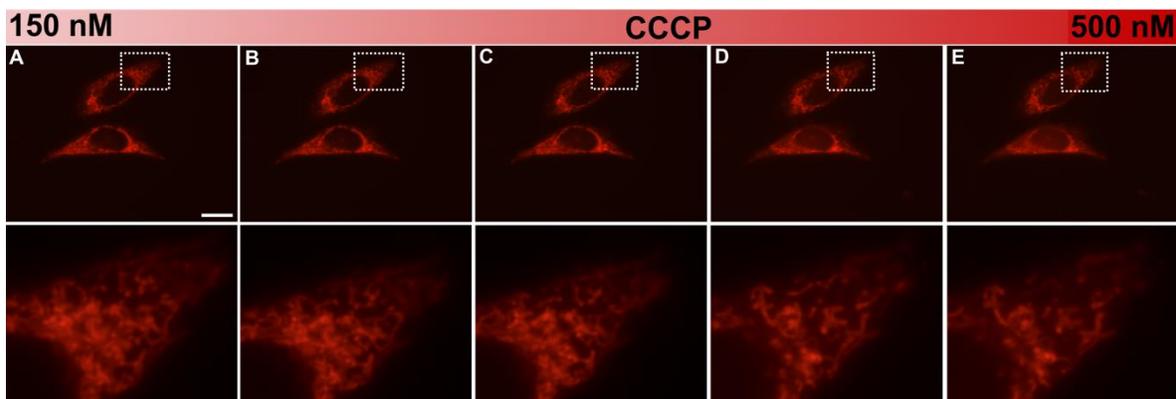


Imagen 5.18. Monitoreo temporal de los cambios de despolarización del potencial de a membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) mediante el desacoplante CCCP en células vivas U-251, detectado en el canal rojo (Cy5 $\lambda_{exc} = 647 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 665 \text{ nm}$) teñido con la sonda AztecNernst-P. Las imágenes fueron grabadas a: (A) tiempo cero; (B) 5 min; (C) 10 min; (D) 20 min y (E) 30 min después de incubación con 150 nM de CCCP. La barra de escala representa 20 μm .

Finalmente, se llevó a cabo la microscopía de imagen de la sonda AztecNernst- Ψ . Como se ha mencionado, dicha sonda se desarrolló con el objetivo de optimizar la localización mitocondrial de la sonda AztecNernst-3 que dirige su localización mitocondrial puramente por el gradiente electroquímico Nernstiano (no de reparto) y presenta buenas propiedades fluorescentes. Con este objetivo, la sonda AztecNernst- Ψ incorpora una función éster, que en presencia de hidrolasas mitocondriales puede neutralizar su carga una vez internalizada en el organelo (37,38).

Para corroborar esta función de retención mitocondrial *via* hidrólisis de éster, se llevó a cabo la incubación en presencia de esterasas nativas y esterasas exógenas añadidas al medio de cultivo, como control se llevó a cabo la imagenología sin añadir esterasas y agregando 1.5 μM del fármaco Loperamida al medio de cultivo, un agente de inhibición de esterasas (38).

De manera interesante, para todos los experimentos realizados ya sea con esterasas exógenas y nativas o inhibiendo éstas últimas, en ningún caso se logró evidenciar la localización mitocondrial selectiva, Imagen 5.19. De hecho, la sonda AztecNernst- Ψ marcó una gran cantidad del contenido intracelular incluyendo la mitocondria. Lo

anterior resultó ser de gran interés ya que tal resultado implica que las enzimas carboxilesterasas presentes en el citosol hidrolizan de inmediato la función éster de la sonda, incluso antes de permear la membrana mitocondrial, haciendo que la AztecNernst- Ψ pierda su carga y no interactúe con el $\Delta\Psi_m$. Otra implicación de este resultado, posiblemente más significativa para el diseño general de sondas mitocondriales, es que se indica que el mecanismo de hidrólisis de ésteres para retener cargos en mitocondria no es tan eficaz como el mecanismo de retención basado únicamente en el gradiente de pH, como se observa en la sonda AztecNernst-3, o en la combinación del gradiente de pH con el gradiente hidrofílico-hidrofóbico, como se ve en la sonda AztecNernst-P.

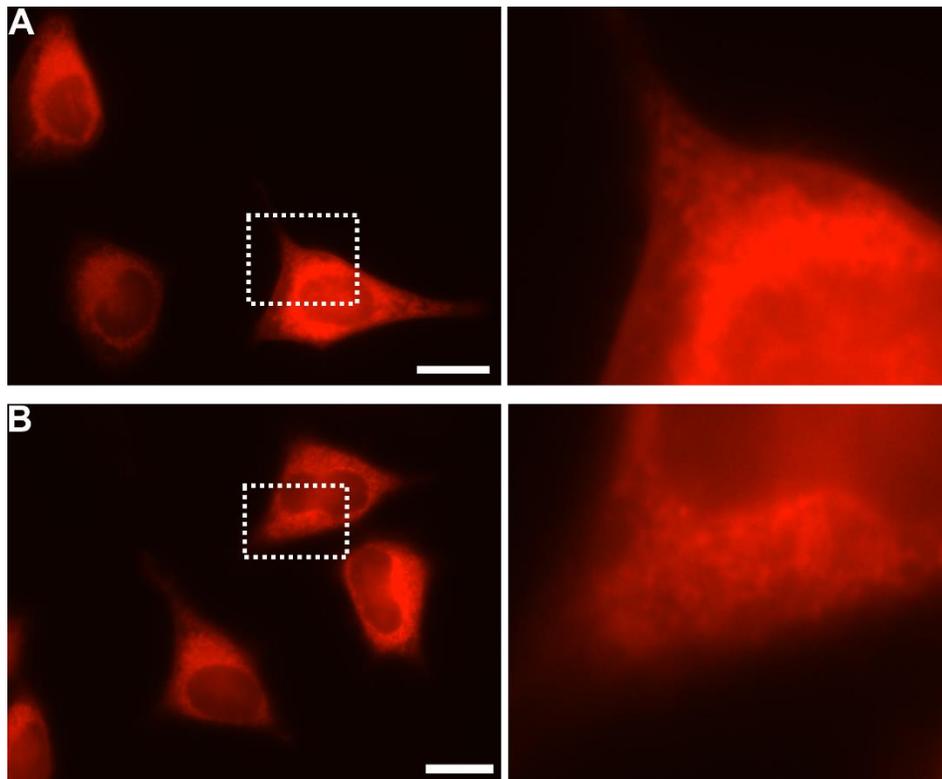


Imagen 5.19. Microscopia de imagen en células vivas U-251 para explorar la retención mitocondrial via hidrólisis de éster en la sonda AztecNernst- Ψ , en el canal rojo ($Cy5 \lambda_{exc} = 647 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 665 \text{ nm}$). El panel A muestra la incubación de la sonda por 30 min en presencia de medio enriquecido con 1 mg/L de esterasas exógenas (Sigma-Aldrich, E3019) añadidas al medio de cultivo. En el panel B se muestra el experimento control, sin añadir esterasas y agregando 1.5 μM del fármaco Loperamida al medio de cultivo, un agente de inhibición de esterasas. En ambos casos, no se observó localización mitocondrial específica. La barra de escala representa 20 μm .

Finalmente, otro experimento consistió en incubar previamente a las células con ácido oleico (OA) y posteriormente teñirlas con las sondas AztecNernst-2, 3 y P, esto con la finalidad de promover la biosíntesis de lípidos en la célula, y el aumento de dicha fase lipídica en las membranas subcelulares. Tomando en cuenta que AztecNernst-P presentó solvatocromismo negativo y que las sondas con esta propiedad son buenos candidatos para medir la polaridad del medio en membranas (19), el estímulo de OA se utiliza comúnmente para alterar la polaridad del ambiente subcelular. Sin embargo, estrictamente hablando, lo que se modifica es el equilibrio hidrofílico-lipofílico, es decir, la composición intracelular de lípidos aumenta, ya sea almacenándose en gotas lipídicas (LDs) o en membranas subcelulares. Los resultados observados revelaron un aumento en la fluorescencia de AztecNernst-2, que ahora presenta fluorescencia en el canal rojo y se dirige selectivamente a las mitocondrias (ver Imagen 5.20). Este resultado indica que la sonda es capaz de dar respuesta fluorescente con un desplazamiento hacia el rojo en ambientes subcelulares más lipofílicos. En contraste, la fluorescencia de AztecNernst-3 parece haber disminuido (ver Figura 5.21), indicando problemas de permeabilidad de dicha sonda. Por último, AztecNernst-P no mostró resultados significativos en comparación con las observaciones sin la adición de ácido oleico (ver Imagen 5.24).

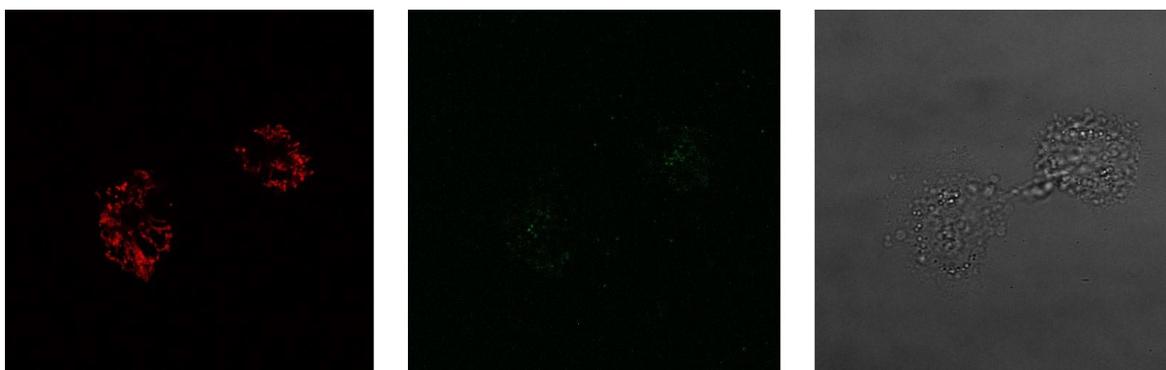


Imagen 5.20. Localización de la Sonda AztecNernst-2. Las imágenes se obtuvieron después de agregar $1\mu\text{L}$ de una disolución 5mM preparada en DMSO a un cultivo celular de U251. Las células fueron previamente incubadas con $1\mu\text{L}$ de ácido oléico por 24 horas. La configuración confocal que se utilizó de izquierda a derecha fue: Texas Red, $\lambda_{\text{exc}}=590\text{nm}$ $\lambda_{\text{em}}=615\text{ nm}$, proteína verde fluorescente (PVF) $\lambda_{\text{exc}}=488\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$ y campo claro.

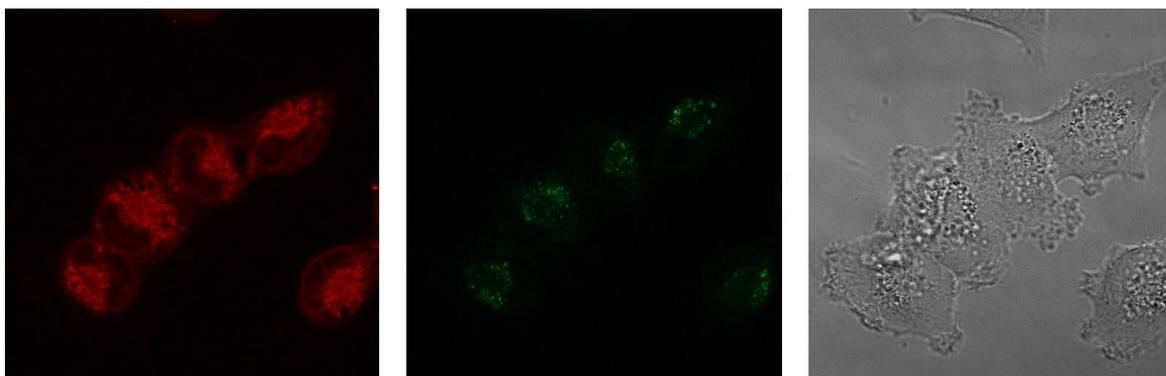


Imagen 5.21. Localización de la Sonda AztecNernst-3 Las imágenes se obtuvieron después de agregar $1\mu\text{L}$ de una disolución 5mM preparada en DMSO a un cultivo celular de U251. Las células fueron previamente incubadas con $1\mu\text{L}$ de ácido oléico por 24 horas. La configuración confocal que se utilizó de izquierda a derecha fue: Texas Red, $\lambda_{\text{exc}}=590\text{nm}$ $\lambda_{\text{em}}=615\text{ nm}$, proteína verde fluorescente (PVF) $\lambda_{\text{exc}}=488\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$ y campo claro.

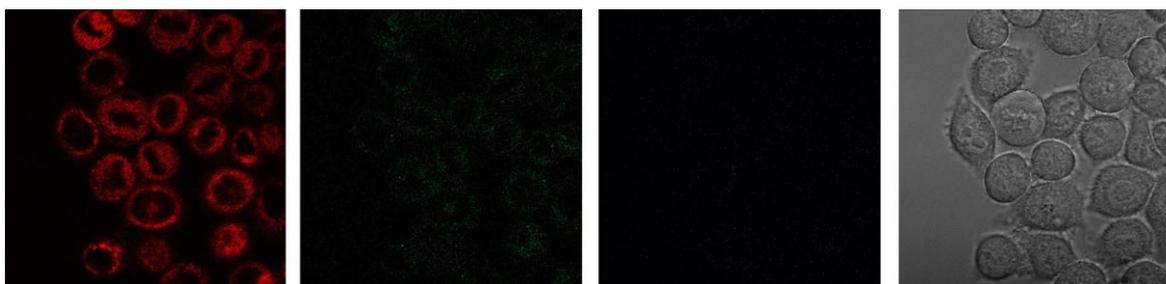


Imagen 5.22. Localización de la Sonda AztecNernst-P Las imágenes se obtuvieron después de agregar $1\mu\text{L}$ de una disolución 5mM preparada en DMSO a un cultivo celular de U251. Las células fueron previamente incubadas con $1\mu\text{L}$ de ácido oléico por 24 horas. La configuración confocal que se utilizó de izquierda a derecha fue: Texas Red, $\lambda_{\text{exc}}=590\text{nm}$ $\lambda_{\text{em}}=615\text{ nm}$, proteína verde fluorescente (PVF) $\lambda_{\text{exc}}=488\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$ y DAPI $\lambda_{\text{exc}} = 358\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450\text{ nm}$ y campo claro.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se mostró el diseño, síntesis y caracterización de una nueva familia de sondas fluorescentes, AztecNernst, con solvatocromismo negativo y selectividad a mitocondria mediante el gradiente de potencial $\Delta\Psi_m$. Todas las sondas sintetizadas presentaron permeabilidad a la membrana plasmática, sin embargo, AN-1 presento nulas propiedades fluorescentes. AN-2 presentó localización mitocondrial en el canal TexasRed, y sus espectros de UV-Vis indican que presenta un ligero solvatocromismo negativo. AN-3 presentó una mejora en la respuesta fluorescente, observándose principalmente en mitocondria en los canales TexasRed, PVF y DAPI, sin embargo, su selectividad presenta la dinámica de equilibrio entre citosol y mitocondria, debido a que el pH de la matriz mitocondrial está en un rango muy cercano a su pK_a se favorece un equilibrio entre su forma protonada (positivamente cargada en el fragmento de benzindolinio) y desprotonada (especie zwitteriónica), lo que provoca que su tinción en mitocondrias sea difusa. Por otro lado, también presentó buena respuesta a la viscosidad. Se logró la síntesis de la sonda AztecNernst- Ψ , la cual presenta una función éster en su estructura con la finalidad de conferirle retención mitocondrial, sin embargo, los estudios de microscopía de imagen mostraron que no presenta selectividad a este organelo, demostrando que en este caso el diseño de retención mediante la desprotonación de una sonda de tipo potencial Nernstiano fue más eficiente que la retención mediante la hidrólisis de una función éster. Finalmente, la sonda AztecNernst-P fue la que mostró la mejor selectividad a mitocondrias, observándose solamente en el canal TexasRed. Además, también mostró las propiedades fotofísicas más interesantes, en la titulación de variación continua THF-Agua y Hexano- CHCl_3 se evidencia la formación de agregados tipo J y la formación de excímeros, respectivamente. De toda la familia AztecNernst es la que presenta un solvatocromismo mayor. Sin embargo, debido a la posición del grupo nitro junto al hidroxilo, estos forman un anillo muy estable que no permite la desprotonación, razón

por la que el solvatocromismo negativo observado en disolventes polares no próticos es muy ligero, 8 nm en absorción, y 20 nm en emisión DMSO-MeOH, ya que no permite la formación del momento dipolar de estado basal. En disolventes polares próticos, el solvatocromismo negativo es más notorio, debido a que los puentes de hidrógeno que forma el disolvente desestabilizan el anillo de seis miembros, lo que permite la formación del dipolo en el estado basal de la molécula.

Debido a que el diseño con un grupo hidroxilo favorece la desprotonación en la matriz mitocondrial de las sondas AztecNernst, el gradiente de pH resultó ser un mecanismo más efectivo para la retención mitocondrial. Además, si bien el solvatocromismo de AztecNernst-P es prometedor, la síntesis de una nueva sonda que impida la formación del anillo de 6 miembros entre el grupo nitro y el hidroxilo fenólico, por ejemplo, cambiar la posición del grupo nitro en el anillo, podría mejorar las propiedades solvatocrómicas negativas de AztecNernst-P.

REFERENCIAS

1. Valeur B. Molecular fluorescence: principles and applications. 2001. 387 p.
2. KASTEN FH. The Origins of Modern Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes. In: Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry. Elsevier; 1989. p. 3–50.
3. Tian X, Murfin LC, Wu L, Lewis SE, James TD. Fluorescent small organic probes for biosensing. Vol. 12, Chemical Science. Royal Society of Chemistry; 2021. p. 3406–26.
4. Murthy KVR, Virk HS. Luminescence phenomena: An introduction. Vol. 347, Defect and Diffusion Forum. Trans Tech Publications Ltd; 2014. p. 1–34.
5. Avramenko AG. Chemical applications of hybridized light-matter states (a review). Voprosy Khimii i Khimicheskoi Tekhnologii. 2023;(4):3–16.
6. Arnaut L, Formosinho S, Burrows H. Transitions between Electronic States. Chemical Kinetics. 2007 Jan 1;385–435.
7. Fleming I & WD. Ultraviolet and Visible Spectra. In: Spectroscopic Methods in Organic Chemistry. Seventh. Springer; 2019.
8. Kafle BP. Molecular luminescence spectroscopy. In: Chemical Analysis and Material Characterization by Spectrophotometry. Elsevier; 2020. p. 269–96.
9. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer; 2006. 954 p.
10. Bernard Valeur. Characteristics of fluorescent emission. In: Molecular Fluorescence Principles and Application. Wiley-VCH; 2001.
11. Randles EG, Bergethon PR. Reaction field analysis and lipid bilayer location for lipophilic fluorophores. Journal of Physical Chemistry B. 2013 Sep 5;117(35):10193–202.

12. Bernard Valeur. Effect of polarity on fluorescence emission. Polarity probes. In: *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. Wiley-VCH; 2001.
13. Rezende MC, Dominguez M, Aracena A, Millán D. Solvatochromism and electrophilicity. *Chem Phys Lett*. 2011 Oct 6;514(4–6):267–73.
14. Marini A, Muñoz-Losa A, Biancardi A, Mennucci B. What is solvatochromism? *Journal of Physical Chemistry B*. 2010 Dec 30;114(51):17128–35.
15. Cha S, Choi MG, Jeon HR, Chang SK. Negative solvatochromism of merocyanine dyes: Application as water content probes for organic solvents. *Sens Actuators B Chem*. 2011 Sep 20;157(1):14–8.
16. Meng S, Caprasecca S, Guido CA, Jurinovich S, Mennucci B. Negative solvatochromism of push–pull biphenyl compounds: a theoretical study. *Theor Chem Acc*. 2015 Dec 1;134(12):1–10.
17. Gonzalez-Garcia MC, Salto-Giron C, Herrero-Foncubierta P, Peña-Ruiz T, Giron-Gonzalez MD, Salto-Gonzalez R, et al. Dynamic Excimer (DYNEX) Imaging of Lipid Droplets. *ACS Sens*. 2021 Oct 22;6(10):3632–9.
18. Danylchuk DI, Jouard PH, Klymchenko AS. Targeted Solvatochromic Fluorescent Probes for Imaging Lipid Order in Organelles under Oxidative and Mechanical Stress. *J Am Chem Soc*. 2021 Jan 20;143(2):912–24.
19. Kajiwara K, Osaki H, Greßies S, Kuwata K, Kim JH, Gensch T, et al. A negative-solvatochromic fluorescent probe for visualizing intracellular distributions of fatty acid metabolites. *Nat Commun*. 2022 Dec 1;13(1).
20. Zhang H, Shi L, Li K, Liu X, Won M, Liu YZ, et al. Discovery of an Ultra-rapid and Sensitive Lysosomal Fluorescence Lipophagy Process. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2022 Mar 7;61(11).
21. Grimm JB, Lavis LD. Caveat fluorophore: an insiders’ guide to small-molecule fluorescent labels. Vol. 19, *Nature Methods*. Nature Research; 2022. p. 149–58.
22. Diaspro A& UC. *Optical Microscopy*. Wiley Online Library; 2006.

23. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014 Oct 1;2014(10):1042–65.
24. Marchand R, Šachl R, Kalbáč M, Hof M, Tromp R, Amaro M, et al. Optical Near-Field Electron Microscopy. *Phys Rev Appl* [Internet]. 2021 Jul 6 [cited 2023 Oct 8];16(1):014008. Available from: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevApplied.16.014008>
25. Brzostowski J, Sohn H. *Confocal Microscopy Methods and Protocols Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2021. Available from: <http://www.springer.com/series/7651>
26. Ueno T, Nagano T. Fluorescent probes for sensing and imaging. Vol. 8, *Nature Methods.* 2011. p. 642–5.
27. Ogundele OM, Adeshina A, Adeniyi PA, Ogedengbe OO, Adekeye AO, Enye LA, et al. Basic Principles of Fluorescence Microscopy OPEN ACCESS Basic Principles of Fluorescence Microscopy. *microscopyWorld Journal of Young Researchers* [Internet]. 2013;3(1):17–22. Available from: <http://www.rrpjournals.org/>
28. Leo A, Hansch C, Elkins D. *Chemical Reviews PARTITION COEFFICIENTS AND THEIR USES.*
29. Connors Kenneth A. Chapter 9. In: *Binding Constants the Measurement of Complex Molecular Stability.* John Wiley & Sons; 1987. p. 411.
30. Hestand NJ, Spano FC. Expanded Theory of H- and J-Molecular Aggregates: The Effects of Vibronic Coupling and Intermolecular Charge Transfer. Vol. 118, *Chemical Reviews.* American Chemical Society; 2018. p. 7069–163.
31. Sanyal S, Painelli A, Pati SK, Terenziani F, Sissa C. Aggregates of quadrupolar dyes for two-photon absorption: The role of intermolecular interactions. *Physical Chemistry Chemical Physics.* 2016;18(40):28198–208.

32. Shi WJ, Wei YF, Yang J, Li HZ, Wan QH, Wang Y, et al. Novel meso-trifluoromethyl BODIPY-based near-infrared-emitting fluorescent probes for organelle-specific imaging of cellular viscosity. *Sens Actuators B Chem.* 2022 May 15;359.
33. Kuimova MK, Yahioglu G, Levitt JA, Suhling K. Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging. *J Am Chem Soc.* 2008 May 28;130(21):6672–3.
34. Klier PEZ, Martin JG, Miller EW. Imaging Reversible Mitochondrial Membrane Potential Dynamics with a Masked Rhodamine Voltage Reporter. *J Am Chem Soc.* 2021 Mar 24;143(11):4095–9.
35. Zhu Y, Pan H, Song Y, Jing C, Gan JA, Zhang J. Mitochondria-targeted fluorescent probe for rapid detection of thiols and its application in bioimaging. *Dyes and Pigments.* 2021 Jul 1;191.
36. Koncha RR, Ramachandran G, Sepuri NB V., Ramaiah KVA. CCCP-induced mitochondrial dysfunction – characterization and analysis of integrated stress response to cellular signaling and homeostasis. *FEBS Journal.* 2021 Oct 1;288(19):5737–54.
37. Steiger AK, Marcatti M, Szabo C, Szczesny B, Pluth MD. Inhibition of Mitochondrial Bioenergetics by Esterase-Triggered COS/H₂S Donors. *ACS Chem Biol.* 2017 Aug 18;12(8):2117–23.
38. Quinney SK, Sanghani SP, Davis WI, Hurley TD, Sun Z, Murry DJ, et al. Hydrolysis of capecitabine to 5'-deoxy-5-fluorocytidine by human carboxylesterases and inhibition by loperamide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2005 Jun;313(3):1011–6.

Anexos

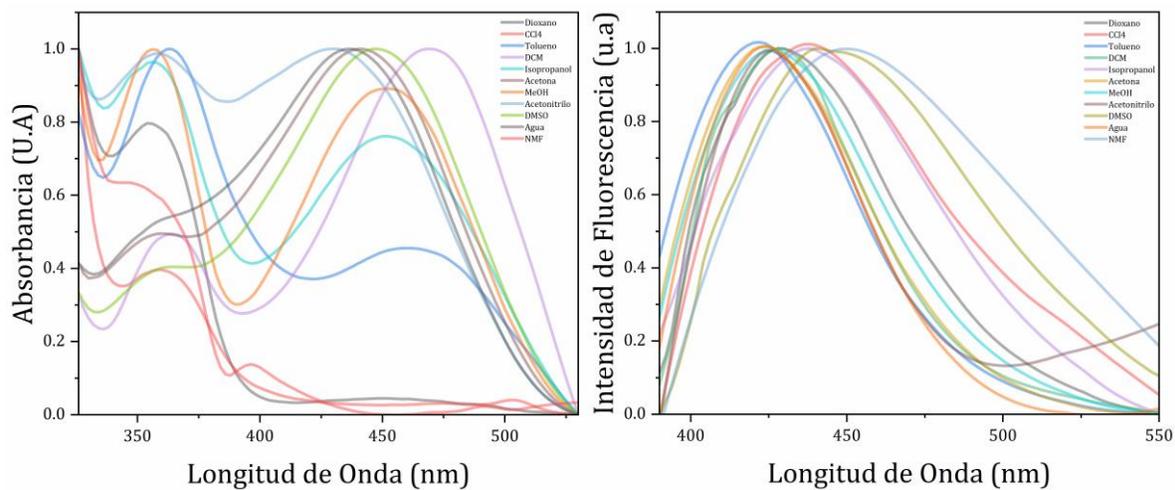


Imagen 1. Espectro de absorbancia normalizada (izquierda) e intensidad de fluorescencia normalizada (derecha) para la sonda AztecNernst-1 evaluada en distintos disolventes con polaridad creciente.

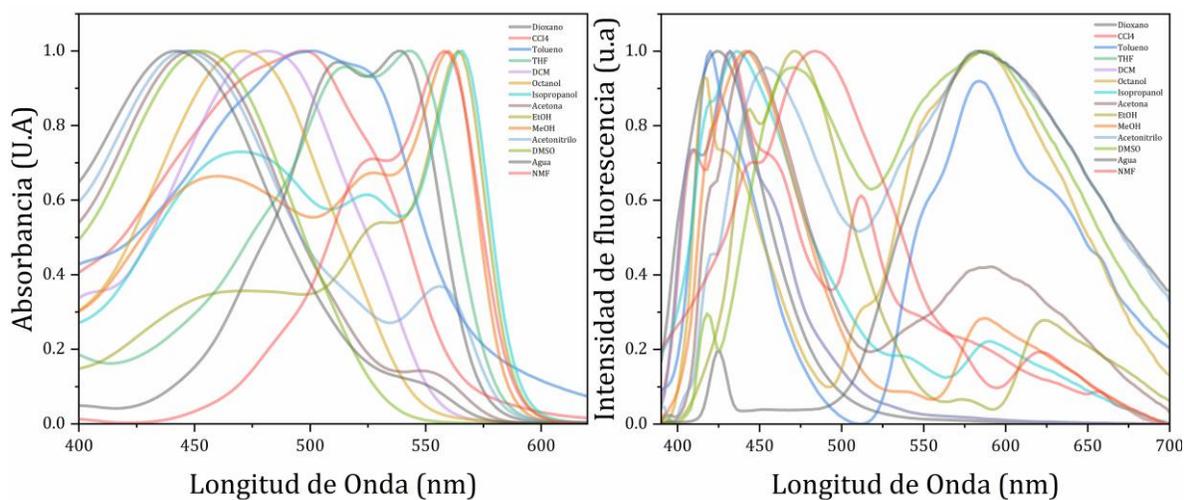


imagen2. Espectro de absorbancia normalizada (izquierda) e intensidad de fluorescencia normalizada (derecha) para la sonda AztecNernst-3 evaluada en distintos disolventes con polaridad creciente.

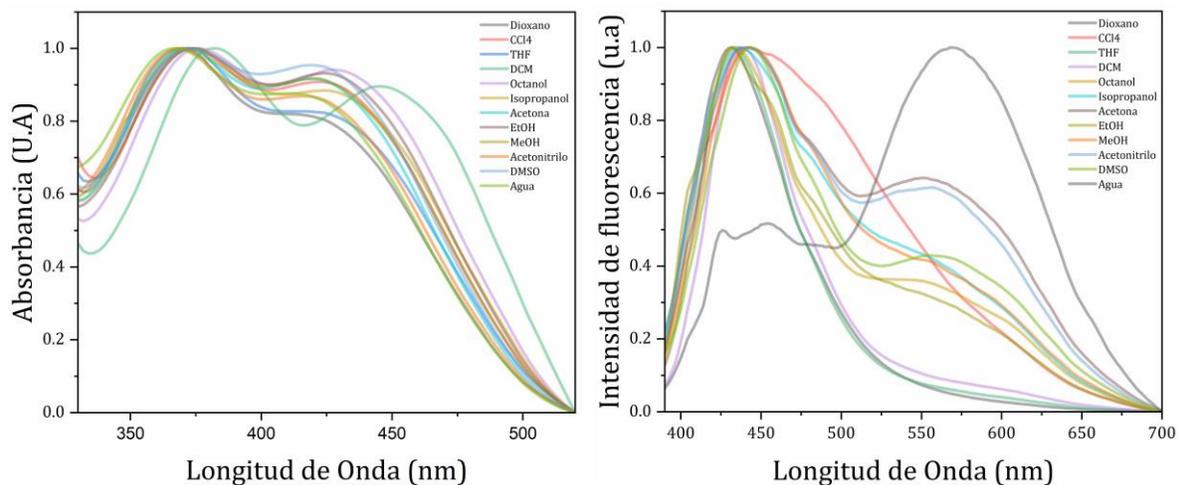


Imagen 3. Espectro de absorbancia normalizada (izquierda) e intensidad de fluorescencia normalizada (derecha) para la sonda AztecNernst- ψ evaluada en distintos disolventes con polaridad creciente.

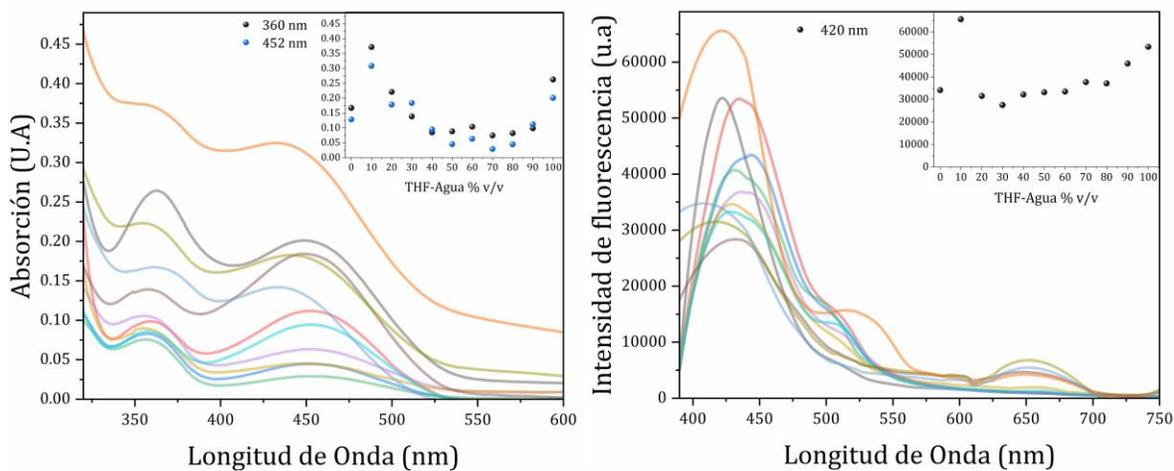


Imagen 4. Espectro de absorbancia (izquierda) e intensidad de fluorescencia (derecha) para la sonda AztecNernst-1 evaluada en mezclas de THF-Agua % v/v

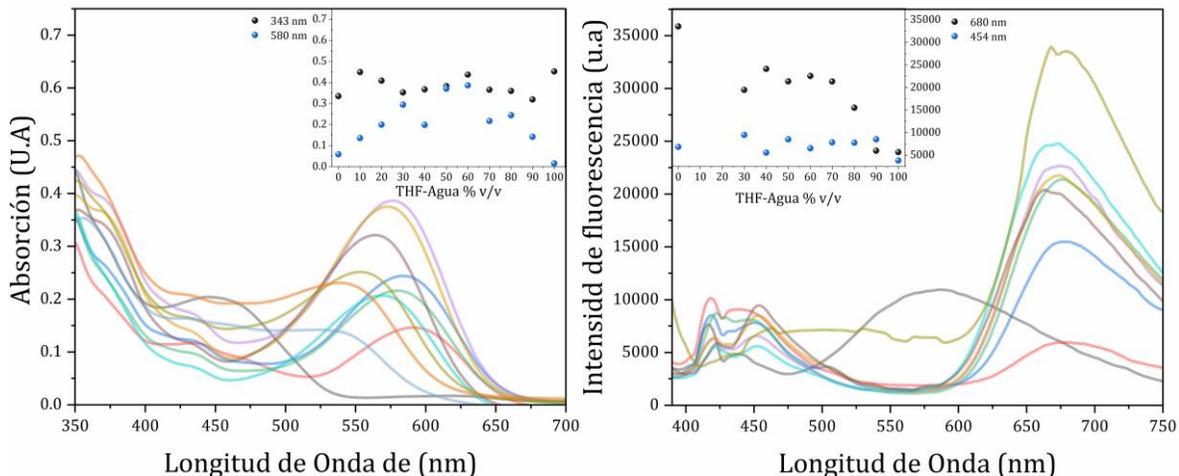


Imagen 5. Espectro de absorbancia (izquierda) e intensidad de fluorescencia (derecha) para la sonda AztecNernst-2 evaluada en mezclas de THF-Agua % v/v.

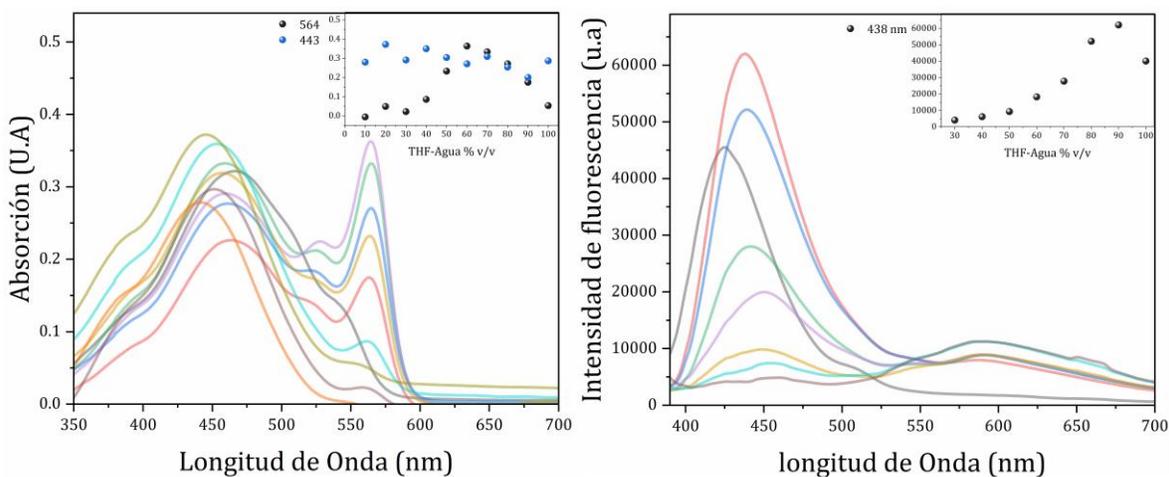


Imagen 6. Espectro de absorbancia (izquierda) e intensidad de fluorescencia (derecha) para la sonda AztecNernst-3 evaluada en mezclas de THF-Agua % v/v.

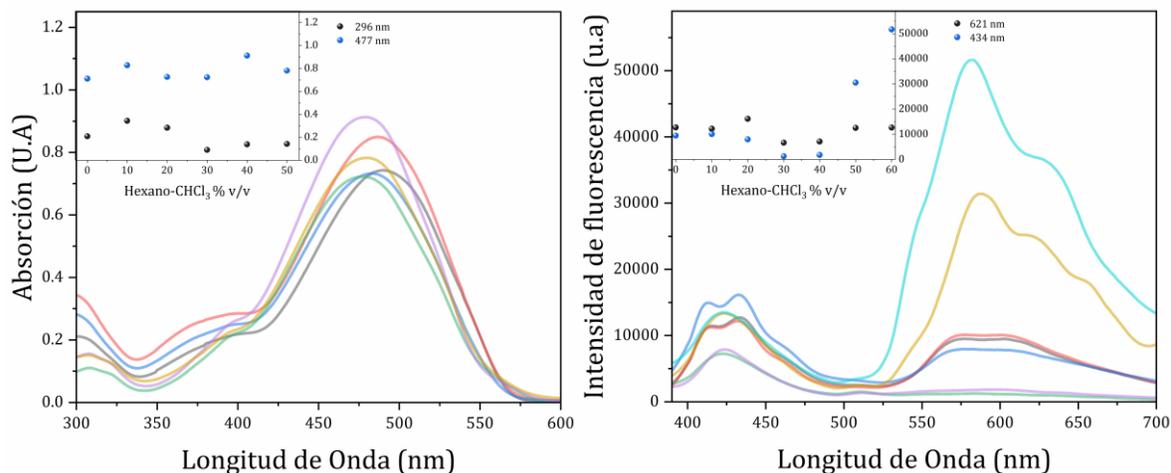


Imagen 7. Espectro de absorbancia (izquierda) e intensidad de fluorescencia (derecha) para la sonda AztecNernst-3 evaluada en mezclas de Hexano-CHCl₃ % v/v.

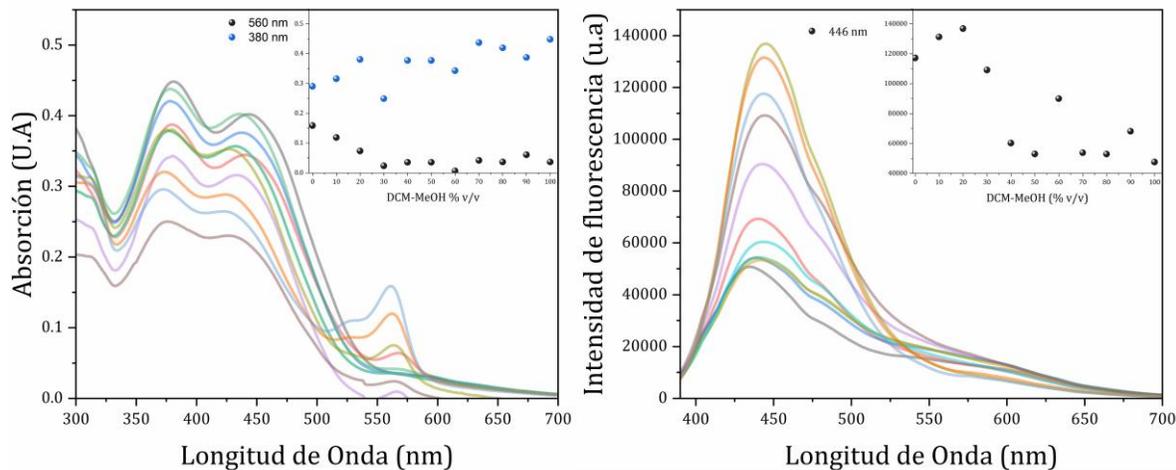


Imagen 8. Espectro de absorbancia (izquierda) e intensidad de fluorescencia (derecha) para la sonda AztecNernst-ψ evaluada en mezclas de DCM-MeOH % v/v.

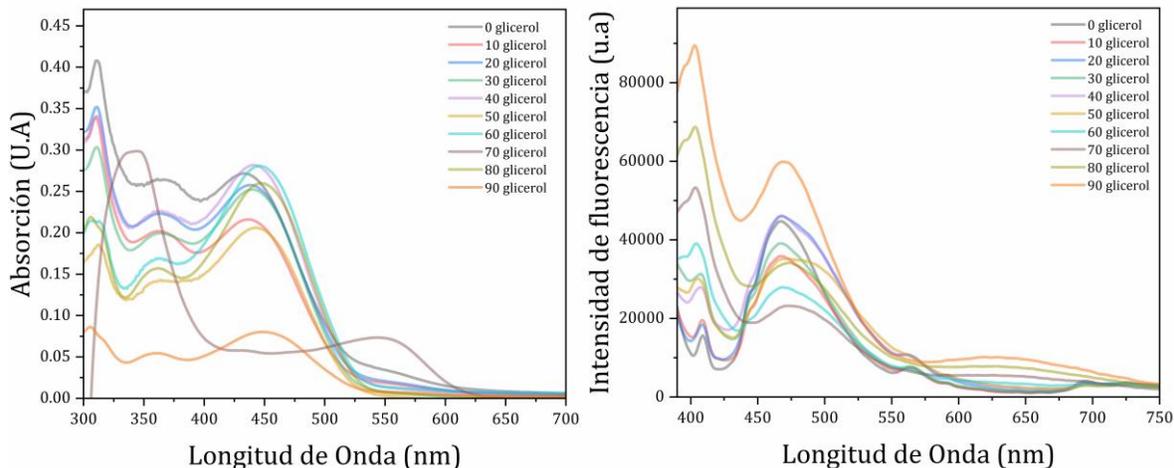


Imagen 9. Espectro de absorbancia (izquierda) e intensidad de fluorescencia (derecha) para la sonda AztecNernst-1 evaluada en mezclas de Glicerol-Agua % v/v.

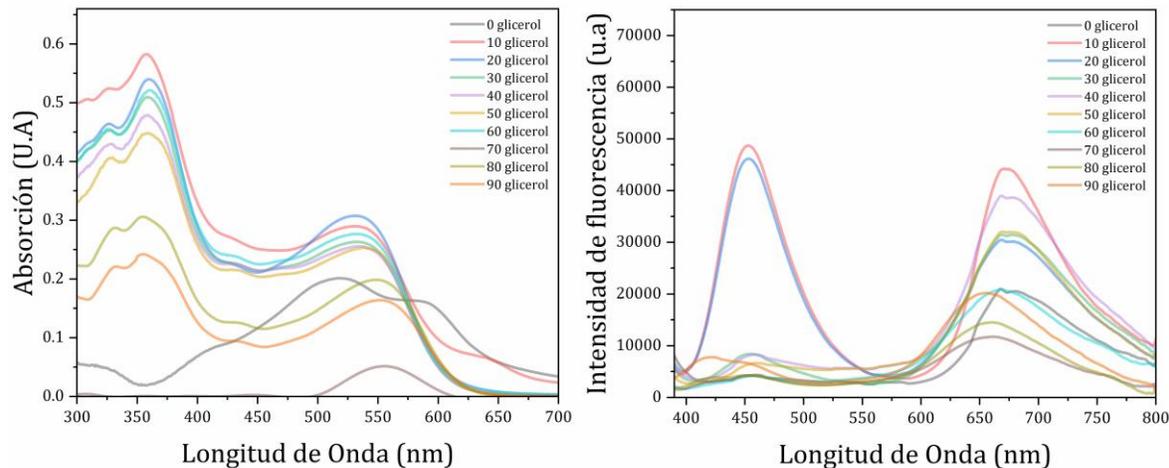


Imagen 10. Espectro de absorbancia (izquierda) e intensidad de fluorescencia (derecha) para la sonda AztecNernst-2 evaluada en mezclas de Glicerol-Agua % v/v.

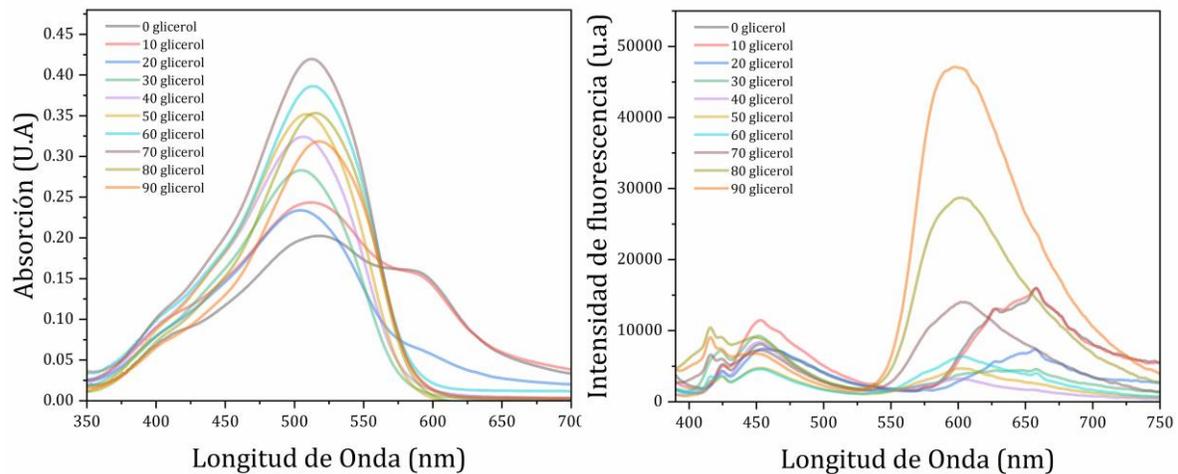


Imagen 11. Espectro de absorbancia (izquierda) e intensidad de fluorescencia (derecha) para la sonda AztecNernst-P evaluada en mezclas de Glicerol-Agua % v/v.