



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Síntesis, caracterización química y foto-física de rotores moleculares derivados de BODIPYs y su evaluación como sensores fluorescentes de viscosidad

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

QI. DIEGO ISAAC MARTINEZ BOURGET

**TUTOR: DR. JOSÉ NORBERTO FARFÁN GARCÍA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser el espacio donde se genera a la materia prima que se encargará de transformar para bien a la nación. Un espacio poli cultural, cuna del pensamiento científico, social y crítico cuyo objetivo es el progreso humano administrado desde la formación académica. Es un orgullo pertenecer no a una universidad, sino a *La* universidad, la máxima casa de estudios.

A la Facultad de Química por ser el espacio que me permitió desenvolverme como alumno y como persona gracias a su alta excelencia académica, a sus profesores y a sus espacios por los que han transitado de los más grandes científicos mexicanos.

Mi más sincero agradecimiento a mi asesor, el Dr. Norberto Farfán, por ser una persona que siempre me apoyó durante mi corta estancia en mis estudios de maestría y por ser una persona de excelente calidad humana.

Agradezco enormemente al CONACyT por el apoyo otorgado. Número de becario: 606071.

A la Dra. Rosa Santillan Baca y a la M.C. Ma. Eugenia Ochoa Becerra del Cinvestav, así como a la M.C. Nayeli López Balbiaux de la USAII por auxiliarme en la parte espectroscópica. Al Dr. Vianney Ortiz Navarrete, al Biól. Benjamín Ortiz López y a la Q.F.B. Leticia Alemán Lazarini del Cinvestav por su ayuda en la parte de aplicación biológica y en la adquisición de las imágenes de microscopía confocal. A la Q. Marisela Gutiérrez Franco de la USAII por facilitarme el espectrofotómetro de UV-Vis. Al Dr. David Díaz de la F.Q. por facilitarme el fluorómetro para la parte de la caracterización fotofísica y a la M.C. Margarita Romero Ávila de la F.Q. por todo el apoyo brindado en todo este tiempo.

Una especial mención a mis sinodales por sus consejos, correcciones y sugerencias en la revisión del manuscrito; Dr. Armando Ariza Castolo, Dr. José Luis Arias Tellez, Dr. Héctor García Ortega, Dr. Braulio Víctor Rodríguez Molina y Dr. Alejandro Dorazco González, muchas gracias.

A mis padres Leoncio y Araceli, a mis hermanos Rodrigo y David, mi abuela Xóchitl, mis todos mis tíos, primos y sobrinos que siempre me han apoyado y, por último, pero no menos importante, a todos mis amigos y compañeros del F-204 y B-201; Pablo Labra, Cristian Guzmán, Miguel Palma, Mónica Farfán, Geraldine Castro, Luis Blancarte, Aylin Galindo, Marelis Juárez, Rossi Mazariegos, Emilio de la Cerda, Ricardo Corona, Omar Merino, Luis Sánchez, Nancy Aguilar, Oscar González, Cristina Jiménez, Alejandro Enríquez, Andrés León y a todos aquellos que haya olvidado mencionar, gracias infinitas por los buenos momentos que me hicieron pasar en el laboratorio o en las juntas.

Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio 204 del Edificio F de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**), perteneciente al Departamento de Química Orgánica, bajo la asesoría del Dr. José Norberto Farfán García y con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**), número de becario: **606071**, así como al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (**PAIP**) y a el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT-IN216616**).

Parte de los resultados aquí contenidos fueron presentados en “IV Simposio Mexicano de Química Supramolecular” bajo la modalidad de cartel.

Adicionalmente, se hizo una estancia de investigación con el apoyo de **CONACyT** en el Laboratoire de Chimie de Coordination - Centre National de la Recherche Scientifique (LCC-CNRS) en Toulouse, Francia, bajo la tutoría de Dr. Pascal G. LACROIX.

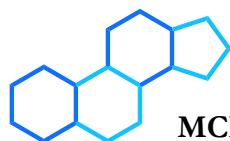
ÍNDICE

Abreviaturas y símbolos	ii
Introducción	1
Antecedentes	2
Rotores moleculares	2
Conceptos teóricos	3
Sensores de viscosidad	3
Sensores ratiométricos	5
Rotores basados en el tiempo de vida fluorescente	6
Rotores moleculares con BODIPYs	7
Hipótesis	9
Objetivos	9
Objetivo general	9
Objetivos secundarios	9
Resultados y discusión	10
Síntesis y caracterización espectroscópica	10
Caracterización fotofísica y dependencia de la viscosidad	13
Aplicación biológica	16
Conclusiones	19
Procedimiento experimental	20
Reactivos e instrumentación	20
Cultivos celulares microscopía confocal	20
Cálculos de rendimiento cuánticos	20
Síntesis y caracterización	21
Referencias	24



ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

BODIPY	Dipirrometeno de boro
EES	Etinilestradiol
TICT	Transferencia de carga intramolecular torcida
DMABN	4-dimetilaminobenzonitrilo
DCVJ	9-(dicianovinil)-julolidina
CCVJ	9-(2-carboxy-2-cianovinil)-julolidina
Φ_F	Rendimiento cuántico de fluorescencia
τ_F	Tiempo de vida fluorescente
k_r	Tasa de decaimiento radiativo
k_{nr}	Tasa de decaimiento no radiativo
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
mPa	Milipascales
s	Segundo
RET	Transferencia de energía de resonancia
cps	Cuentas por segundo
nm	Nanómetros
FLIM	Microscopia de imágenes de tiempo de vida fluorescente
cP	Centipoise
ns	Nanosegundo
η	Viscosidad
TCSPC	Conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo
ps	Picosegundos
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
BF₃·Et₂O	Eterato de trifluoruro de boro
TFA	Ácido trifluoroacético
DIPA	Diisopropilamina
THF	Tetrahidrofurano
RMN	Resonancia magnética nuclear
Hz	Hertz
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
ESI-TOF	Ionización de electro spray – tiempo de vuelo
ppm	Partes por millón
λ_{max}	Longitud de onda de máxima absorción
ϵ	Coefficiente de atenuación molar
ICT	Transferencia de carga intramolecular
R²	Coefficiente de determinación
Uv-Vis	Ultravioleta-visible



MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
μM	Micromolar
DMSO	Dimetilsulfóxido
h	Horas
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bovino
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
u.a.	Unidad adimensional
I	Intensidad fluorescente
RE	Retículo endoplásmico
CCF	Cromatografía en capa fina
TMS	Trimetilsilano
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
cm	Centímetros
mmol	Milimol
g	Gramos
mL	Mililitros
M	Molar
DCM	Diclorometano
Hex	Hexano
AcOEt	Acetato de etilo
Et₃N	Trietilamina
δ	Desplazamiento químico
PBS	Buffer fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
COSY	Espectroscopía de correlación ¹ H- ¹ H
HSQC	Espectroscopía de correlación a un enlace
HMBC	Espectroscopía de correlación a múltiples enlaces
NOESY	Espectroscopía de efecto nuclear Overhauser

Síntesis, caracterización química y foto-física de rotores moleculares derivados de BODIPYs y su evaluación como sensores fluorescentes de viscosidad

INTRODUCCIÓN

La viscosidad es la medida de la resistencia de un fluido a ser deformado por esfuerzo cortante o tensión de tracción. Es una propiedad del fluido que se opone al movimiento relativo entre las dos superficies del fluido que se mueven a diferentes velocidades. En términos simples, la viscosidad se refiere a la fricción entre las moléculas de un fluido. La viscosidad es de mayor importancia cuando se habla de la industria química^[1] y en muchos procesos y sistemas biológicos.

Un ejemplo de estos sistemas son las células donde el ambiente local (microambiente) está determinado por una serie de factores además de la viscosidad (como la temperatura y el pH) que influyen en su debido funcionamiento. Más aún, los microambientes intracelulares son heterogéneos con diferentes composiciones en varias partes de la misma, por ejemplo, en el citosol, los organelos o las membranas, y el microambiente en cada ubicación juega un papel esencial en diversos procesos biológicos, como el transporte intracelular de masa y energía, la transducción de varias señales, en la conectividad o difusión de macromoléculas y vesículas en el citosol,^[2] en el movimiento correlacionado de proteínas membranales,^[3] la actividad de las enzimas y las tasas de metabolismo celular.^[4]

En los seres vivos, un gran número de procesos celulares están relacionados con la viscosidad o con procesos controlados por difusión. Los cambios en la viscosidad tanto a nivel celular como a nivel del organismo también pueden desencadenar procesos directamente relacionados con enfermedades y el mal funcionamiento en el cuerpo humano.^[5] En las células, la biomecánica celular está determinada principalmente por la membrana celular, el citoesqueleto y el citoplasma. Si bien el citoesqueleto se puede imaginar como un marco relativamente rígido, tanto el citoplasma como la membrana celular tienen propiedades viscoelásticas que cambian en varios estados de algunas enfermedades^[6] como pueden ser: enfermedades cardiovasculares ligadas a la fluidez de la membrana de eritrocitos,^[7] malignidad celular,^[8] arterosclerosis,^[9] enfermedad de Alzheimer^[10] y diabetes.^[11]

A lo largo de los años, se han desarrollado muchas metodologías con las cuales se puede determinar la viscosidad de un medio, sin embargo, la mayoría de éstas involucran la medición de la viscosidad mediante métodos mecánicos que miden la fricción interna de líquidos bajo tensión cortante, pero hay que tomar en cuenta que, en muchos casos, la micro-viscosidad de algunos sistemas (como las células) no es homogénea y puede variar de la viscosidad macroscópica. Por tales motivos es necesario el tener acceso a procedimientos o técnicas que puedan medir la viscosidad en microambientes y que además sean lo suficientemente sensibles y fehacientes en las mediciones del objeto estudiado.

ANTECEDENTES

Rotores moleculares

Con el fin de poder medir la viscosidad en ciertos sistemas de una forma rápida y fidedigna, en los últimos años, se han desarrollado compuestos con la característica de ser sensores de viscosidad por medio de la fluorescencia denominados rotores moleculares.^[4] Éstos, cuentan con un fluoróforo y un conjugado rotacional el cual es capaz de girar en relación con la molécula completa.

Esta clase de compuestos se pueden encontrar en estado sólido y en disolución. Mientras que en el estado sólido la principal aplicación que se les ha dado es como cristales anfidinámicos para la construcción de máquinas o dispositivos moleculares, en disolución, las principales aplicaciones que han tenido son como sondas fluorescentes para el estudio de bio-imágenes en células y como sensores de viscosidad.^[5] En el estado sólido, la nomenclatura más empleada es llamar a la parte que experimenta el movimiento rotacional “rotador” y “estator” a la parte que sirve como marco de referencia del movimiento con respecto al componente móvil (rotador). Por motivos prácticos, en este escrito se empleará la misma nomenclatura.

Los rotores moleculares diseñados como sondas de viscosidad deben contener en su estructura una parte que pueda presentar dinámica rotacional y un fluoróforo que forme estados de transferencia de carga intramolecular torcidos (TICT por sus siglas en inglés) después de la foto-excitación dado que puedan exhibir dos rutas competitivas de pérdida de energía al estado basal: emisión de fluorescencia y desexcitación del estado TICT de forma no radiativa, es decir, sin emisión de fotones.^[12] En la Figura 1 se muestran algunos de los típicos rotores TICT: 4-dimetilaminobenzonitrilo (DMABN, **1**), 9-(dicianovinil)-julolidina (DCVJ, **2**) y 9-(2-carboxy-2-cianovinil)-julolidina (CCVJ, **3**).

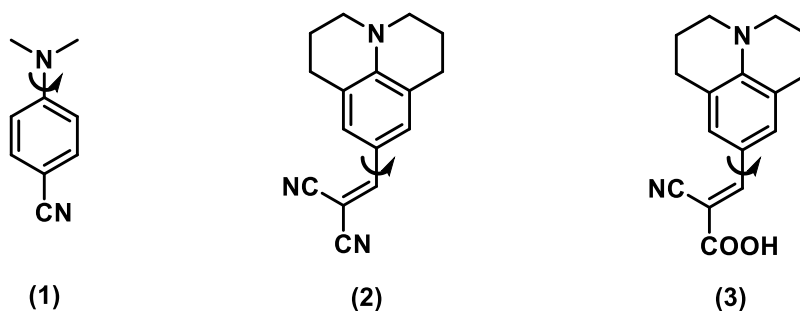


Figura 1. Ejemplos de rotores moleculares TICT

En ambientes no viscosos, la rotación del rotador es menos impedida por lo que se favorece la pérdida de energía por vías no radiativas, caso contrario a cuando se tienen medios viscosos en los que la rotación es más restringida favoreciendo la vía radiativa para la pérdida de energía después de la foto-excitación, lo que se traduce en un aumento en la intensidad de fluorescencia o en un alargamiento en el tiempo de vida de fluorescencia.



Conceptos teóricos

El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) y el tiempo de vida fluorescente (τ_f) está dado por la Ecuación (1):

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau_f \quad (1)$$

donde k_r y k_{nr} son la tasa de decaimiento radiativo y no radiativo respectivamente.

Förster y Hoffmann^[3] encontraron una expresión matemática, Ecuación (2), que relaciona el Φ_F con la viscosidad del medio (η). Esta ecuación, conocida comúnmente como ecuación Förster-Hoffmann, la lograron deducir al examinar algunos colorantes de trifenilamina con características TICT de forma analítica y experimentalmente.

$$\Phi_F = z\eta^\alpha \quad (2)$$

$$\log \Phi_F = \alpha \log \eta + z \quad (3)$$

donde z es una constante dependiente de la temperatura y α es una constante dependiente del colorante. Como se puede apreciar en la Ecuación (3) existe una relación lineal del rendimiento cuántico de fluorescencia en función de la viscosidad.

También se debe señalar que, de acuerdo con la teoría de Förster-Hoffmann, la Ecuación (2) sólo es válida en un intervalo intermedio limitado de viscosidades. A bajas viscosidades, Φ_F se vuelve independiente del disolvente, mientras que a muy altas viscosidades, la relajación radiativa del estado excitado predomina sobre los procesos no radiantes y, por lo tanto, Φ_F tiene un nivel de dependencia superficial de la viscosidad. Se espera que los intervalos exactos de viscosidad donde es útil la ecuación Förster-Hoffmann varíen dependiendo de las propiedades foto-físicas del rotor molecular en particular y del mecanismo responsable del comportamiento de fluorescencia sensible a la viscosidad.^[5]

Tomando la definición de Φ_F de la Ecuación (1), sustituyéndola en la Ecuación (2) y resolviendo para τ_f se obtienen las Ecuaciones (4) y (5).

$$\tau_f = \frac{z\eta^\alpha}{k_r} \quad (4)$$

$$\log \tau_f = \log \left(\frac{z}{k_r} \right) + \alpha \log \eta \quad (5)$$

Por lo tanto, un gráfico de $\log \tau_f$ en función de $\log \eta$ también debería producir una línea recta con una pendiente igual a α . La línea recta, típicamente observada solo en un intervalo intermedio de viscosidades, sirve como una gráfica de calibración para rotores moleculares.^[5] Nótese que la ordenada al origen proporciona información sobre la constante k_r para la molécula.

Sensores de viscosidad

Dentro de las principales ventajas que tienen los rotores moleculares fluorescentes para la medición de la viscosidad en comparación con los métodos mecánicos son las pequeñas cantidades que se necesitan para las mediciones de fluorescencia, su alta resolución espacial y respuesta instantánea a su entorno y la mayor precisión con la que pueden medir cambios de

viscosidad en especial a valores bajos de viscosidad^[14] como en la Figura 2 donde se observa una desviación estándar más pequeña en las mediciones fluorescentes en comparación con las mediciones mecánicas convencionales lo que indica una mayor precisión.

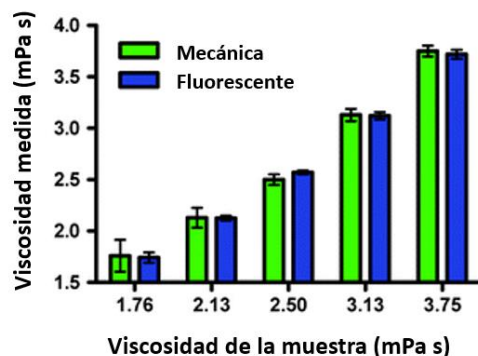


Figura 2. Comparación de precisión entre un viscosímetro mecánico de cono y placa y la viscosidad calculada a partir de mediciones de intensidad fluorescente

Loufty *et al.*^[15] fueron los primeros en reportar una serie de compuestos (**3-5**) con características de rotores moleculares que presentan cambios en la fluorescencia en función de la viscosidad y de la temperatura con los que se midieron la rigidez torsional de algunos disolventes (Figura 3). Estos compuestos resultaron ser dependientes de la polaridad del medio y debido a la relajación interna torsional, presentan una rápida desactivación del estado excitado. Más tarde, Reed *et al.*^[16] emplearon el compuesto **3** para estimar la micro-viscosidad de micelas de dodecil sulfato de sodio y vesículas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

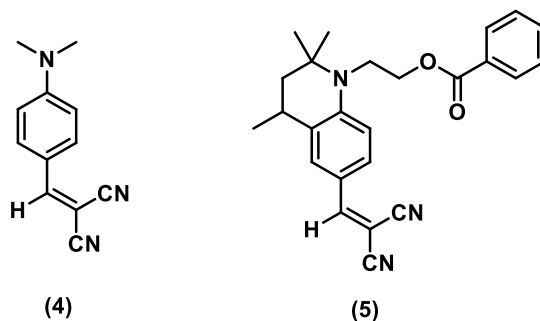


Figura 3. Rotores moleculares 4 y 5

A partir de estos trabajos previos, se han sintetizado varios rotores moleculares con los que se espera poder medir la viscosidad en micro-ambientes, en especial en células por el gran interés biológico que estos sistemas representan. Cabe resaltar que cambios estructurales en estas moléculas no alteran las propiedades foto-físicas de estos compuestos mientras se mantenga el sistema *push-pull* intacto. Con esto en mente y con el objetivo de poder medir la viscosidad en medios específicos, se han realizado cambios estructurales a rotores moleculares con la finalidad de hacer más selectivo su anclaje o deposición en partes celulares de interés.

Por ejemplo, Heidekker *et al.*^[17] sintetizaron una familia de compuestos derivados de la DCVJ (compuesto **2**), que presentan cadenas de hidrocarburos de diferentes tamaños en estos rotores moleculares con la finalidad de incrementar la compatibilidad hacia la membrana celular. Estos compuestos cumplieron con su objetivo reduciendo su migración hacia el interior de la célula,

pero no lo pudieron hacer del todo, ya que se observó su presencia en el citosol. Posteriormente, este grupo de trabajo sintetizó otra familia de rotores moleculares unidos a fosfolípidos,^[18] los cuales se localizaron por completo en la membrana plasmática de células vivas conservando la propiedad característica un rotor molecular; rendimientos cuánticos de fluorescencia dependientes de la viscosidad.

Para determinar cuantitativamente la microviscosidad celular o sus variaciones no sólo se necesitan sensores de viscosidad basados en la intensidad de fluorescencia, ya que pueden existir variaciones espaciales en la concentración y la heterogeneidad de los medios intracelulares.^[4] Bajo esta premisa, se han desarrollado principalmente dos enfoques para poder lograr sondas fluorescentes capaces de medir la microviscosidad en medios heterogéneos que son el uso de sensores ratiométricos y rotores basados en el tiempo de vida fluorescente.

Sensores ratiométricos

Los sensores ratiométricos funcionan teniendo dos fragmentos fluorescentes en el mismo compuesto, uno actuando como referencia interna de fluorescencia y el otro como sensor de viscosidad, así, dividiendo la intensidad de emisión del sensor por la intensidad de emisión de referencia se produce una intensidad normalizada que no sólo elimina algunos de los artefactos relacionados con el fluido y la concentración, sino también proporciona un medio para cuantificar la viscosidad mediante una referencia interna. Un ejemplo de estos compuestos es el sintetizado por Haidekker *et al.*^[19] (compuesto **6** Figura 4) donde el fluoróforo de referencia es el núcleo de la cumarina (azul) y el fluoróforo sensible a cambios de viscosidad es el señalado en color verde.

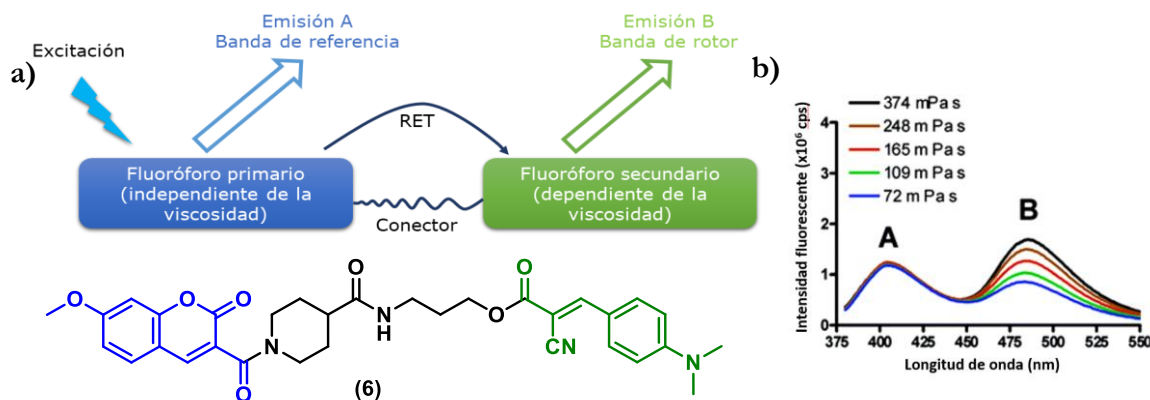


Figura 4. a) Compuesto 6, ejemplo de sensor ratiométrico. b) Espectro de emisión del compuesto 6 excitado a 360 nm a diferentes mezclas de etilenglicol/glicerol variando la viscosidad del medio. A corresponde a la banda de la cumarina (referencia) con $\lambda_{\text{max}} = 402$ nm y B corresponde a la banda de RET con $\lambda_{\text{max}} = 480$ nm.

Se necesitan esencialmente tres condiciones para poder construir un sensor ratiométrico. En primer lugar, el compuesto debe contener un rotor molecular que forme estados TICT después de la foto-excitación y una segunda unidad fluorescente que no tiene que ser sensible a la viscosidad, los cuales deben estar acoplados covalentemente; el segundo fluoróforo sirve como referencia de calibración. En segundo lugar, las dos unidades fluorescentes deben formar un par de transferencia de energía de resonancia (RET); por lo tanto, se necesita un enlazador rígido que mantenga las unidades a una distancia aproximadamente igual a la distancia de Förster. En

tercer lugar, el traslape espectral debe elegirse de modo que la emisión del fluoróforo de referencia actúe como el donante de transferencia de energía de resonancia

Como se puede observar en (b) de la Figura 4 no hay cambios en la intensidad fluorescente de la banda de emisión de la cumarina (402 nm) al cambiar la viscosidad del medio a diferencia de la banda de 480 nm correspondiente al fluoróforo dependiente de la viscosidad ocasionada por RET.

Rotores basados en el tiempo de vida fluorescente

El tiempo de vida de fluorescencia se refiere al tiempo promedio que la molécula permanece en estado excitado antes de emitir un fotón. Esta propiedad se ha explotado en los últimos años en aplicaciones como transferencia de energía de resonancia de fluorescencia y microscopía de imágenes de tiempo de vida fluorescente (FLIM por sus siglas en inglés).

A diferencia de la intensidad de fluorescencia, el tiempo de vida no cambia en función de la concentración de fluoróforos. Esto es cierto cuando se observan las dos condiciones siguientes: (i) la ausencia de procesos de agregación de estado excitados, por ejemplo, formación de excímeros; (ii) la ausencia de auto-apagado en el estado excitado que puede producirse debido a los procesos de agregación y/o difusión controlada, que conducen al acortamiento del decaimiento del estado excitado observado.^[5]

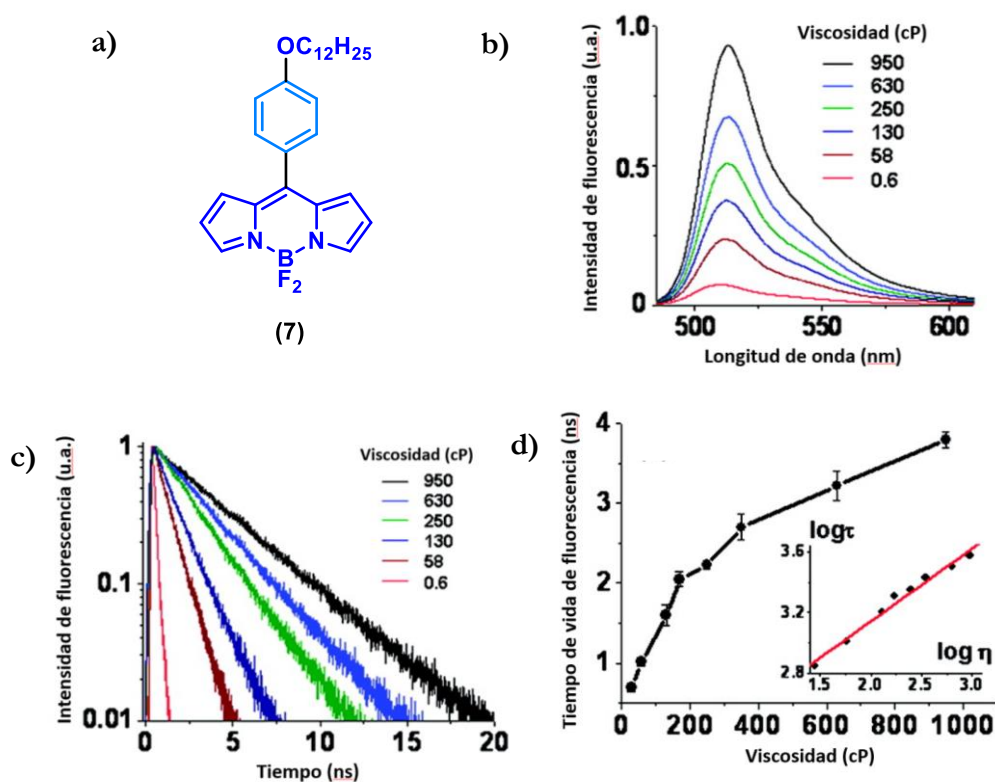


Figura 5. a) Ejemplo de sensor de viscosidad basado en el tiempo de vida fluorescente (7). b) Espectro de emisión, c) restos de decaimiento registrados en mezclas de metanol/glicerol de diferente viscosidad y d) cambios del tiempo de vida de la fluorescencia en función de la viscosidad de 7.

El primer reporte de este tipo de rotores empleados para medir la viscosidad en células por la técnica de FLIM fue empleada por vez primera por Kuimova *et al.*^[20] en donde se midió el tiempo de vida del estado excitado y la intensidad fluorescente del rotor **7** (Figura 5) a diferentes mezclas de metanol glicerol variando la viscosidad del medio observando incrementos en la intensidad fluorescente y de los rastros de decaimiento mientras más viscoso era el medio (incisos (b) y (c) Figura 5) y tal como se puede apreciar en el inciso (d) de la misma figura, al correlacionar el $\log \tau_f$ en función del $\log \eta$ se obtiene una línea recta tal como lo predice la Ecuación (5). De esta manera se logró estimar la viscosidad dentro de una línea celular.

Rotores moleculares con BODIPYs

Debido a su relativamente alta fotoestabilidad, carga total neutra, la baja formación del estado triplete, altos rendimientos cuánticos de fluorescencia y espectros de absorción y emisión nítidos, los 4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacenos (BODIPYs) se han considerado como una potencial base estructural para el desarrollo funcional de sondas fluorescentes.^[21]

De los primeros reportes que se tienen de rotores moleculares empleando BODIPYs para medir la viscosidad de un medio, se encuentra el trabajo realizado por Alamiry *et al.*^[22] donde sintetizaron dos BODIPY *meso*-sustituídos estéricamente no impedidos unidos por una cadena flexible el cual demostró tener alta sensibilidad a la viscosidad que se atribuye a la distorsión estructural del marco de dipirrometano que acompaña a la rotación del anillo de fenilo en la posición *meso*.

Ejemplos de sensores ratiométricos, además del ya antes mencionado, es el presentado recientemente por nuestro grupo de trabajo^[23] en donde se sintetizaron una familia de rotores con los fluoróforos BODIPY y cumarina (compuestos **8-10** Figura 6) donde uno de estos compuestos (compuesto **10**) resultó ser sensible a medir pequeños cambios de viscosidad en células vivas.

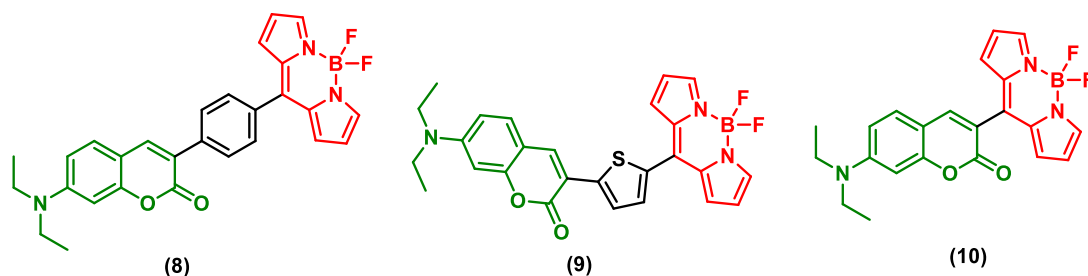



Figura 6. Sensores ratiométricos. Compuestos (8-10)

Los BODIPYs además han demostrado tener tiempos de vida fluorescente altos,^[20] por lo que este tipo de rotores presentan una ventaja significativa sobre otros como los malononitrilos y las julolidinas que son de los compuestos mayormente empleados para este tipo de experimentos. Estos parámetros permiten la implementación exitosa de rotores BODIPY como sondas de microviscosidad en TCSPC-FLIM (Time-Correlated Single Photon Counting - FLIM). Asimismo, a diferencia de los rotores BODIPY, los rotores DCVJ y CCVJ exhiben tiempos de vida excitados muy cortos (de 10 a 100 ps) y pequeñas variaciones del tiempo de vida en el intervalo de viscosidad de 50 a 1000 cP.^[24]



Así, en la literatura se pueden encontrar un gran número de rotores moleculares que tienen la intención de servir como sondas fluorescentes de viscosidad. Sin embargo, aún queda mucho por explorar en esta área ya que cada día aumenta la demanda por encontrar sensores que sean más asequibles, fáciles de sintetizar, que tengan mayor foto-estabilidad en comparación con los existentes y que sean específicos a organelos. Por lo que en el presente trabajo se exponen los resultados de la síntesis y evaluación como sensores de viscosidad de dos rotores moleculares con un núcleo de BODIPY y etinilestradiol.

HIPÓTESIS

La construcción de un conjugado BODIPY y un estrógeno (etinilestradiol) con un espaciador fenilo o tienilo en la posición *meso* del BODIPY provocará la obtención de un rotor molecular el cual se espera presente una dependencia lineal de la intensidad fluorescente en función de la viscosidad del medio pudiendo funcionar como sensor de viscosidad.

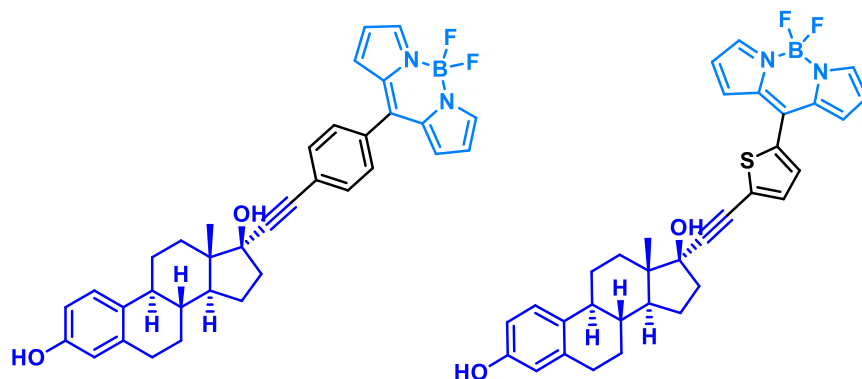
OBJETIVOS

Objetivo general

Sintetizar dos rotores moleculares basados en el fluoróforo BODIPY con una unidad de EES (*vide infra*) y caracterizar estos compuestos química y foto-físicamente y estudiar la relación entre la viscosidad del medio y la fluorescencia de estos compuestos. Asimismo, incubar los compuestos sintetizados en una línea celular para observar su internalización y posible alojamiento selectivo a la membrana nuclear o a algún organelo.

Objetivos secundarios

- Estudiar la diferencia foto-física y la posible diferencia de internalización en una línea celular (*v. gr.* la localización específica a algún organelo en particular) al cambiar los rotadores en los dos compuestos sintetizados.
- En caso de internalización, realizar experimentos de colocalización cuantitativa con otros colorantes comerciales específicos a organelos para discernir la localización de los compuestos sintetizados dentro de la célula.

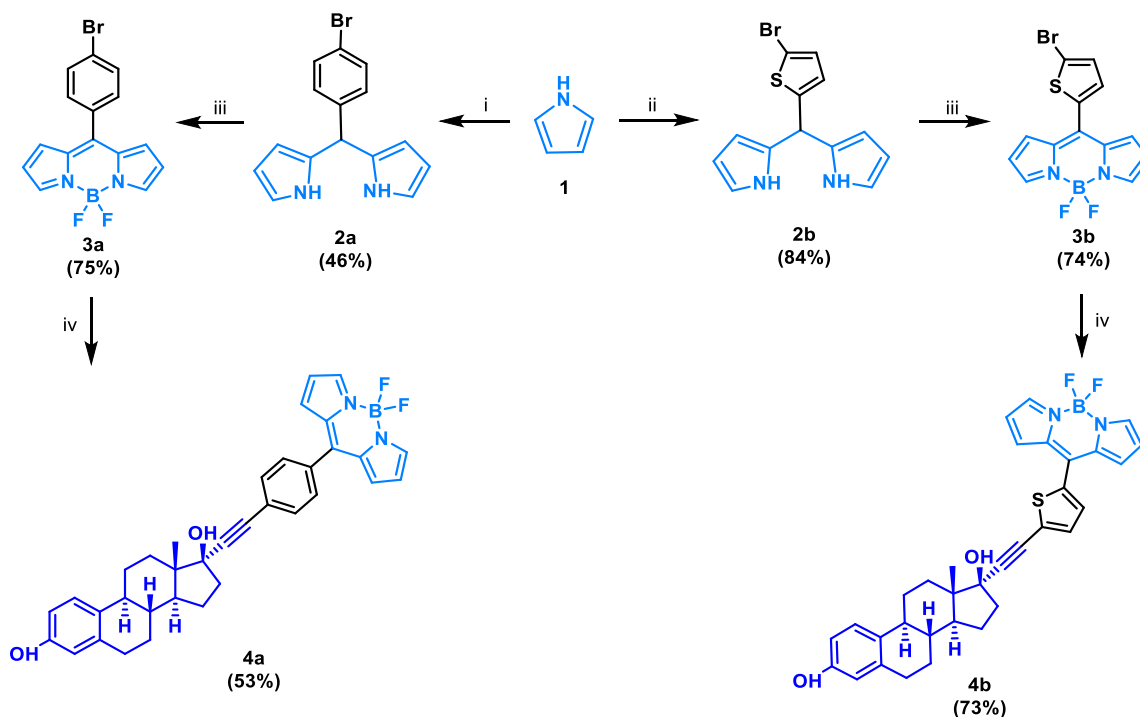


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis y caracterización espectroscópica

Como ya se mencionó, los BODIPYs presentan ciertas ventajas a comparación de otros rotores moleculares para ser empleados como sensores de viscosidad. Se tomó en cuenta trabajos en la literatura que indican la ventaja de tener un anillo de fenilo en la posición *meso* de los BODIPYs^[20, 22] por lo que se decidió sintetizar este compuesto (**3a**) y acoplarle un esteroide, el etinilestradiol. Se ha demostrado que el EES se une a proteínas receptoras de estrógeno que se encuentran en la membrana nuclear de las células^[25] por lo que se espera que estos rotores moleculares tengan una mayor selectividad de unión hacia este sitio. Aunado a esto, se sintetizó un compuesto análogo intercambiando el anillo de fenilo por un tienilo (**3b**) para hacer un estudio comparativo de dos rotores moleculares donde la única diferencia es el cambio del rotador. Cabe resaltar que este proyecto es una continuación de trabajos previos realizados por el equipo de trabajo.^[26]

La ruta sintética para la obtención de éstos compuestos se presenta en el Esquema 1. La síntesis comprende en primer lugar la condensación de pirrol (**1**) con el aldehído correspondiente para la generación de los dipirrometanos **2a** y **2b**. Posteriormente, a estos compuestos se les realizó una oxidación con DDQ seguida de una complejación con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ obteniéndose así los BODIPYs **3a** y **3b** ya descritos en la literatura.^[27] Finalmente, se realizó una reacción de acoplamiento carbono-carbono tipo Sonogashira de los BODIPYs obtenidos con EES para obtener los productos finales **4a** y **4b** con buenos rendimientos.



Esquema 1. Síntesis de los compuestos **4a** y **4b**: i) 4-Bromobenzaldehído, TFA, t. a. ii) 5-Bromo-2-tiofencarboxaldehído TFA, t. a. iii) DDQ, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , reflujo. iv) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, CuI, DIPA, THF, EES, reflujo.

La caracterización de los compuestos **4a** y **4b** se hizo mediante resonancia magnética nuclear de hidrógeno, carbono-13, boro-11 y flúor-19 (RMN-¹H, RMN-¹³C, RMN-¹¹B, RMN-¹⁹F). La asignación de las señales se hizo con información de experimentos en dos dimensiones como COSY, HSQC, HMBC y NOESY. Como ejemplo, en la Figura 7 se presenta la RMN-¹H para el compuesto **4a** en donde se pueden apreciar señales características para este tipo de compuestos, como las señales del núcleo de BODIPY correspondiente a las señales doble de 29, doble de 30 y simple de 31 que se encuentran a 7.07, 6.67 y 8.02 ppm respectivamente, todas integrando para dos hidrógenos con una constante de acoplamiento $J = 4.3$ Hz entre 29 y 30. Interesante es notar las señales del anillo aromático, 24 y 25 a 7.67 ppm, que presentan un desplazamiento químico accidental por lo que sólo se observa una sola señal para ambos hidrógenos sin acoplamiento.

También se asignaron algunas señales pertenecientes al esteroide como la señal simple de 18 perteneciente al metilo en 0.97 ppm y la señal del OH 19 en 4.61 ppm, así como las señales aromáticas del anillo A. Además de estas señales, en el espectro se encuentran señales características (multiplicidad y desplazamiento químico) obtenidas en acetona-*d*₆ de grasa en 0.9 y 1.29 ppm.^[28] De igual manera, se ha reportado que compuestos esteroidales de este tipo, suelen atrapar moléculas de disolvente,^[29] lo que podría explicar la aparición de más señales en el espectro (como DCM en 5.1 ppm o de hexano residual en 1.28 ppm) así como el incremento de la integración total de los átomos de hidrógeno.

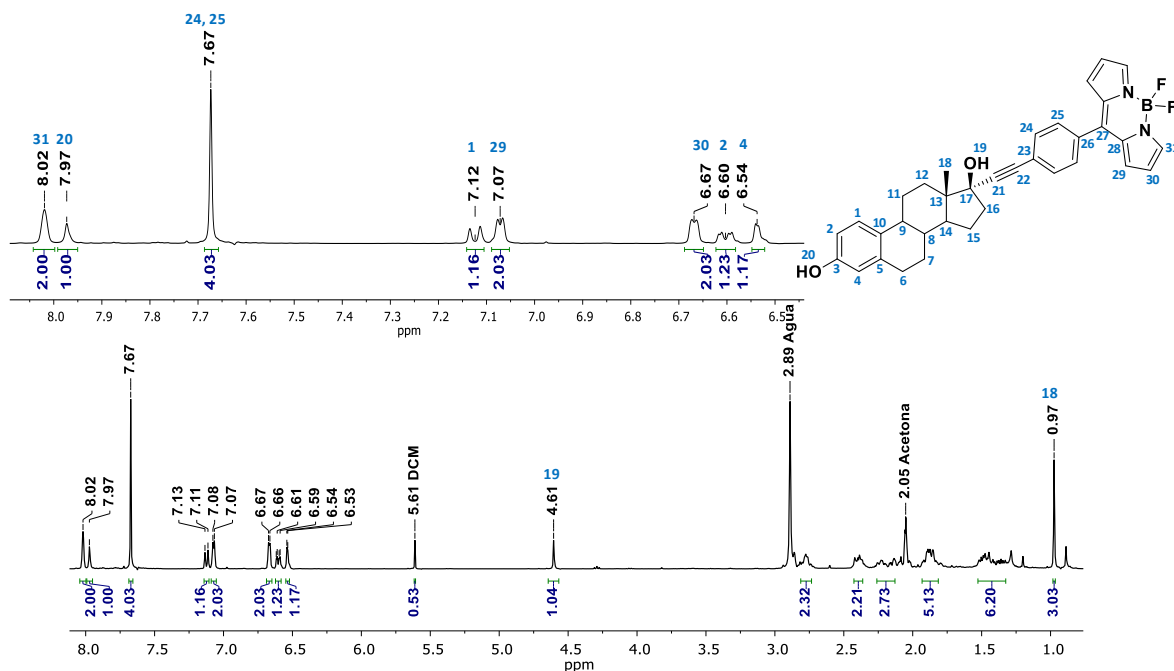


Figura 7. Espectro de RMN-¹H para el compuesto **4a** (400 MHz, Acetona-*d*₆)

En la Figura 8 se muestra el espectro de RMN-¹³C para el compuesto **4a** donde se asignaron las señales correspondientes al núcleo del BODIPY, así como las señales aromáticas pertenecientes al anillo A del esteroide y las señales 21 y 22 del alquino. Cabe resaltar que el número de señales concuerda con el número de carbonos esperados para este compuesto.

Asimismo, se realizó la caracterización por EMAR ESI-TOF (Figura 9), en donde se observa la formación del ion molecular menos un átomo de flúor; calculado para $C_{35}H_{33}BFN_2O_2$: 543.26191, experimental $C_{35}H_{33}BFN_2O_2 [M^+-F]^+$ = 543.26136, error= 1.01684 ppm.

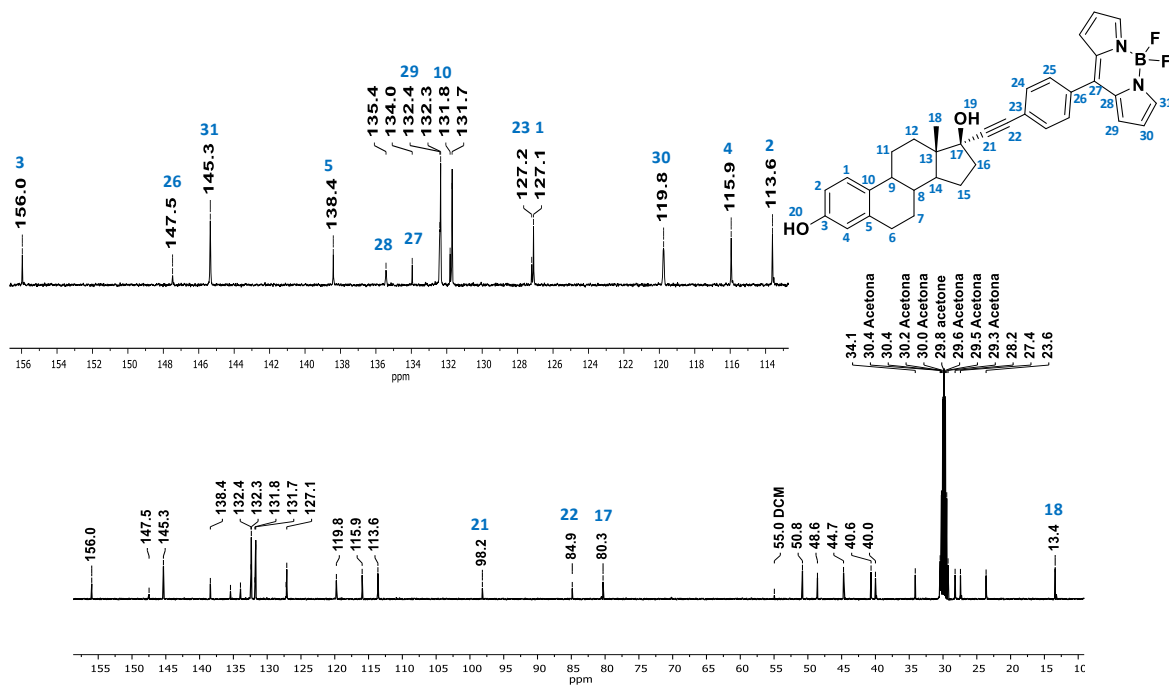


Figura 8. Espectro de RMN- ^{13}C para el compuesto 4a (100 MHz, Acetona- d_6)

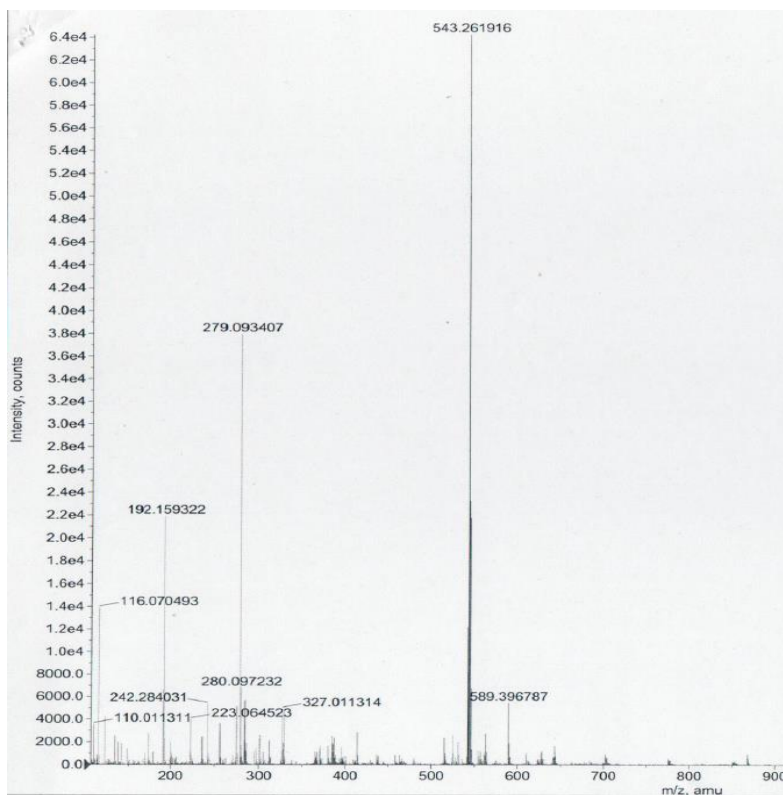


Figura 9. EMAR ESI-TOF para el compuesto 4a.

Caracterización fotofísica y dependencia de la viscosidad

La constante dieléctrica de un compuesto es un índice de su polaridad. Generalmente, las moléculas de disolvente polar se reorientan en la proximidad de un colorante fluorescente después de la fotoexcitación. Como consecuencia, parte de la energía del estado excitado se transfiere de los fluoróforos al solvente, y el pico de emisión muestra un desplazamiento batocrómico. Esto es de mayor importancia cuando se habla de sensores de viscosidad; significa que, en medios de polaridad variada, incluso el enfoque ratiométrico de la viscosidad está propenso al error, ya que potencialmente ignora la contribución del cambio espectral debido a la polaridad del disolvente.

Los perfiles de absorción tanto para **4a** como para **4b** (Figura 10), presentan algunas características ya bien documentadas para los BODIPYs^[32] como lo es una banda ancha a longitudes de onda corta que está asociada a la transición electrónica $S_0 \rightarrow S_2$ y una banda considerablemente más intensa y delgada localizada a longitudes de onda mayores o menor energía (alrededor de 500 nm) asociada a la transición $\pi-\pi^* S_0 \rightarrow S_1$.

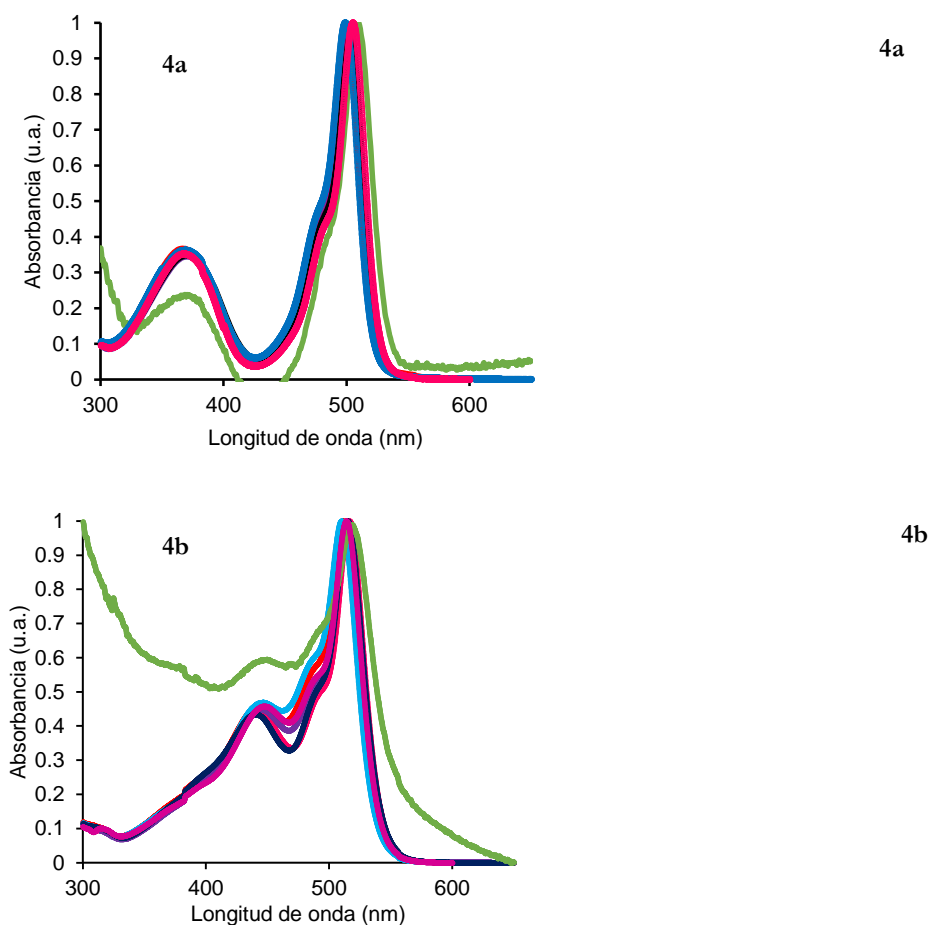


Figura 10. Espectros de absorción UV-Vis y de emisión fluorescente normalizados para los compuestos **4a** y **4b**. Código de colores: acetonitrilo (azul), THF (anaranjado), metanol (rojo), cloroformo (magenta), dioxano (azul marino), butanol (violeta), etilenglicol (negro), glicerol (verde).

En el análisis solvatocrómico que se realizó para **4a** y **4b** de la Figura 10, esta tendencia no fue tan marcada para el compuesto **4a**, ya que al obtener el espectro de absorción y de emisión en disolventes de diferentes polaridades, no se observa un gran desplazamiento en el máximo de absorción ($\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$) o de emisión ($\lambda_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$) por lo que este compuesto no es susceptible a cambios de polaridad del medio. Esto es ventajoso si se desea emplear este compuesto como sensor de viscosidad, ya que, sin importar la polaridad del medio, las bandas de excitación y de emisión tendrán el mismo corrimiento, lo que proporcionaría gran reproducibilidad en el experimento.

El compuesto **4b** muestra un espectro de absorción con un comportamiento similar al del compuesto **4a** con una $\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$. En el espectro de emisión para este compuesto se puede observar la aparición de una banda a 650 nm que se puede asociar a un estado de transferencia de carga intramolecular (ICT); el conector de tiofeno ocasiona que este compuesto adopte una forma de “V”, lo que permite que el sistema experimente el fenómeno de ICT^[33] haciendo de este, sensible a la polaridad del medio. Este tipo de comportamientos espectrales se ha observado con otros BODIPYs *meso* sustituidos con grupos electro donadores.^[34]

Al observar los valores de la Tabla 1 se puede determinar que hay cierta tendencia que al aumentar la viscosidad del medio incrementa el valor de rendimiento cuántico de fluorescencia por lo que se decidió hacer un estudio cuantitativo de la dependencia de la intensidad fluorescente en función de la viscosidad. Se prepararon diferentes mezclas de metanol/glicerol con los compuestos **4a** y **4b** variando la proporción de cada una de ellas de tal manera que se obtuvieran mezclas con diferentes viscosidades (Tabla 2) y se generó el espectro de emisión de cada una de ellas. Los valores de las viscosidades de las diferentes proporciones fueron obtenidas de acuerdo a lo descrito en la literatura.^[35]

Tabla 1. Valores de viscosidad y constante dieléctrica, así como los coeficientes de atenuación molar y rendimientos cuánticos de fluorescencia obtenidos en varios disolventes empleando Rodamina B como referencia externa para los compuestos 4a y 4b

Disolvente	Viscosidad (cP a 20°C)	Constante dieléctrica (20°C)	Φ_F		$\epsilon \text{ (cm}^{-1} \text{ M}^{-1}\text{)}$	
			4a	4b	4a	4b
Acetonitrilo	0.37	37.5	0.0402	0.0083	26351	28701
THF	0.55	7.6	0.0664	0.0134	25020	23900
Metanol	0.55	32.6	0.0445	0.0069	19875	18273
Cloroformo	0.58	4.8	0.0430	0.0038	23431	23571
Dioxano	1.44	2.1	0.0476	0.0214	33886	42207
Butanol	2.95	17.8	0.0498	0.0068	26010	31331
Etilenglicol	16.1	41.4	0.4199	0.0379	22841	11049
Glicerol	950.0	42.5	0.6004	0.4697	-	-

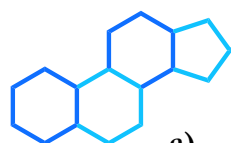
Tabla 2. Valores de viscosidad y log vis de diferentes proporciones de metanol/glicerol

Proporción metanol/glicerol (v/v)	Viscosidad (cP)	log vis
10:0	0.6	-0.22184875
9:1	1.8	0.25527251
8:2	4.8	0.68124124
7:3	7.7	0.88649073
6:4	13	1.11394335
5:5	28	1.44715803
4:6	58	1.76342799
3:7	130	2.11394335
2:8	250	2.39794001
1:9	630	2.79934055
0:10	950	2.97772361

En la Figura 11 se puede apreciar que aumentos en la viscosidad del medio ocasionan incrementos en la intensidad fluorescente. El aumento en la intensidad de las bandas de emisión tanto para el compuesto **4a** como para el compuesto **4b** indican que existe una mayor tendencia a que estas moléculas regresen al estado basal después de la foto-excitación prefiriendo el decaimiento radiativo al no radiativo al aumentar la viscosidad del medio que es consistente con la Ecuación (2). Al graficar los valores de $\log I$ en función de $\log \eta$ para el compuesto **4a** se obtuvo una línea recta con una pendiente de 0.4547, una ordenada al origen de 5.9109 y una $R^2=0.9811$. Este valor es congruente con la Ecuación (3) que predice una línea recta al relacionar estas dos variables.

Recientemente, nuestro equipo de trabajo ha reportado una serie de conjugados de BODIPY-cumarina cuya sensibilidad como sensor de viscosidad (R^2 de 0.92 a 0.96) es comparable con la de **4a** a viscosidades superiores a 10 cP aunque también, uno de estos compuestos demostró correlacionar de forma precisa valores de rendimiento cuántico con la viscosidad a valores inferiores de 10 cP^[23] a pesar de que se ha reportado que la relación lineal de $\log I$ vs $\log \eta$ de BODIPYs análogos a **4a** solo es válida para un intervalo de viscosidades de 15 a 1000 cP.^[36] Futuras proyecciones de este trabajo contemplan realizar un estudio $\log I$ vs $\log \eta$ pero a valores de baja viscosidad y en un intervalo corto (de 1 a 10 cP) para probar si **4a** también posee la cualidad descrita del compuesto BODIPY-cumarina.

Esta relación lineal no se observó para el compuesto **4b** ya que el valor determinado fue de $R^2=0.874$. Esto es debido a que, como se mencionó anteriormente, este compuesto es susceptible a los cambios de polaridad. Esta información sugiere que **4b** no es un candidato idóneo para funcionar como sensor de viscosidad.



a)

b)

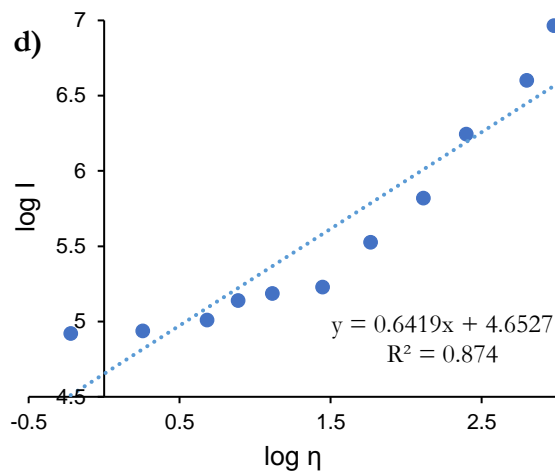
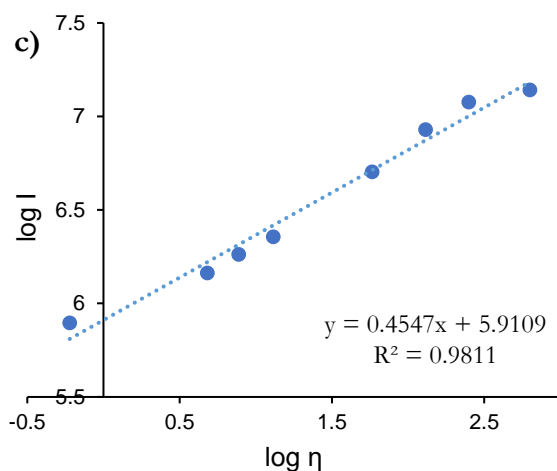


Figura 11. a) y b) Espectros de emisión de **4a** y **4b** respectivamente en diferentes mezclas de metanol/glicerol. c) Dependencia lineal entre $\log I$ vs. $\log \eta$ a 511 nm para **4a**. $R^2 = 0.9811$ d) $\log I$ vs. $\log \eta$ a 540 nm para **4b**. $R^2 = 0.874$

Aplicación biológica

Tanto el compuesto **4a** como **4b** fueron incubados en una línea celular MCF-7, que son células de cáncer de mama, durante 24 y 48 h a una concentración de 5 y 50 μM . Los compuestos se añadieron a las células disueltos en DMSO estéril procurando que la concentración de DMSO no sobrepasara del 2% en relación al medio de cultivo. La viabilidad de las células se midió por citometría de flujo en las condiciones que se realizaron las incubaciones (concentración de los compuestos sintetizados, concentración de DMSO, tiempo de incubación y temperatura) obteniéndose una viabilidad mayor al 70%.

En la Figura 12 se muestran las imágenes de microscopía confocal obtenidas donde la localización de los compuestos **4a** (incisos a-d) y **4b** (incisos e-h) se encuentra marcada de color verde ($\lambda_{\text{ex}} = 514 \text{ nm}$) junto con el compuesto DAPI en color azul ($\lambda_{\text{ex}} = 442 \text{ nm}$) que es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN, o sea, es un marcador selectivo al núcleo celular. El empleo de DAPI tenía como objetivo el diferenciar el núcleo de la posible unión de los BODIPYs a la membrana nuclear, o a algún otro organelo.

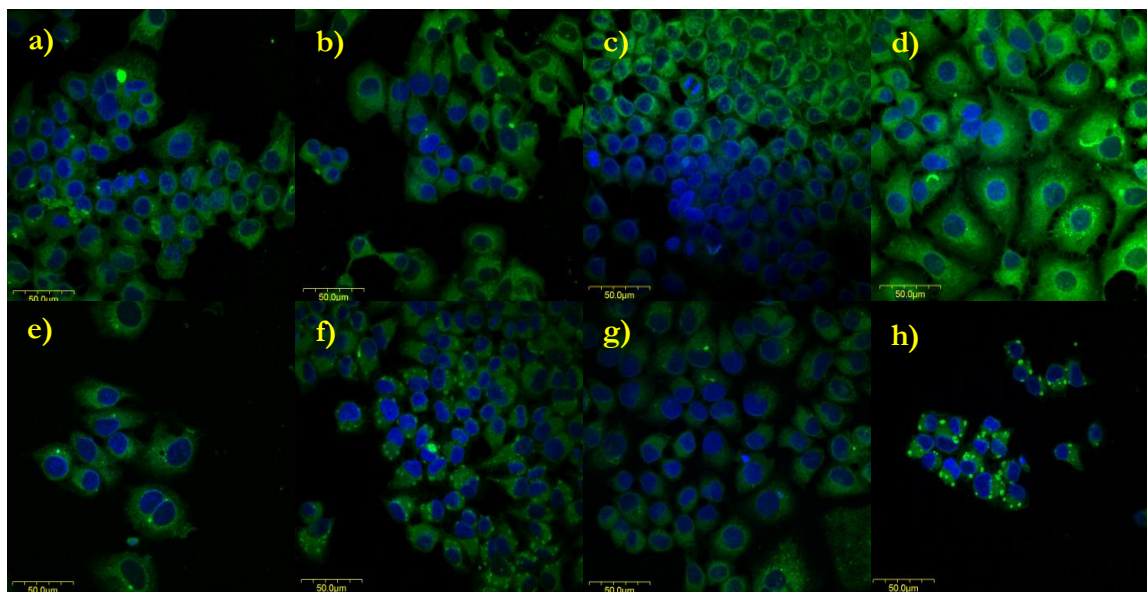
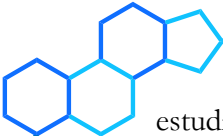


Figura 12. Imágenes de microscopía confocal de células MCF-7 **4a** y **4b** (verde) $\lambda_{\text{ex}} = 514 \text{ nm}$ y DAPI (azul) $\lambda_{\text{ex}} = 442 \text{ nm}$: a) **4a** a 24 h y $5 \mu\text{M}$ b) **4a** a 24 h y $50 \mu\text{M}$ c) **4a** a 48 h y $5 \mu\text{M}$ d) **4a** a 48 h y $50 \mu\text{M}$ e) **4b** a 24 h y $5 \mu\text{M}$ f) **4b** a 24 h y $50 \mu\text{M}$ g) **4b** a 48 h y $5 \mu\text{M}$ h) **4b** a 48 h y $50 \mu\text{M}$. En todos los tiempos, la temperatura de incubación fue de $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Las barras de escala indican $50 \mu\text{m}$.

En las imágenes se puede observar que los compuestos **4a** y **4b** fueron capaces de atravesar la membrana celular pudiéndose observar dentro de las células, haciéndose más notorio esto cuando se incubó con concentraciones de $50 \mu\text{M}$ (incisos b, d, f y h). Las estructuras “fibrosas” o en forma de pequeños túbulos que presentan las imágenes correspondientes a **4a** y que están más marcadas en el inciso (d), podrían sugerir que este compuesto tiene cierta preferencia para unirse al retículo endoplásmico (RE) de la célula. En la literatura se ha descrito, que sondas selectivas a RE funcionan alterando el movimiento de proteínas de la membrana de este organelo;^[37] posiblemente, el fragmento de EES en **4a**, sea el causante de alterar este movimiento, observándose así, la unión de este compuesto a este organelo en específico. El RE interviene en funciones relacionadas con la síntesis proteica, metabolismo de lípidos y algunos esteroides, así como el transporte intracelular, por lo que los procesos mediados por difusión son muy importantes y de misma manera lo debe ser la medición de la viscosidad en este organelo.

De igual manera, el compuesto **4b** presenta aparentemente una localización específica dentro de la célula, en especial, si se observan los incisos (f) y (h) en donde se aprecian zonas intracelulares donde la fluorescencia es más intensa en comparación al resto de la célula lo que indica la localización de este compuesto predominantemente en esas áreas. Estas aseveraciones se pueden comprobar al realizar un estudio de colocalización cuantitativa en donde se cultiven de nueva cuenta los compuestos sintetizados, pero con otros compuestos (que tengan una longitud de onda de excitación diferente a la de los compuestos problema) que sean específicos a ciertos organelos con lo que se esperaría una combinación de señales y así discernir la localización específica o no a los organelos objetivo.

Cabe destacar que para la internalización de los compuestos hacia las células, no fue necesario algún procedimiento de permeabilización, que en ocasiones son comunes para este tipo de



estudios, que traen algunas consecuencias como daños a la membrana celular o incluso la muerte celular.^[38] Además, tampoco fue necesario el uso de sistemas acarreadores como las ciclodextrinas que facilitan la importación de compuestos al interior de las células como es el caso de otros reportes en la literatura donde se emplean compuestos parecidos a los expuestos en este proyecto.^[39]

Es importante recordar que la bio-compatibilidad de un colorante o sensor se vuelve vital cuando se trabaja con células y tejidos biológicos y con frecuencia determina la localización y / o la división del marcador en dominios celulares. Aparentemente, el uso de EES tiene un efecto positivo tanto en la internalización de los compuestos al interior de la célula como al anclaje hacia ciertos organelos en específico. En el 2015 se reportó el uso de un BODIPY con colestanol y fue probado como sensor de viscosidad en bicapas lipídicas fabricadas artificialmente^[40] pero el uso de esteroides en sensores fluorescentes de imágenes de células no está muy explorado, por lo que esta nueva aproximación resulta interesante desde el punto de vista sintético y biológico.

Otro aspecto que vale la pena resaltar es la alta foto-estabilidad de los BODIPYs y la poca tendencia a la descomposición fotoquímica o *photobleaching*,^[41] lo que resulta muy ventajoso cuando se hace microscopía confocal y en especial si se emplean varios fluoróforos para estudios de colocalización.

El que un rotor molecular pueda ser candidato factible para poder ser usado por la técnica de FLIM, depende de la disponibilidad del rotor, que debe tener una fuerte dependencia de la vida de fluorescencia en función de la viscosidad (alto α , Ecuación (4) y (5)). Esto se debe principalmente por motivos técnicos, en los que los tiempos de vida de fluorescencia a diversas viscosidades deben estar dentro del intervalo accesible de las capacidades actuales de FLIM. Se ha demostrado que los tiempos de vida en un intervalo de viscosidad de 1 a 1000 cP para los BODIPYs con un anillo de fenilo en posición *meso*, son superiores a los 300 ps.^[5] Estos valores caen dentro de un intervalo accesible para ser medido por la técnica de TCSPC-FLIM, que ofrece una detección ultrasensible y precisa del tiempo de vida de la fluorescencia.^[42] También, se necesitan tener valores altos de Φ_F para permitir la rápida acumulación de señal. Trabajos anteriores hechos con BODIPYs,^[20] comprueban que este tipo de fluoróforos cumplen con todas las características mencionadas, por lo que los compuestos **4a** y **4b** podrían emplearse para experimentos de este tipo.



CONCLUSIONES

Se sintetizaron y caracterizaron dos rotores moleculares BODIPYs (**4a** y **4b**) y se probaron en una línea celular de cáncer de mama. Los resultados obtenidos para **4a** demuestran que este compuesto posee una dependencia lineal de la fluorescencia a los cambios de viscosidad y no es dependiente de la polaridad del medio. Además, los estudios preliminares de microscopía confocal indican la localización selectiva de este compuesto a RE, por lo que **4a** es un buen candidato para funcionar como sensor fluorescente de viscosidad.

Si bien, el compuesto **4b** no presenta las cualidades de un sensor de viscosidad al no presentar una relación lineal entre la fluorescencia en función de la viscosidad, las imágenes de microscopía confocal indican que este compuesto podría ser empleado como marcador fluorescente específico para algún organelo en particular.

Asimismo, los compuestos sintetizados presentaron ciertas ventajas durante su incubación con células vivas como lo fue una fácil internalización intercelular en comparación a otros compuestos publicados en la literatura y no fue necesario algún procedimiento de permeabilización celular ni tampoco fue necesario el uso de sistemas acarreadores para introducir los compuestos adentro de las células.

Aunque no se logró realizar las pruebas de colocalización ni medir la viscosidad al interior de una célula empleando los compuestos sintetizados, es muy factible que se pueda lograr esto empleando la técnica de TCSPC-FLIM. Actualmente se está trabajando en este punto para completar este trabajo de investigación, así como en estudios de colocalización para comprobar la selectividad de unión a RE y a otros organelos como lisosomas o mitocondria.



PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Reactivos e instrumentación

Todos los reactivos empleados fueron obtenidos de proveedores comerciales y se usaron sin previa purificación. Los disolventes fueron secados mediante métodos estandarizados o destilados dependiendo de la finalidad de su uso. El seguimiento de las reacciones se hizo mediante CCF en placas de gel de sílica (ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄) y reveladas con una lámpara de luz UV₂₅₄. Los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H, ¹³C, ¹¹B y ¹⁹F se determinaron con un espectrómetro Jeol Eclipse 400, las señales se encuentran reportadas en ppm referidas a TMS. La temperatura de todos los experimentos de RMN fue de 25 °C. La multiplicidad de las señales se describe como: señal simple (s), señal doble (d), señal triple (t), señal cuádruple (q), señal múltiple (m), señal amplia (sa) y señal doble de doble (dd). Para los espectros de UV-Vis se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer UV-Vis Lambda 2 empleándose celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico para todas las mediciones. Los espectros de emisión fluorescente se obtuvieron de un fluorómetro HORIBA Scientific - FluoroMax-4 empleándose celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los espectros de masas de alta resolución fueron adquiridos con un espectrómetro Agilent Technologies ESI TOF.

Cultivos celulares microscopía confocal

Las células MCF-7 se cultivaron en placas de cultivo celular de fondo plano soportadas en cobre objetos, con un medio de cultivo Gibco Advance RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB a 37 °C en una incubadora con una atmosfera de CO₂ al 5%. Después de 72 horas de incubación, se renovó el medio de cultivo y se agregó una solución de los compuestos **4a** y **4b** en DMSO estéril, procurando que la concentración de DMSO no fuera superior al 2% del total de la disolución, obteniendo la concentración deseada para cada caso. Las muestras se cultivaron a 24 y 48 horas a 37 °C en una incubadora con una atmosfera de 5% de CO₂ según el caso. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo de las muestras, se hicieron lavados con PBS (x3) y se fijaron con una disolución de PBS con 4% de PFA durante 20 minutos. En seguida se realizaron lavados con PBS (x3) y se agregó 10 µL de una disolución de DAPI 300 nm. Las muestras se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos, tiempo al cual se volvieron a realizar lavados con PBS (x3). Por último, se agregó una gota de VectaShield (medio para la preservación de los fluoróforos) antes de ser montados y sellados en porta objetos para la microscopía confocal. El microscopio empleado fue un microscopio invertido Olympus FB300 y se empleó un objetivo de 60x. El análisis de las imágenes se hizo mediante el software NIH ImageJ.

Cálculos de rendimiento cuánticos

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia de **4a** y **4b** en diferentes disolventes se determinaron conforme a la Ecuación (6):

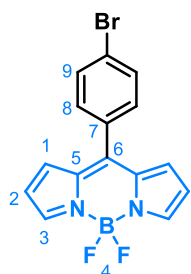
$$\Phi_{F(x)} = (A_s/A_x) (F_x/F_s) (\eta_x/\eta_s)^2 \Phi_{F(s)} \quad (6)$$

donde $\Phi_{F(x)}$ es el rendimiento cuántico de fluorescencia, A es la absorbancia a la longitud de onda de excitación, F es el área bajo la curva de emisión corregida (expresada en número de

fotones), y η es el índice de refracción de los solventes utilizados. Los subíndices x y s se refieren a el problema y al estándar respectivamente. El estándar empleado fue Rodamina B, el cual tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia de 0.31 en agua.^[43]

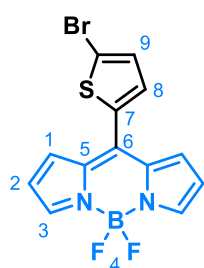
Síntesis y caracterización

8-(4-bromofenil)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (2a).



A una disolución de 4-bromobenzaldehído (2 g, 10.81 mmol) y 1*H*-pirrol (2.20 mL, 31.73 mmol) se purgó con nitrógeno durante 10 min. Posteriormente, en atmósfera inerte, se le añadió TFA (100 μ L, 1.30 mmol), se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se observó la consumación de la materia prima. Se le realizaron extracciones sucesivas con DCM (x3) y lavados con agua (X3), la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente fue evaporado hasta sequedad a presión reducida. El producto crudo fue purificado por cromatografía en columna empleando como eluyente una mezcla de Hex/AcOEt en proporción 90:10 (v/v) obteniéndose 1.52 g de un sólido café (46%). Este sólido se disolvió en DCM y se le añadió DDQ (1.11 g, 4.84 mmol), la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente la reacción se enfrió a 0 °C y se adicionó BF₃·Et₂O (10 mL, 81.03 mmol), se agregó Et₃N (1.50 mL, 10.75 mmol) y se calentó a temperatura de reflujo durante dos horas. Después de este tiempo la reacción se detuvo, se realizaron extracciones sucesivas con DCM (x3), se lavó con agua, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna empleando como eluyente una mezcla de Hex/AcOEt en proporción 90:10 (v/v) obteniéndose un sólido verde metálico (1.32 g, 75%). **RMN-¹H** (300 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 7.95 (sa, 2H, H-3), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-9), 7.44 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-8), 6.90 (d, J = 4.0 Hz, 2H, H-1), 6.56 (d, J = 3.9 Hz, 2H, H-2). La información espectroscópica es congruente con la literatura.^[27]

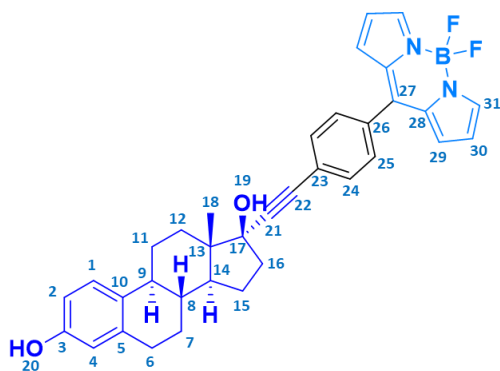
8-(5-bromotien-2-il)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (2b).



A una disolución de 5-bromo-2-tiofenocarboxaldehído (2 g, 10.47 mmol), y 1*H*-pirrol (4.40 mL, 63.47 mmol) se purgó con nitrógeno durante 10 min. Posteriormente, en atmósfera inerte, se le añadió TFA (100 μ L, 1.30 mmol), se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo la reacción se lavó con agua, se le realizaron extracciones sucesivas con DCM, la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente fue evaporado hasta sequedad a presión reducida eliminando el exceso de pirrol con metanol. El producto crudo fue purificado por cromatografía en columna empleando como eluyente una mezcla de Hex/AcOEt en proporción 90:10 (v/v) obteniéndose 2.71 g de un sólido beige (84%). El dipirrometano obtenido (700 mg, 2.31 mmol) se disolvió en DCM y se le añadió DDQ (0.52 g, 2.29 mmol), la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente la reacción se enfrió a 0 °C y se adicionó BF₃·Et₂O (12 mL, 97.23 mmol), se agregó Et₃N (11 mL, 78.81 mmol) y se calentó a temperatura de reflujo durante una hora. Después de este tiempo la reacción se detuvo, se realizaron extracciones sucesivas con DCM (x3), se lavó con agua, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El producto crudo se purificó por

cromatografía en columna empleando como eluyente una mezcla de Hex/AcOEt en proporción 90:10 (v/v) obteniéndose un sólido verde metálico (0.64 g, 74%). **RMN-¹H** (300 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 7.93 (sa, 2H, H-3), 7.32 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H, H-9), 7.25 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H, H-8), 7.24 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H, H-1), 6.58 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H, H-2). La información espectroscópica es congruente con la literatura.^[27]

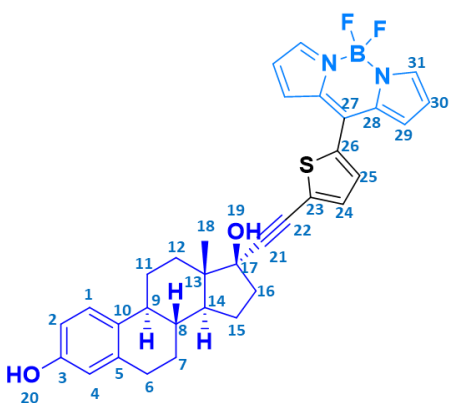
(13*S*,17*S*)-17-((4-(5,5-difluoro-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipirrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*]diazaborinin-10-il)fenil)etinil)-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6*H*-ciclopenta[*a*]fenantreno-3,17-diol (4a)



A una disolución de EES (0.17 g, 0.57 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.03 g, 0.05 mmol), CuI (0.02 g, 0.10 mmol) y el BODIPY **3a** (0.50 g, 1.44 mmol) en THF seco (50 mL), se le añadió Et₃N (4 mL) y posteriormente se calentó a temperatura de reflujo durante 14 horas. El disolvente se removió, el crudo se disolvió en DCM y se realizaron extracciones sucesivas con una disolución saturada de NH₄Cl (x3), salmuera (x1) y agua (x1) la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El producto crudo se purificó por

cromatografía en columna empleando como eluyente una mezcla de Hex/AcOEt en proporción 90:10 (v/v) obteniéndose un sólido rojo (0.18 g, 53%). **RMN-¹H** (400 MHz, Acetona-*d*₆, δ, ppm): 8.02 (sa, 2H, H-31), 7.97 (s, 1H, H-20), 7.67 (s, 4H, H-24, H-25), 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-1), 7.07 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, H-29), 6.67 (dd, *J* = 4.3, 2H, H-30), 6.60 (dd, *J* = 8.4, 2.8 Hz, 1H, H-2), 6.54 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H-4), 4.61 (s, 1H, H-19), 2.81-2.73 (m, 2H), 2.43-2.36 (m, 2H), 2.27-2.13 (m, 2H), 1.93-1.80 (m, 5H), 1.52-1.32 (m, 6H), 0.97 (s, 3H, H-18). **RMN-¹³C** (100 MHz, Acetona-*d*₆, δ, ppm): 156.0 (C-3), 147.5 (C-26), 145.3 (C-31), 138.4 (C-5), 135.4 (C-28), 134.0 (C-27), 132.4 (C-29), 132.3, 131.8 (C-10), 131.7, 127.2 (C-23), 127.1 (C-1), 119.8 (C-30), 115.9 (C-4), 113.6 (C-2), 98.2 (C-21), 84.9 (C-22), 80.3 (C-17), 50.8, 48.6, 44.7, 40.6, 40.0, 34.1, 30.4, 28.2, 27.4, 23.6, 13.4 (C-18). **RMN-¹¹B** (128.3 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 0.28 (t, *J*_{B-F} = 28.8 Hz). **RMN-¹⁹F** (376.1 MHz, CDCl₃, δ, ppm): -145.00 (q, *J*_{B-F} = 28.7 Hz). **EMAR (ESI-TOF) m/z**: calculado para C₃₅H₃₃BFN₂O₂: 543.26191, experimental C₃₅H₃₃BFN₂O₂ [M⁺-F]⁺ = 543.26136, error = 1.01684 ppm.

(13*S*,17*S*)-17-((5-(5,5-difluoro-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipirrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-10-il)tiofen-2-il)etinil)-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6*H*-ciclopenta[α]fenantreno-3,17-diol (**4b**)



A una disolución de EES (0.2 g, 0.67 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (0.03 g, 0.05 mmol), CuI (0.01 g, 0.05 mmol) y el BODIPY **3b** (0.35 g, 1 mmol) en THF seco (50 mL), se le añadió Et₃N (3 mL) y posteriormente se calentó a temperatura de reflujo durante 12 horas. El disolvente se removió, el crudo se disolvió en DCM y se realizaron extracciones sucesivas con una disolución saturada de NH₄Cl (x3), salmuera (x1) y agua (x1) la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a sequedad. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna empleando como eluyente una mezcla de Hex/AcOEt en proporción 80:20 (v/v)

obteniéndose un sólido rojo (0.28 g, 73%). **RMN**⁻¹**H** (400 MHz, Acetona-*d*₆, δ , ppm): 8.01 (sa, 2H, H-31), 7.95 (s, 1H, H-20), 7.69 (dd, *J* = 3.9, 0.9 Hz, 1H, H-25), 7.47 (dd, *J* = 4, 0.9 Hz, 1H, H-24), 7.42 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, H-29), 7.12 (d, *J* = 8.3, 1H, H-1), 6.70 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H, H-30), 6.60 (dd, *J* = 8.4, 2.7 Hz, 1H, H-2), 6.53 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H-4), 4.74 (s, 1H, H-19), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.43-2.33 (m, 2H), 2.24-2.12 (m, 2H), 1.97-1.78 (m, 5H), 1.54-1.31 (m, 4H), 0.97 (s, 3H, H-18). **RMN**⁻¹³**C** (100 MHz, Acetona-*d*₆, δ , ppm): 155.1 (C-3), 144.3 (C-31), 138.3 (C-27), 137.5 (C-5), 134.4 (C-26), 134.0 (C-28), 133.9 (C-30), 132.9 (C-24), 131.4 (C-29), 130.9 (C-10), 129.7 (C-23), 126.2 (C-1), 118.9 (C-30), 115.1 (C-4), 112.7 (C-2), 102.7 (C-21), 79.8 (C-17), 77.0 (C-22), 50.0, 47.9, 43.8, 39.8, 39.0, 33.3, 29.4, 27.3, 26.5, 22.8, 12.5 (C-18). **RMN**⁻¹¹**B** (128.3 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 0.22 (t, *J*_{B-F} = 28.4 Hz). **RMN**⁻¹⁹**F** (376.1 MHz, CDCl₃, δ , ppm): -145.21 (q, *J*_{B-F} = 28.5 Hz). **EMAR (ESI-TOF) m/z**: calculado para C₃₃H₃₁BFN₂O₂S: 549.21833, experimental C₃₅H₃₃BFN₂O₂ [M⁺-F]⁺ = 549.21778, error = 0.03768 ppm.



REFERENCIAS

- [1] R. B. Bird, *Appl. Mech. Rev.* **2002**, *55*, R1-R4.
- [2] K. Luby-Phelps, in *International review of cytology*, Vol. 192, Elsevier, **1999**, pp. 189-221.
- [3] N. Oppenheimer, H. Diamant, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 3041-3049.
- [4] Z. Yang, J. Cao, Y. He, J. H. Yang, T. Kim, X. Peng, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4563-4601.
- [5] M. K. Kuimova, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 12671-12686.
- [6] M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1669-1678.
- [7] O. Luneva, N. Brazhe, N. Maksimova, O. Rodnenkov, E. Y. Parshina, N. Y. Bryzgalova, G. Maksimov, A. Rubin, S. Orlov, E. Chazov, *Pathophysiology.* **2007**, *14*, 41-46.
- [8] J. S. Goodwin, K. R. Drake, C. L. Remmert, A. K. Kenworthy, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1398-1410.
- [9] G. Deliconstantinos, V. Villiotou, J. C. Stavrides, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 1589-1600.
- [10] A. Aleardi, G. Benard, O. Augereau, M. Malgat, J. Talbot, J. Mazat, T. Letellier, J. Dachary-Prigent, G. Solaini, R. Rossignol, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2005**, *37*, 207-225.
- [11] O. Nadiv, M. Shinitzky, H. Manu, D. Hecht, C. Roberts, D. LeRoith, Y. Zick, *Biochem. J.* **1994**, *298*, 443-450.
- [12] M. Abdel-Mottaleb, R. O. Loutfy, R. Lapouyade, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **1989**, *48*, 87-93.
- [13] T. Förster, G. Hoffmann, *Z. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 63-76.
- [14] W. J. Akers, M. A. Haidekker, *J. Biomech. Eng.* **2005**, *127*, 450-454.
- [15] R. O. Loutfy, B. A. Arnold, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 4205-4211.
- [16] C. E. Kung, J. K. Reed, *Biochemistry.* **1986**, *25*, 6114-6121.
- [17] M. A. Haidekker, T. Ling, M. Anglo, H. Y. Stevens, J. A. Frangos, E. A. Theodorakis, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 123-131.
- [18] M. A. Haidekker, T. Brady, K. Wen, C. Okada, H. Y. Stevens, J. M. Snell, J. A. Frangos, E. A. Theodorakis, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3627-3636.
- [19] M. A. Haidekker, T. P. Brady, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 398-399.
- [20] M. K. Kuimova, G. Yahiolglu, J. A. Levitt, K. Suhling, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6672-6673.
- [21] T. Kowada, H. Maeda, K. Kikuchi, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4953-4972.
- [22] M. A. Alamiry, A. C. Benniston, G. Copley, K. J. Elliott, A. Harriman, B. Stewart, Y.-G. Zhi, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 4024-4032.
- [23] J. Ordóñez-Hernández, A. Jiménez-Sánchez, H. García-Ortega, N. Sánchez-Puig, M. Flores-Álamo, R. Santillan, N. Farfán, *Dyes Pigm.* **2018**, *157*, 305-313.
- [24] J. A. Levitt, P. H. Chung, M. K. Kuimova, G. Yahiolglu, Y. Wang, J. Qu, K. Suhling, *Chem. Phys. Chem.* **2011**, *12*, 662-672.
- [25] M. Oettel, E. Schillinger, *Estrogens and antiestrogens II: Pharmacology and clinical application of estrogens and antiestrogen*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **1999**.
- [26] E. Rocha del Castillo, J. N. Farfán García, *Síntesis y caracterización de derivados del 17-etinilestradiol acoplados a bodipys y 2,2':6',2''-terpiridinas con potenciales aplicaciones de óptica no lineal.*, Tesis de licenciatura. UNAM, Ciudad de México, México., **2016**.
- [27] E. Xochitiotzi-Flores, A. Jiménez-Sánchez, H. García-Ortega, N. Sánchez-Puig, M. Romero-Ávila, R. Santillan, N. Farfán, *New. J. Chem.* **2016**, *40*, 4500-4512.



- [28] G. R. Fulmer, A. J. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics*. **2010**, *29*, 2176-2179.
- [29] M. E. Ochoa, A. Aguilar-Granda, P. I. Ramirez-Montes, V. Barba, Y. López, R. Santillan, N. Farfán, *CrystEngComm*. **2016**, *18*, 6830-6840.
- [30] E. Pretsch, P. Bühlmann, M. Badertscher, *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*, Springer Berlin Heidelberg, **2009**.
- [31] National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST). SDBS No.: 10994. https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi. consultado el 15 de octubre del 2018., **1999**.
- [32] A. C. Benniston, G. Copley, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 4124-4131.
- [33] (a) A. P. De Silva, H. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515-1566; (b) M. T. Whited, N. M. Patel, S. T. Roberts, K. Allen, P. I. Djurovich, S. E. Bradforth, M. E. Thompson, *Chem. Comm.* **2012**, *48*, 284-286.
- [34] A. C. Benniston, S. Clift, A. Harriman, *J. Mol. Struct.* **2011**, *985*, 346-354.
- [35] D. Su, C. L. Teoh, N. Gao, Q.-H. Xu, Y.-T. Chang, *Sensors*. **2016**, *16*, 1397.
- [36] J. A. Levitt, M. K. Kuimova, G. Yahioglu, P.-H. Chung, K. Suhling, D. Phillips, *J. Phys. Chem. C*. **2009**, *113*, 11634-11642.
- [37] I. D. Johnson, M. T. Spence, *The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies*, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, **2010**.
- [38] D. Koley, A. J. Bard, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States. Am.* **2010**, *107*, 16783-16787.
- [39] H. Lee, Z. Yang, Y. Wi, T. W. Kim, P. Verwilt, Y. H. Lee, G.-i. Han, C. Kang, J. S. Kim, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2474-2480.
- [40] M. R. Dent, I. López-Duarte, C. J. Dickson, N. D. Geoghegan, J. M. Cooper, I. R. Gould, R. Krams, J. A. Bull, N. J. Brooks, M. K. Kuimova, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 18393-18402.
- [41] B. Hinkeldey, A. Schmitt, G. Jung, *Chem. Phys. Chem.* **2008**, *9*, 2019-2027.
- [42] W. Becker, *Advanced time-correlated single photon counting techniques, Vol. 81*, Springer Science & Business Media, **2005**.
- [43] D. Magde, G. E. Rojas, P. G. Seybold, *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 737-744.

Atentamente

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2018

Dr. José Norberto Farfán García
Tutor

Q.I. Diego Isaac Martínez Bourget
Alumno