



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DESARROLLO DE UN SENSOR NO SELECTIVO A IONES PARA DETECCIÓN
SELECTIVA DE FUERZA IÓNICA EN AMBIENTES SUBCELULARES**

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

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

BQD. Jorge Armando López Vázquez

Dr. Arturo Jiménez Sánchez
INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, ABRIL 2023



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 UN SENSOR NO SELECTIVO A IONES PARA DETECCIÓN
SELECTIVA DE FUERZA IÓNICA EN AMBIENTES SUBCELULARES

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

BQD. Jorge Armando López Vázquez

Dr. Arturo Jiménez Sánchez
INSTITUTO DE QUÍMICA



Ciudad de México, Abril 2023

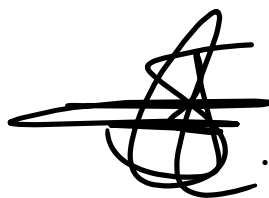
Jurado asignado

Presidente	Dr. Jesús Valdés Martínez	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dra. Rosa Luisa Santillán Baca	CINVESTAV, IPN
Vocal	Dr. Braulio Víctor Rodríguez Molina	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Jesús Rodríguez Romero	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Arturo de Jesús García Mendoza	FES-Cuautitlán

Lugar donde se llevó a cabo la realización del proyecto:

Laboratorio 5, edificio C, Instituto de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México.

Bajo la dirección del Dr. Jiménez Sánchez Arturo



Sustentante
López Vázquez Jorge Armando



The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not "Eureka!"
(I found it!) but "That's funny..."
-Isaac Asimov

Agradecimientos

A la universidad Nacional Autónoma de México, al instituto de Química y al Posgrado en Ciencias Químicas por las oportunidades brindadas para llevar a cabo mi proyecto y darme las posibilidades para crecer tanto personal como profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría, N° de CVU: 1099650. Y al programa DGAPA-PAPIIT por el financiamiento del proyecto IA200522.

A mi papá, mi mamá y mis hermanos que me han apoyado en los momentos difíciles y nunca se rindieron conmigo, a ellos les debo todos mis logros y no existe amor más puro que el que siento por mi familia.

Al Doctor Arturo Jiménez Sánchez por recibirme en su laboratorio “BioChela”, el apoyo y tiempo que dedico a la realización de mi proyecto y la paciencia en cantidades industriales que me ha tenido durante estos años.

A los miembros del Jurado por el tiempo que se tomaron para revisar el presente trabajo, sus invaluable comentarios y correcciones brindadas para mejorarlo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Javier Ordoñez, Cynthia Juárez, Juan Luis Cortés por el conocimiento y apoyo que me dieron durante mi estancia en el laboratorio, Oscar Anguiano e Ixsoyen Vázquez por su agradable y carismática compañía, a Jasmine Bernal por los chismitos.

A Daniel Corzas, Daniel Bautista, Jorge Granados y Paola Rodríguez por todas las horas que hemos compartido, las largas e interesantes pláticas dentro y fuera de los laboratorios del instituto de Química.

A Emiliano Godínez, Brenda Flores, Diana Chaparro, el mandilón de Enrique Lezama, Alejandro Huerta, Heriberto Pineda, Alejandra Bernal, Bruno Rivera, por todos los años de amistad, apoyo y por haberme soportado tantos años, a Estefanía Rodríguez por enseñarme a echar una lloradita para darle con todo, a Montserrat Ortiz y Diego Garduño por su amistad, el haberme perdonando por casi incendiar su departamento y provocarle quemaduras de segundo grado a Diego.

A mis pequeños estudiantes Jorge Aviña y Alexandra Muñoz por permitirme ser parte de su introducción al mundo académico, guiándolos durante su breve estancia en el laboratorio, a Yamile González por haber entrado en mi vida y haberse convertido en una persona invaluable quien me ha aconsejado, apoyado y acompañado en los momentos complicados.

A la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar por su apoyo con los análisis de resonancia magnética nuclear. Al M. en C. Everardo Tapia Mendoza por su ayuda para la obtención de los análisis de espectrometría de masas. A la Dra. Ruth Rincón Heredia (Unidad de Imagenología del IFC-UNAM) por la microscopía de imagen y a la Dra. Adriana Romo Pérez, por el cultivo de las líneas celulares.

Tabla de contenidos

Agradecimientos	i
Abreviaturas y acrónimos.....	iii
Antecedentes.....	1
Propuesta	7
Hipótesis.....	8
Objetivo	8
Resultados.....	9
Síntesis de los Piridinios.....	9
Formación del fragmento donador.....	11
Estudios de solvatocromismo	15
Titulación ácido-base por espectroscopia UV-Vis y de emisión.....	17
Estudio del efecto de la hidratación del medio.....	19
Estudio de respuesta a viscosidad	21
Conclusiones y perspectivas.....	24
Parte experimental.....	25
Síntesis	25
Mediciones ópticas:.....	28
Cálculos computacionales.....	29

Abreviaturas y acrónimos

Å	Ángstrom	MeNH ₂	Metilamina
ACN	Acetonitrilo	MeOH	Metanol
AcOEt	Acetato de etilo	mg	Miligramo
B3LYP	Funcional híbrido	min	Minuto
CHCl ₃	Cloroformo	mL	Mililitro
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano	mmol	Milimol
cm ⁻¹	1/centímetro	<i>n</i>	Índice de refracción
δ	Desplazamiento químico	NaOH	Hidróxido de sodio
D-A-D	Sistema donador-aceptor-donador	NI	Naftalimida
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol	nm	Nanómetro
d	Doblete	pH	Potencial de hidrógeno
dd	Doble de dobles	p <i>K</i> _a	Constante de acidez
DFT	Teoría de funcional de la densidad	POCl ₃	Cloruro de fosforilo
DMF	Dimetilformamida	ppm	Partes por millón
DMSO	Dimetilsulfóxido	RMN	Resonancia magnética nuclear
ε	Coefficiente de absortividad molar	s	Segundo/singulete
EtOH	Etanol	s ⁻¹	1/ Segundo
EPR	Resonancia paramagnética electrónica	S ₀	Estado singulete basal
FRET	Transferencia de energía por resonancia de Förster	S ₁	Primer estado singulete excitado
GED	Grupo electro donador	SO ₃ ⁻	Anión sulfito
HClO ₄	Ácido perclórico	T ₁	Primer estado triplete excitado
H ₂ O	Agua	td	Triple de dobles
HOMO	Orbital molecular ocupado de más alta energía	TLC	Cromatografía en capa fina
h	Hora	<i>v</i> _A	Número de onda de la absorción
<i>hν</i>	Fotón	$\overline{\nu}_F$	Número de onda de la emisión
Hz	Hertz	u.a.	Unidades arbitrarias
λ _{em}	Longitud de onda de emisión	UV-Vis	Espectroscopia ultravioleta-visible
λ _{ex}	Longitud de onda de excitación	Φ	Rendimiento cuántico de fluorescencia
LUMO	Orbital molecular desocupado de más baja energía		
μ _E	Momento dipolar en estado excitado		
μ _G	Momento dipolar en estado basal		
m	Multiplete		
<i>m/z</i>	Relación masa carga del ion		

Antecedentes

La luminiscencia es la emisión de radiación electromagnética usualmente luz visible causada por la absorción de luz por parte de átomos o moléculas en un material y ocurre desde estados electrónicamente excitados. La luminiscencia se divide generalmente en 2 categorías, fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza de los estados excitados.

En estados singuletes, el electrón que se encuentra en el orbital excitado se encuentra apareado, es decir se encuentra con espín opuesto al electrón que corresponde al orbital del estado basal. El regreso al estado basal es una transición permitida por espín y ocurre rápidamente con la emisión de un fotón. Las tasas de emisión de fluorescencia son típicamente de *ca.* 10^8 s^{-1} con tiempos de vida son cercanos a los 10^{-8} s .¹

Para describir el proceso subsecuente a la absorción de luz, es conveniente el uso de un diagrama de energía en el que los estados electrónicos de una molécula son representados junto con flechas que indican las posibles transiciones entre ellos. Los llamados procesos fotofísicos, incluyendo la absorción de la luz, se discuten convenientemente utilizando el diagrama de Jablonski (**Figura 1**). En este diagrama, los estados electrónicos están representados por líneas gruesas horizontales dispuestos en orden vertical para indicar las energías relativas (S_0 , S_1 , T_1). En la mayoría de las moléculas orgánicas el estado basal se considera como singulete (S_0). Las líneas delgadas entre un estado electrónico y otro representan los estados vibracionales de las moléculas.

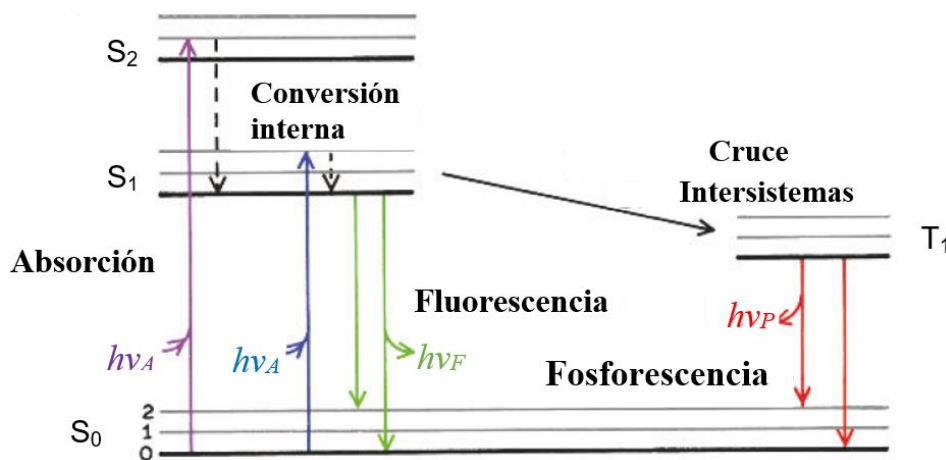


Figura 1. Diagrama de Jablonski simplificado. Adaptado de Lakowicz (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer

¹ Introduction to Fluorescence. in *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (ed. Lakowicz, J. R.) 1–26 (Springer US, 2006). doi:10.1007/978-0-387-46312-4_1.

Las tasas y constantes de equilibrio en reacciones químicas, así como la posición e intensidad de bandas de absorción ya sea en espectroscopia infrarroja, RMN, EPR, entre otras técnicas son dependientes de la polaridad del disolvente. La influencia del disolvente en la posición al equilibrio químico fue descubierta en 1896 de manera independiente por Claisen, Knorr y Wislicenus.² La polaridad del disolvente y el ambiente local tienen profundos efectos sobre las propiedades de emisión espectral en los fluoróforos y tienen su origen en la ley de Stokes, la cual establece que la luz emitida mediante el mecanismo de fluorescencia generalmente es de una longitud de onda más larga que la luz absorbida, es decir, de menor energía. Así, la diferencia entre el máximo de una banda de absorción y el máximo de una banda de emisión se le conoce como desplazamiento de Stokes. Esta pérdida de energía es debido a una variedad de procesos dinámicos que ocurren después de la absorción de un fotón.³

Una vez que el fluoróforo es excitado (usualmente a un nivel vibracional en S_1), el exceso de energía vibracional puede perderse rápidamente debido a su interacción con el disolvente, el disolvente desplaza la emisión a longitudes de onda mayores que la longitud de onda de excitación debido a la estabilización del estado excitado por efecto de solvatación, típicamente en el estado excitado las moléculas son estabilizadas más eficientemente por disolventes polares ya que poseen un momento dipolar mayor (μ_E) que en el estado basal (μ_G). Con el aumento en la constante dieléctrica del medio, las moléculas de disolvente se reorientan estabilizando al fluoróforo en el estado excitado, este efecto resulta en la emisión a energías menores o longitudes de onda mayores, (**Figura 2**).

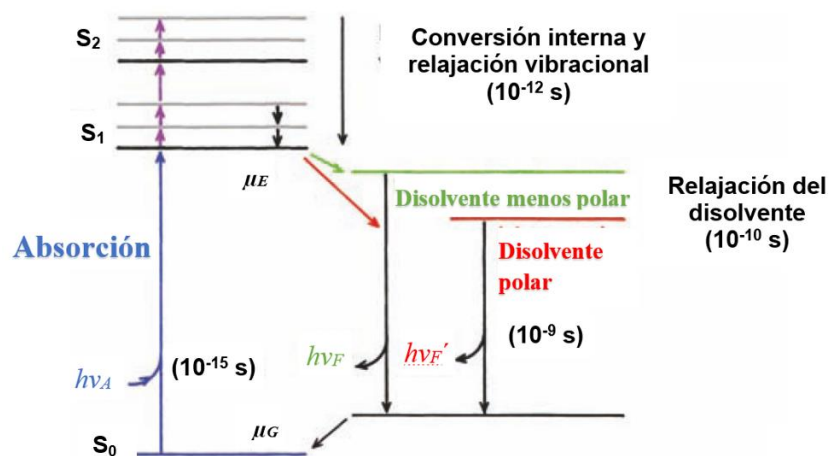


Figura 2. Diagrama de Jablonski simplificado de fluorescencia con efecto de polaridad de disolvente. *Adaptado de Lakowicz (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer*

² Solvent Effects on the Position of Homogeneous Chemical Equilibria. in *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry* 93–145 (2002). doi:<https://doi.org/10.1002/3527601791.ch4>.

³ Environmental Effects on Fluorescence Emission. in *Molecular Fluorescence* 109–140 (2012). doi:<https://doi.org/10.1002/9783527650002.ch5>.

Las interacciones entre las moléculas de disolvente y el fluoróforo afectan la diferencia de energía entre el estado excitado y el estado basal.

Esta diferencia de energía es una característica que se relaciona al índice de refracción (n) y a la constante dieléctrica del disolvente y se puede describir con la ecuación de Lippert-Mataga:

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) * \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + \text{Constante}$$

Donde h es la constante de Planck, c la velocidad de luz en el vacío, a es el radio de la cavidad del fluoróforo, $\bar{\nu}_A$ y $\bar{\nu}_F$ son los números de onda en cm^{-1} de la absorción y emisión respectivamente.

Por su parte, los sensores fluorescentes son una poderosa herramienta para recabar información de la actividad subcelular y debido al desarrollo de técnicas de microscopia de fluorescencia éstas permiten ubicar distintas regiones mediante la respuesta a la polaridad intracelular.⁴ Ya que esta última es de vital importancia en la diversificación, diferenciación, proliferación, morfogénesis y motilidad celular, una sonda capaz de diferenciar regiones con altos niveles de lípidos y/o proteínas es altamente deseable.⁵ Es bien conocido que los parámetros de ambiente local (como la polaridad, viscosidad, pH y temperatura) en sistemas biológicos tienen un papel clave en la regulación de transportación, difusión e interacciones intermoleculares. Se han correlacionado cambios en estos parámetros con algunas alteraciones en funciones fisiológicas y/o enfermedades.⁶ La polaridad celular es un parámetro que retroalimenta nuestra comprensión sobre el estatus celular y los mecanismos de regulación. Estos complejos mecanismos establecen y mantienen la funcionalidad de dominios particulares en el citoplasma y membrana plasmática.⁷

Las sondas fluorescentes sensibles al medio están principalmente compuestas de un sistema aromático con grupos electrodonadores y electroaceptores. Los fluoróforos sensibles al medio pueden cambiar sus propiedades fluorescentes en respuesta a la polaridad del medio local.

⁴ Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y. & Tsien, R. Y. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 906–918 (2002).

⁵ Vaidžilytė, K., Coppey, M. & Schauer, K. Intracellular organization in cell polarity – placing organelles into the polarity loop. *J Cell Sci* 132, jcs230995 (2019).

⁶ Dutta, T., Pal, K. & Koner, A. L. Intracellular Physical Properties with Small Organic Fluorescent Probes: Recent Advances and Future Perspectives. *The Chemical Record* 22, e202200035 (2022).

⁷ Qin, X., Yang, X., Du, L. & Li, M. Polarity-based fluorescence probes: properties and applications. *RSC Med Chem* 12, 1826–1838 (2021).

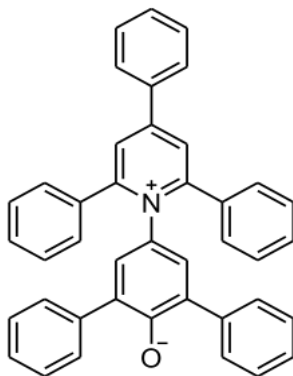


Figura 3. Estructura de la betaína 30 (colorante de Reichardt).

Tal es el caso de la betaína 30 o “colorante de Reichardt”, (**Figura 3**) es un colorante orgánico perteneciente a la clase de betaínas azomerocianínicas, la cual es notable por sus propiedades solvatocrómicas.⁸ Estos compuestos son considerados como zwitteriones en el estado basal, después de la excitación ocurre una transferencia de electrón desde el átomo de oxígeno del centro del sistema aromático, disminuyendo su momento dipolar en el estado excitado.⁹ Es decir, tiene un efecto solvatocrómico negativo. No obstante, estas estructuras no emiten fluorescencia en la región visible del espectro electromagnético.

Las sondas fluorescentes orgánicas presentan algunas ventajas en comparación con las sondas biológicas, tales como mayor estabilidad, la síntesis no requiere equipo de laboratorio sofisticado, entre otras. Actualmente, las sondas fluorescentes son ampliamente usadas en investigación, medicina traslacional y en aplicaciones a nivel industrial.¹⁰

En cuanto al microambiente químico, uno de los parámetros que juega un rol esencial en la dinámica de interacción entre una sonda fluorescente y su entorno es la fuerza iónica, la cual impacta ampliamente dichas interacciones, particularmente de naturaleza electrostática, dentro de la célula. Para comprender su rol dentro del campo de la fisiología celular, es necesario un sensor que permita cuantificarla en el ambiente subcelular. Esta se define como la concentración efectiva de iones e interacciones electrostáticas presentes en el medio. Se considera de gran relevancia ya que determina la estructura de proteínas desordenadas intrínsecamente, actividad de enzimas, agregación de proteínas, unión de proteínas a ácidos nucleicos y otros procesos, gobierna el volumen de la célula activando los canales y transportadores involucrados. En ese

⁸ Machado, V. G., Stock, R. I. & Reichardt, C. Pyridinium N-Phenolate Betaine Dyes. *Chem Rev* **114**, 10429–10475 (2014).

⁹ Reichardt, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem Rev* **94**, 2319–2358 (2002).

¹⁰ Endesfelder, U. Super-Resolution Microscopy. A Practical Guide. By Udo J. Birk. *Angewandte Chemie International Edition* **57**, 7939 (2018).

sentido, el conocimiento de la fuerza iónica en las células se requiere para comprender la dinámica de las biomacromoléculas. Debido a la interacción que existe entre las especies iónicas y otras biomoléculas, no se puede medir directamente cuantificando la concentración total de iones, es necesario cuantificar la concentración “efectiva” de estos.¹¹

En 2017 Liu Boqun y colaboradores diseñaron una sonda para medir fuerza iónica en células vivas basada en transferencia de energía utilizando alfa hélices cargadas positiva y negativamente cuyas interacciones electrostáticas dependían de la fuerza iónica del medio, sin embargo, la producción de esta clase de sondas basadas en proteínas incrementa los costos y requiere de herramientas complejas de ingeniería genética para su desarrollo y estudio analítico.¹²

Una posible versión de molécula orgánica pequeña podrían ser los derivados de sales de pirilio son conocidos como cromóforos altamente fluorescentes, usados en un amplio rango de aplicaciones. Chakraborty y colaboradores en 2020 sintetizaron un nuevo fluoróforo pentacíclico rígido con núcleo de pirilio, (**Figura 4**). La sonda posee un sistema donador-aceptor-donador (D-A-D), en el cual el pirilio actúa como aceptor y los anillos de fenol como donadores.¹³

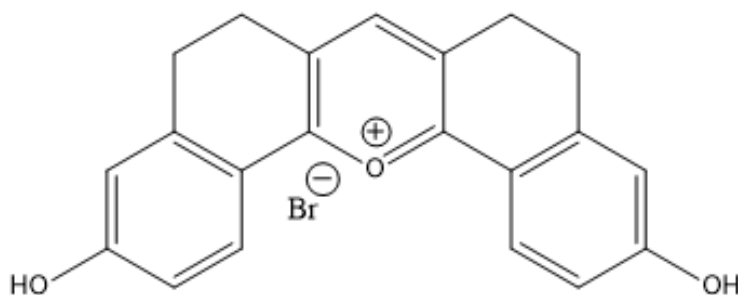


Figura 4. Estructura química de la sonda fluorescente **Ps-OH**.

La nueva familia de sondas fluorescentes sintetizadas en el grupo de Chakraborty adopto el nombre de **IndiFluors**, formados por unidades con núcleo de pirilio, piridinio y piridina tanto simétricos como asimétricos. Tales sondas mostraron desplazamientos de Stokes de 37 a 154 nm, rendimientos cuánticos de emisión de Φ : 0.01 a 0.96 y rangos de emisión variables.¹⁴

¹¹ Honig, B. & Nicholls, A. Classical Electrostatics in Biology and Chemistry. *Science* (1979) 268, 1144–1149 (1995).

¹² Liu, B., Poolman, B. & Boersma, A. J. Ionic Strength Sensing in Living Cells. *ACS Chem Biol* 12, 2510–2514 (2017).

¹³ Chakraborty, S. et al. A new pentacyclic pyrylium fluorescent probe that responds to pH imbalance during apoptosis. *Chem Sci* 11, 12695–12700 (2020).

¹⁴ Munan, S. et al. IndiFluors: A New Full-Visible Color-Tunable Donor–Acceptor–Donor (D1–A–D2) Fluorophore Family for Ratiometric pH Imaging during Mitophagy. *ACS Sens* 0, (2022).

Por su parte, la viscosidad como un parámetro del microambiente esta cercanamente asociada con múltiples procesos celulares y enfermedades.¹⁵ Esta cercanamente relacionado con la funcionalidad en los lisosomas. El lisosoma tiene un rol significativo en los procesos celulares tales como la degradación de proteínas, secreción, reparación de la membrana plasmática y la autofagia. Por tal razón el desarrollo de sondas capaces de monitorearla es de gran relevancia.¹⁶

Es conocido que las moléculas que poseen en su esqueleto π un grupo con un alto grado de libertad alrededor de un enlace, es decir que dicho enlace puede rotar, pueden tener un efecto dramático en la intensidad de emisión de fluorescencia.¹⁷

Las sondas con grupos capaces de rotar poseen baja o nula fluorescencia en medios poco viscosos, sin embargo, “encienden” su emisión de fluorescencia ante el incremento en la viscosidad del medio. Esta propiedad puede explotarse en diferentes aplicaciones biológicas como localización lisosomal, mitocondrial, así como en estudios de bioimagen, (**Figura 5**).



Figura 5. Resumen de sondas de viscosidad basadas en diferentes aplicaciones biológicas.

¹⁵ Yang, X., Zhang, D., Ye, Y. & Zhao, Y. Recent advances in multifunctional fluorescent probes for viscosity and analytes. *Coord Chem Rev* 453, 214336 (2022).

¹⁶ Ma, C. et al. A minireview of viscosity-sensitive fluorescent probes: design and biological applications. *J Mater Chem B* 8, 9642–9651 (2020).

¹⁷ Xiao, H., Li, P. & Tang, B. Small Molecular Fluorescent Probes for Imaging of Viscosity in Living Biosystems. *Chemistry – A European Journal* 27, 6880–6898 (2021).

Propuesta

Se propone el desarrollo de una nueva sonda fluorescente que incorpore cargas positivas y negativas en su estructura para monitoreo de parámetros químicos y fisicoquímicos como viscosidad, fuerza iónica e hidratación.

Para diseñar la sonda, se requería un fragmento catiónico y aniónico, conectados mediante un puente conjugado, se optó por un sistema de 1,8-naftalimida con un sustituyente cargado negativamente, estos son sistemas de gran interés debido a sus diversas propiedades optoelectrónicas, y el fragmento catiónico estaría conformado por un fluoróforo tipo IndiFluor, cuyo núcleo basado en piridinio nos aportaba la carga positiva.

No obstante, en la búsqueda de dicha sonda molecular, se encontraron propiedades innovadoras e interesantes en un derivado tipo Reichardt fluorescente (**Figura 6**), la cual estabiliza la distribución de cargas en un eje conjugado de la molécula.

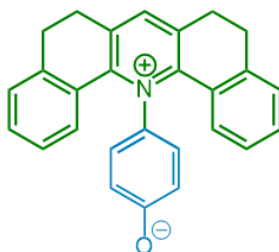


Figura 6. Sonda tipo Reichardt fluorescente.

Hipótesis

A partir de la propuesta de una sonda fluorescente que incorpore una carga positiva y una carga negativa para monitoreo de fuerza iónica, las sondas fluorescentes tipo Reichardt logran estabilizar la distribución de dichas cargas en el estado basal y, por otro lado, es posible que se activen las propiedades emisivas en este tipo de cromóforos al disminuir la libertad conformacional de su estructura, es decir, hacerla más rígida.

Objetivo

Desarrollar una sonda fluorescente que incluya en su estructura grupos iónicos con suficiente distancia, es decir, un momento dipolar estático significativo, para monitorear ambiente iónico y propiedades fisicoquímicas locales como polaridad, además de presentar permeabilidad a membranas celulares.

Objetivos particulares:

- Llevar a cabo el diseño y síntesis de sondas tipo Reichardt fluorescentes.
- Caracterizar estructuralmente por medio de técnicas espectroscópicas los productos obtenidos.
- Obtener las estructuras optimizadas para los derivados basados en los fluoróforos denominados IndiFluors mediante el uso de herramientas computacionales
- Mediante el uso de herramientas computacionales analizar las distribuciones HOMO y LUMO de las moléculas de interés.
- Realizar los estudios de espectroscopia UV-Vis y microscopia de fluorescencia.

Resultados

En el transcurso de este trabajo se presenta el diseño y ruta de síntesis de una sonda para la detección de fuerza iónica, junto con la síntesis de 3 sondas zwitteriónicas con núcleo de piridinio y con potencial uso como sondas solvatocrómicas y de viscosidad con su correspondiente caracterización estructural y en el caso de la sonda **PirFen2** su caracterización fotofísica de estado estacionario.

También se realizó la síntesis de 3 derivados de piridinio y se realizó un análisis computacional para comparar las diferencias estructurales entre estos derivados y las sondas previamente mencionadas.

Síntesis de los Piridinius

El primer paso es la formación de un precursor con un aldehído a partir de la correspondiente 6-X-1-tetralona (**Figura 7**), la formilación se llevó a cabo mediante una versión modificada de Vilsmeier-Hack. Esta reacción es una formilación de un compuesto heterocíclico o aromático rico en electrones utilizando *N,N*-dimetilformamida (DMF), como agente acilante en presencia de un reactivo activante como el POCl_3 .¹⁸

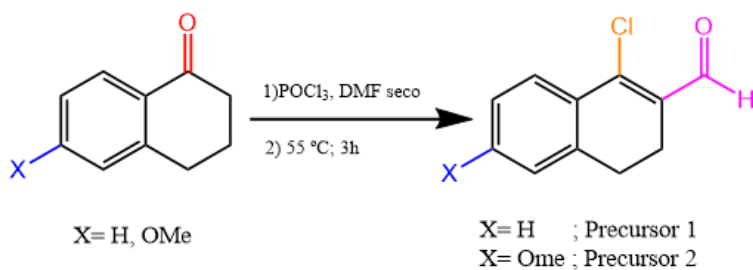


Figura 7. Esquema de reacción para la formación de los Precursores 1 y 2

El siguiente paso fue una condensación entre el aldehído de alguno de los precursores previamente sintetizados que y otro equivalente de 1-tetralona utilizando HClO_4 como catalizador de Lewis, para formar el Pirilio correspondiente. (**Figura 8**)

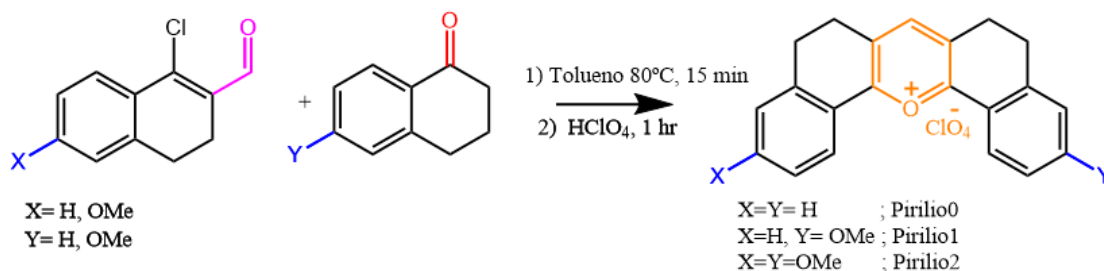


Figura 8. Esquema de reacción para la formación de los pirilios.

¹⁸ Su, W. et al. Recent Progress in the Use of Vilsmeier-Type Reagents. *Org Prep Proced Int* 42, 503–555 (2010).

El mecanismo propuesto para la formación de estos derivados se presenta a continuación, (Figura 9).

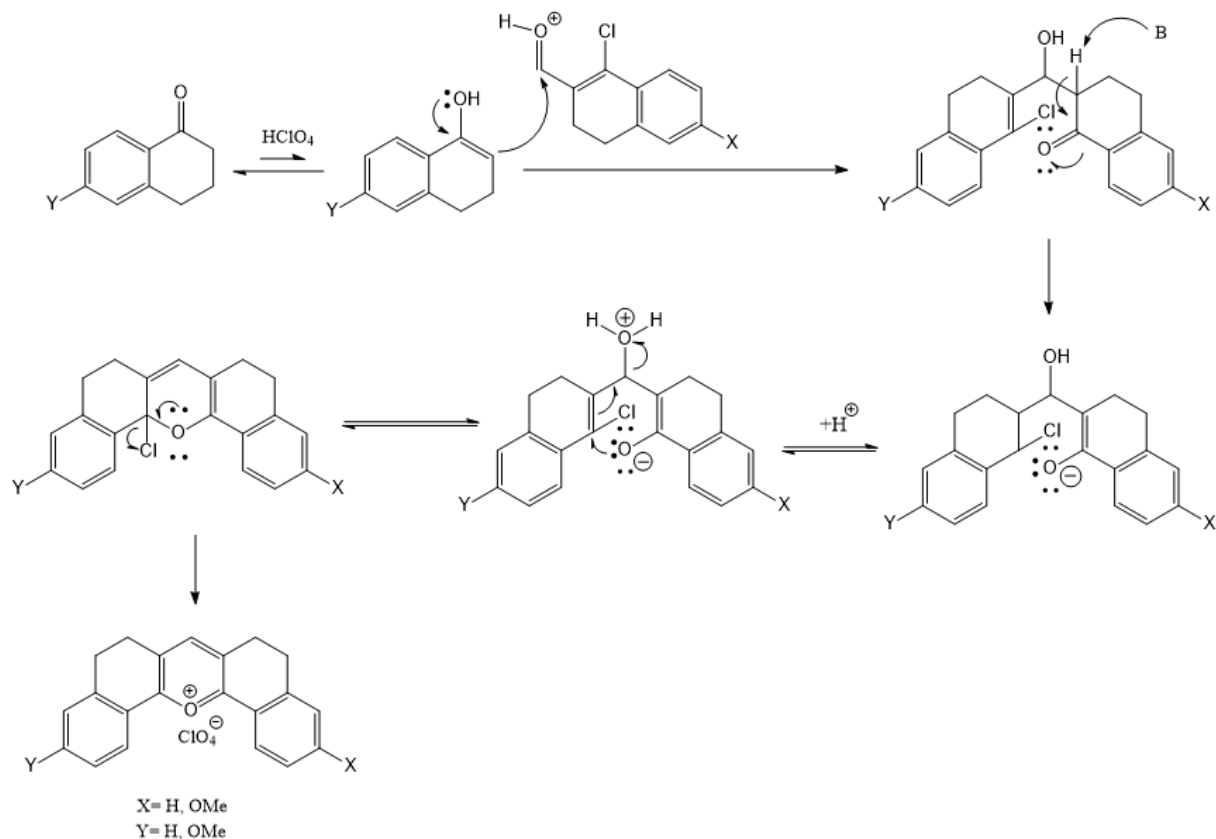


Figura 9. Mecanismo propuesto para la formación de Pirilios.

En el último paso para la obtención de las sondas tipo Reichardt fluorescente, se empleó una amina primaria aromática bajo las mismas condiciones que en la síntesis del colorante de Reichardt.¹⁹ La amina aromática fue el 4-aminofenol el cuál actúa como nucleófilo, mediante un ataque por parte de la amina al carbono alfa del núcleo de pirilio, provoca la apertura del anillo para producir una amida vinílica, posteriormente se cicla para la formación de la sal de piridinio correspondiente.²⁰

¹⁹ Kessler Otto S, M. A. W. An Improved Synthesis of the Solvatochromic Dye ET-30. *Synthesis* (Stuttg) 1988, 635–636 (1988).

²⁰ Katritzky, A. R. & Marson, C. M. Pyrylium Mediated Transformations of Primary Amino Groups into Other Functional Groups. *New Synthetic Methods* (41). *Angewandte Chemie International Edition in English* 23, 420–429 (1984).

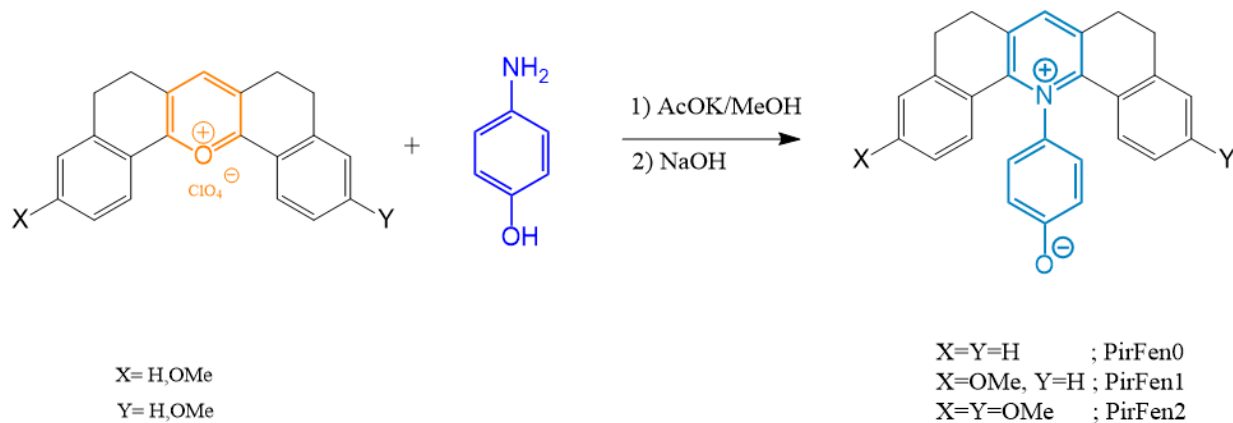


Figura 10. Esquema de reacción para la formación de los piridinos.

Para llevar a cabo la síntesis del fragmento con carga negativa se partió del anhídrido 4-sulfonaftálico y se hizo reaccionar con 2-aminoetanol siguiendo la ruta sintética para formar el precursor fluorescente con un alcohol en un extremo para conjugar a otra cadena y unir ambos fragmentos, (**Figura 11**).

Formación del fragmento donador

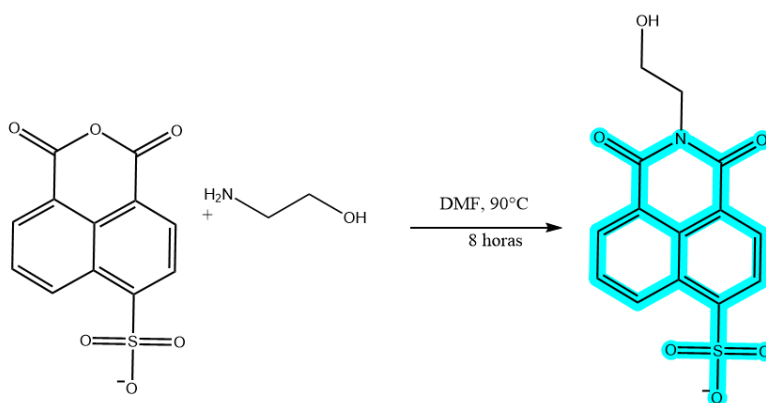


Figura 11. Esquema de reacción para la formación del precursor aniónico

Debido a la poca información presente de los fragmentos de piridinio de los denominados **IndiFluors**, se realizaron estudios de optimización de geometría para las moléculas **PirFen0**, **PirFen1** y **PirFen2** para estudiar con mayor profundidad su estructura.



Figura 12. Vista lateral (izquierda) e inferior (derecha) de la estructura optimizada de la sonda **PirFen0**, empleando el funcional híbrido *B3LYP* con el conjunto de bases *6-311G+(d,p)*

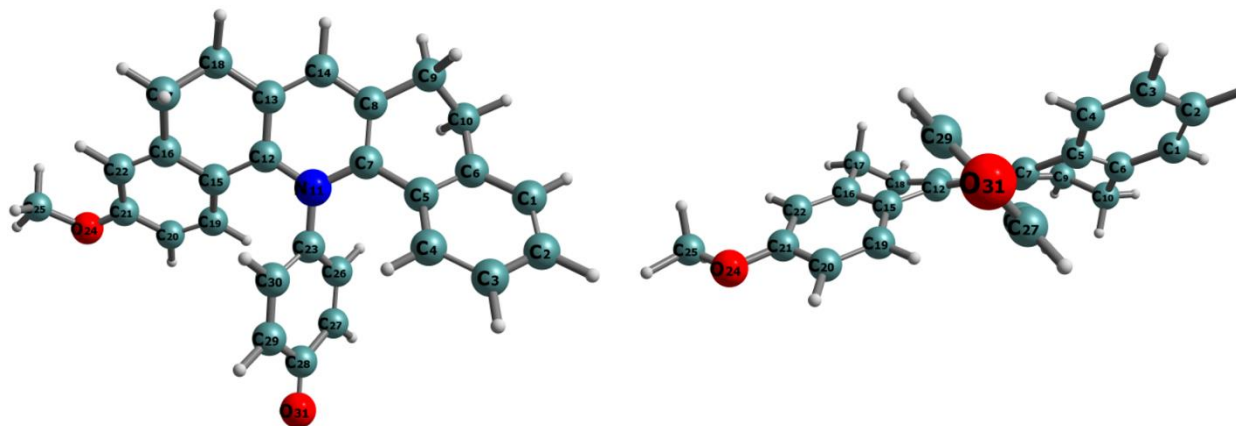


Figura 13. Vista lateral (izquierda) e inferior (derecha) de la estructura optimizada de la sonda **PirFen1**, empleando el funcional híbrido *B3LYP* con el conjunto de bases *6-311G+(d,p)*.

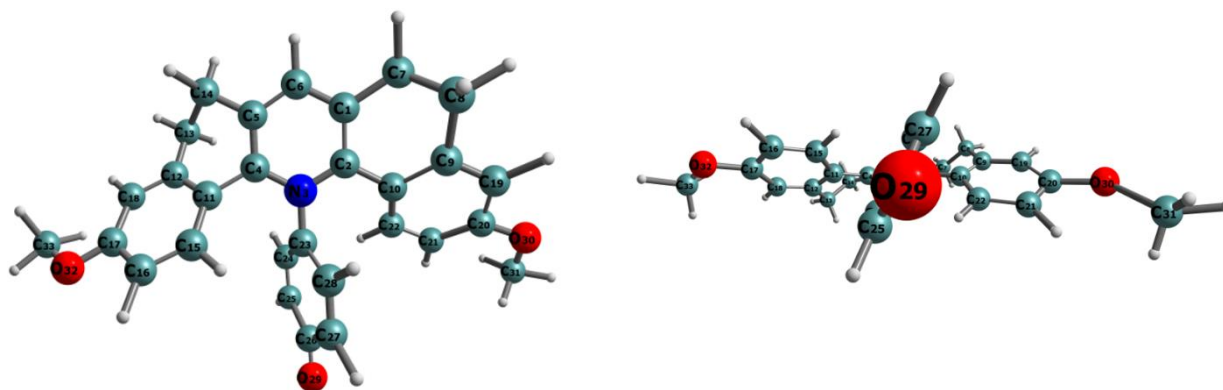


Figura 14. Vista lateral (izquierda) e inferior (derecha) de la estructura optimizada de la sonda **PirFen2**, empleando el funcional híbrido *B3LYP* con el conjunto de bases *6-311G+(d,p)*.

Las estructuras optimizadas de las sondas muestran en todos los casos que el fenolato adopta una conformación en la cual el anillo se encuentra ortogonal al resto del sistema conjugado, (**Figuras 12 – 14**).

Para comparar el efecto estructural de colocar un anillo aromático unido a través del nitrógeno del piridinio, se sintetizaron 3 análogos partiendo de los mismos pirilios con MeNH₂, mediante la siguiente reacción (**Figura 15**).

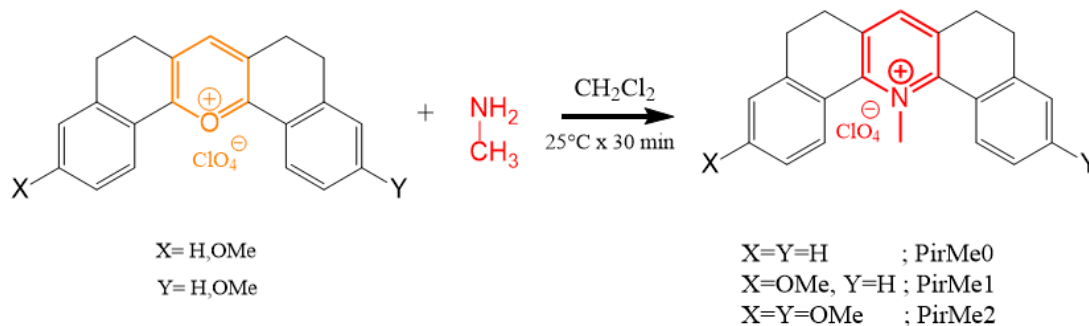


Figura 15. Esquema de reacción para la formación de piridinos con metil amina

Tales derivados mostraron un cambio en el color de la emisión de fluorescencia, tanto en estado sólido como en disolución, (**Figura 16**).



Figura 16. De izquierda a derecha. Las sondas **PirMe0**, **PirMe1** y **PirMe2** en estado sólido ($I_{\text{ex}} = 354 \text{ nm}$)

Los derivados de **PirFen** no son fluorescentes en el estado sólido y en disolución los 3 absorben y emiten en longitudes de onda más cortas que sus análogos **PirME** (con ligeros desplazamientos en la absorción y emisión entre ellos, a diferencia de los derivados **PirMe**, los cuales tienen diferencias significativas en la emisión, (**Figura 16**).

La sustitución de un hidrógeno por un grupo donador, como el -OMe, desplazó las bandas de absorción y emisión hacia longitudes de onda más largas, sin embargo, la sustitución del hidrógeno de la posición 3 de las sondas **PirMe#** desplazó la emisión incluso más que si se añaden

2 grupos donadores, es decir **PirMe1** que es no simétrica tiene su máximo de absorción y emisión en longitudes de onda más largas que **PirMe2** que contiene ambos -OMe en la posición 3 y 11 de la molécula.

Para recabar más información sobre las diferencias estructurales entre los derivados de piridinio con el fenolato y el metilo, se obtuvieron las geometrías optimizadas en el estado basal de los derivados **PirMe**, **PirMe1** y **PirMe2**, (Figura 17).

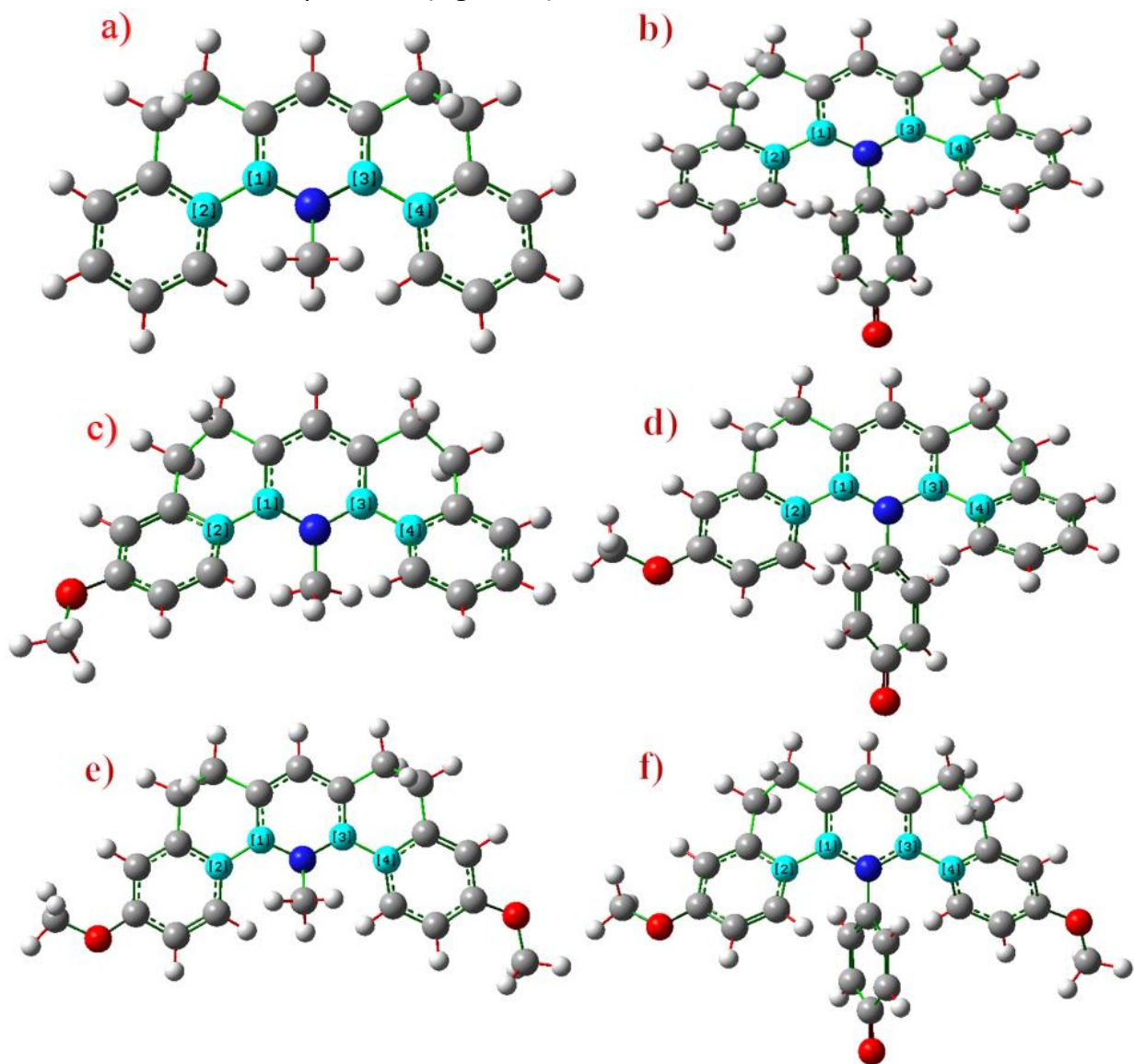


Figura 17. Estructuras optimizadas que muestran las longitudes de enlaces de los piridinios sintetizados, imagen a) **PirMe0**, b) **PirFen0**, c) **PirMe1**, d) **PirFen1**, e) **PirMe2** y f) **PirFen2**, las líneas en rojo son para los enlaces C-H, el verde oscuro para enlaces cortos y en verde claro los enlaces más largos. Todas las estructuras se obtuvieron empleando el funcional híbrido *B3LYP* con el conjunto de bases *6-311G+(d,p)*.

En la **Tabla 1** se describen las distancias de enlace de los derivados de piridinio enfocándose en el fragmento resaltado en turquesa, (**Figura 17**). Como se puede apreciar la incorporación del anillo de fenolato deforma la molécula ya que alarga los enlaces C-C (marcados en azul claro), mientras que el enlace N-C la distancia se acorta, lo que permite la rotación del fenolato.

Tabla 1. Distancias de enlace para el fragmento seleccionado, resaltado en turquesa (**Figura 17**).

	Distancias de enlace en Å		
	Enlace C1-C2	Enlace C3-C4	Enlace N-C
PirMe0	1.475	1.475	1.494
PirMe1	1.466	1.476	1.492
PirMe2	1.467	1.467	1.491
PirFen0	1.489	1.489	1.427
PirFen1	1.484	1.489	1.430
PirFen2	1.484	1.484	1.436

Debido a la similitud que presentaban las sondas con la betaína 30 se realizaron estudios UV-Vis a las sondas **PirFen0** y **PirFen2** en diferentes disolventes con la finalidad de caracterizar su posible solvatochromismo. Este estudio se describe a continuación.

Estudios de solvatochromismo

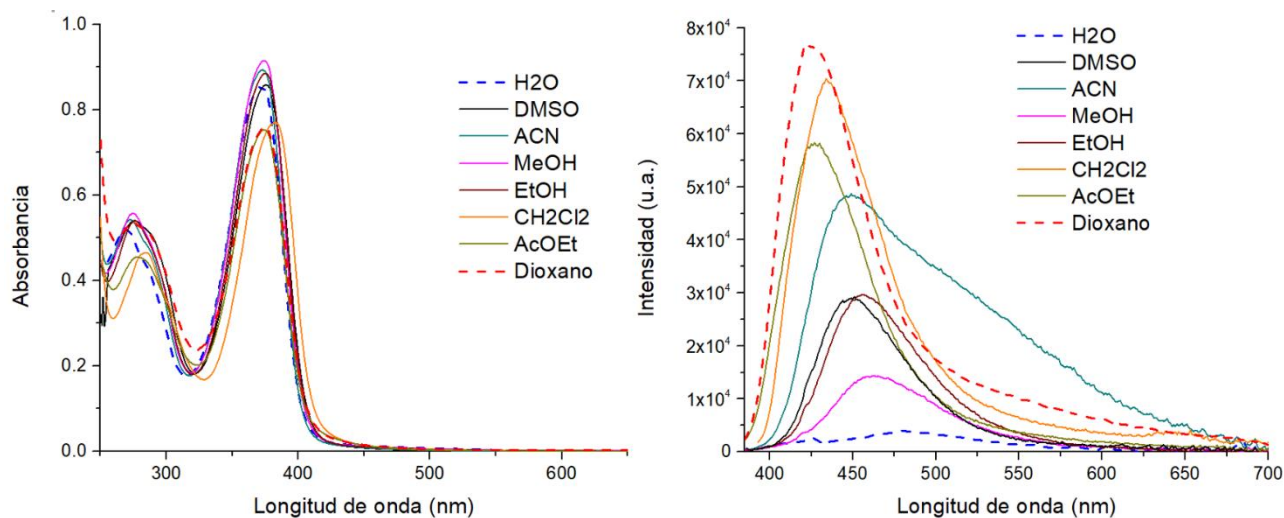


Figura 18. Espectros de absorbancia (izquierda) y de emisión de fluorescencia (derecha) de la molécula **PirFen0**. H₂O λ_{ex} =372 nm, DMSO λ_{ex} =376 nm, ACN λ_{ex} =373nm, MeOH λ_{ex} =374 nm, EtOH λ_{ex} =375 nm CH₂Cl₂ λ_{ex} = 383nm, AcOEt λ_{ex} =375 nm, Dioxano λ_{ex} =375 nm.

La sonda **PirFen0** posee un efecto solvatocrómico ligero, (**Figura 18**) esto debido a que su naturaleza de transferencia de carga intramolecular no es muy efectiva al no contener grupos electrodonadores formales en el eje longitudinal de la molécula.

A continuación, en la **Tabla 2** se enlistan las longitudes de onda de absorción y emisión, así como el desplazamiento de Stokes observados para la molécula **PirFen0** con distintos disolventes en orden descendiente de su constante dieléctrica.

Tabla 2. Listado de las λ de absorción y emisión de la sonda **PirFen0** en diferentes disolventes

Disolvente	Constante dieléctrica del disolvente	λ de absorción (nm)	λ de emisión (nm)	Desplazamiento de Stokes (cm^{-1})
Agua	80.1	372	480	92,592
DMSO	46.7	376	451	133,333
Acetonitrilo	37.5	373	449	131578
Metanol	32.7	374	463	112,359
Etanol	24.5	375	456	123,456
Diclorometano	8.93	383	434	204,081
Acetato de Etilo	6.02	375	427	192,307
Dioxano	2.25	375	422	212,765

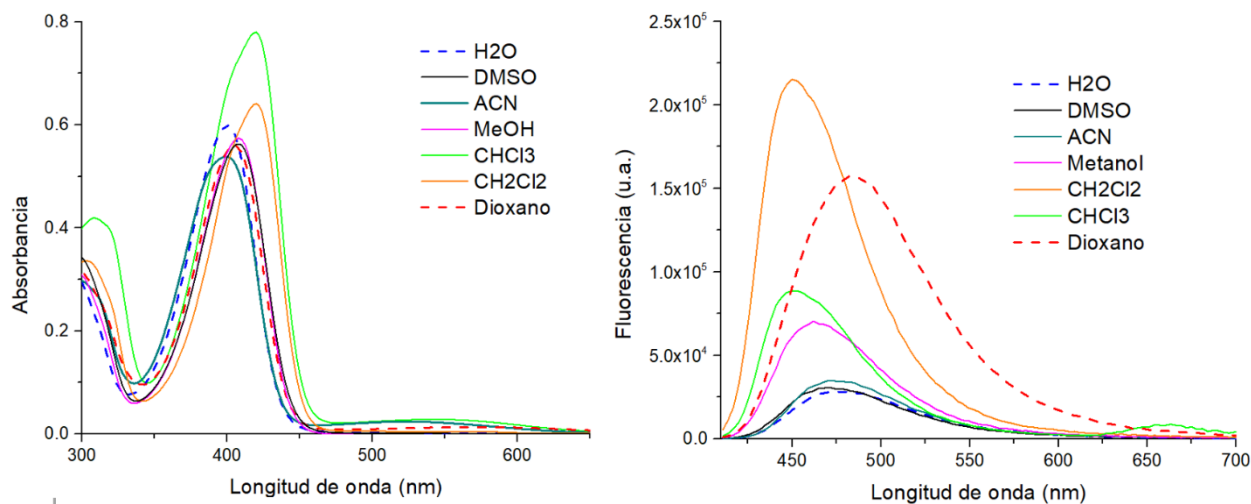


Figura 19. Espectros de absorción UV-Vis (izquierda) y de emisión de fluorescencia (derecha) de la molécula **PirFen2**. H₂O $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm, DMSO $\lambda_{\text{ex}} = 408$ nm, ACN $\lambda_{\text{ex}} = 400$ nm, MeOH $\lambda_{\text{ex}} = 410$ nm, CH₂Cl₂ $\lambda_{\text{ex}} = 420$ nm, CHCl₃ $\lambda_{\text{ex}} = 420$ nm, Dioxano $\lambda_{\text{ex}} = 404$.

Tabla 3. Listado de las λ de absorción y emisión de la sonda **PirFen2** en diferentes disolventes

Disolvente	Constante dieléctrica del disolvente	λ de absorción (nm)	λ de emisión (nm)	Desplazamiento de Stokes (cm^{-1})
Agua	80.1	400	474	135,135
DMSO	46.7	408	480	138,888
Acetonitrilo	37.5	400	471	140,845
Metanol	32.7	410	471	163,934
Diclorometano	8.93	420	471	196,078
Cloroformo	4.81	420	474	185,185
Dioxano	2.25	404	486	121,951

De manera similar, al comparar los espectros de emisión para la molécula **PirFen2** en distintos disolventes se evidenció un nulo desplazamiento en la energía de emisión. Solo se encontró un desplazamiento de 14 nanómetros entre el dioxano y el agua, (**Figura 19**)

La sonda **PirFen2** presenta algunas ventajas sobre **PirFen0**, tales como mayor solubilidad y por lo tanto, mayor intensidad de emisión en los disolventes estudiados.

Titulación ácido-base por espectroscopia UV-Vis y de emisión

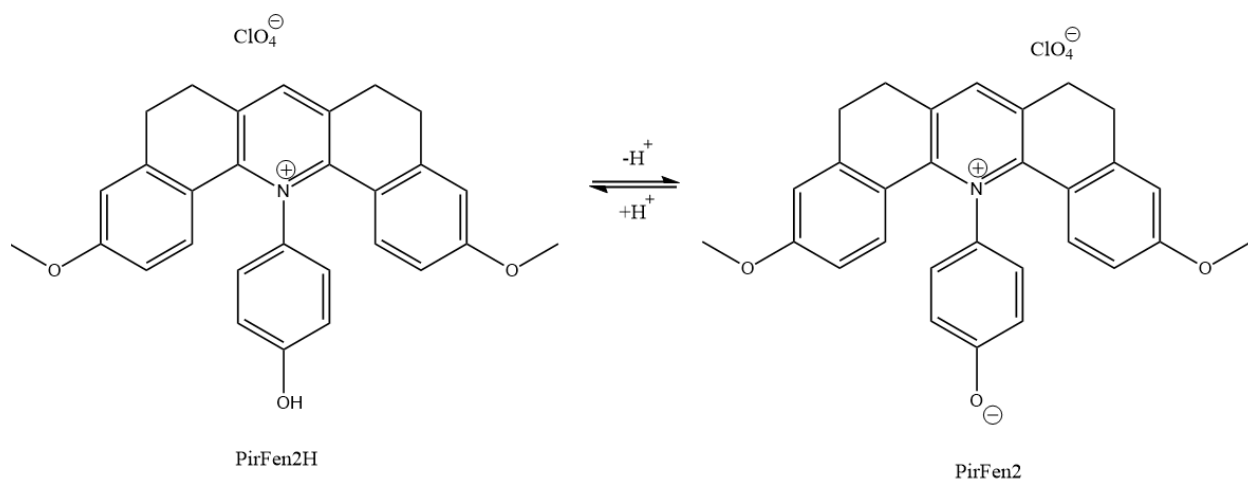


Figura 202. Equilibrio ácido-base de la sonda **PirFen2** (de lado izquierdo en su forma fenólica y de lado derecho su base conjugada como fenolato).

El espectro de absorbancia demostró la presencia de un punto isosbético en 420 nm, es decir la presencia de 2 especies químicas en dicha longitud de onda, lo cual es indicio del equilibrio ácido-base que corresponde a la forma protonada del fenol y su forma básica como fenolato (**Figura**

20). Se graficaron los datos de absorbancia para cada valor de pH a 400 nm, (Figura 21) obteniéndose la curva de valoración correspondiente (Figura 22).

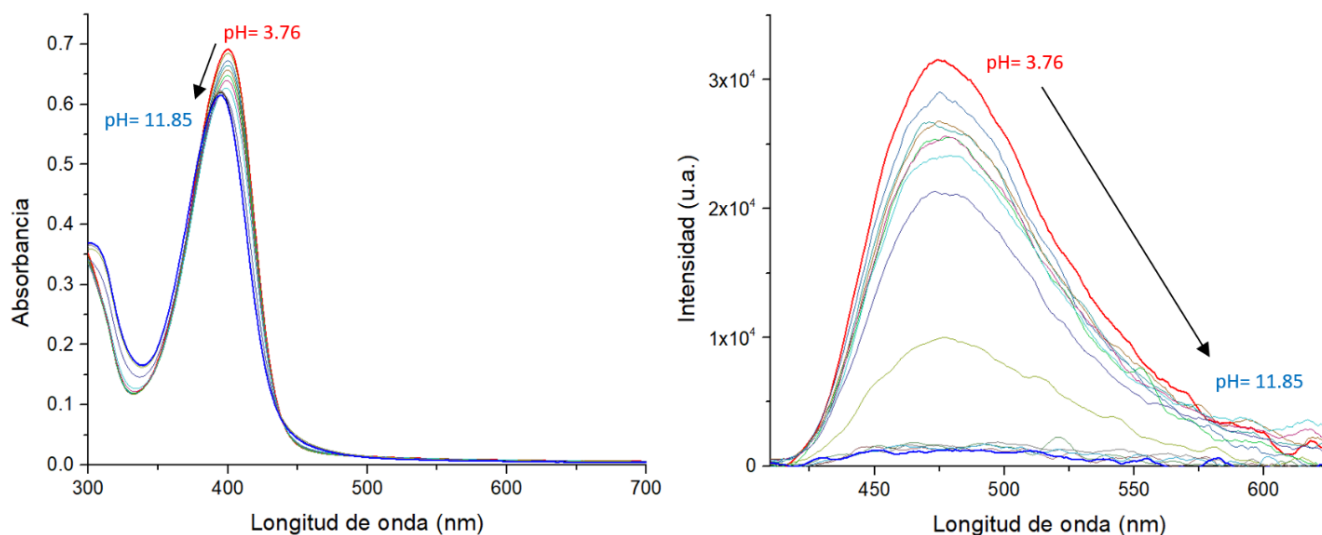


Figura 21. Espectros de absorbancia (izquierda) y de emisión de fluorescencia (derecha) de la sonda PirFen2 a cambios de pH ($\lambda=400$ nm).

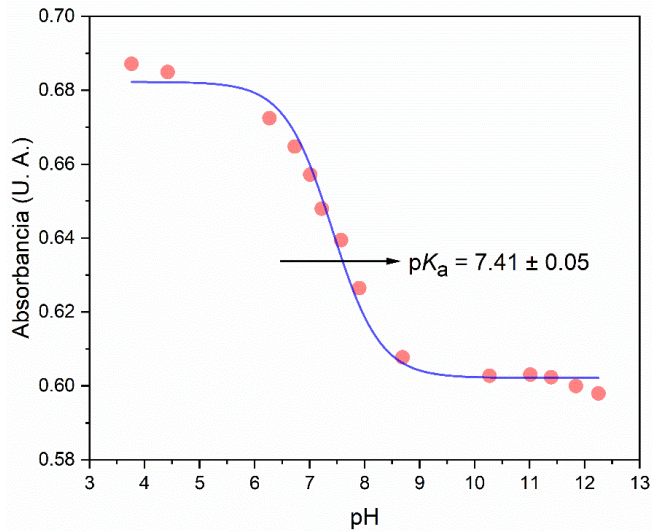


Figura 22. Curva de titulación ácido-base de la sonda PirFen2 graficada con los valores de absorción UV-Vis a 400 nm.

Con el ajuste correspondiente (*vide infra*), se determinó el valor de pKa de dicho equilibrio ácido – base, obteniéndose un valore de $pK_a = 7.41 \pm 0.05$.

El valor de pK_a de este equilibrio se calculó mediante la siguiente ecuación:

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

Donde;

$$A = \varepsilon_{PirFen2}[PirFen2]$$

$$B = \varepsilon_{PirFen2H}[PirFen2H]$$

$$x = pH$$

No se consideró la formación de homo y hetero conjugados con el fenol presente en la estructura debido a que la formación de estos ocurre principalmente en disolventes no donadores de hidrógeno y la titulación se realizó en un sistema acuoso.²¹

Estudio del efecto de la hidratación del medio.

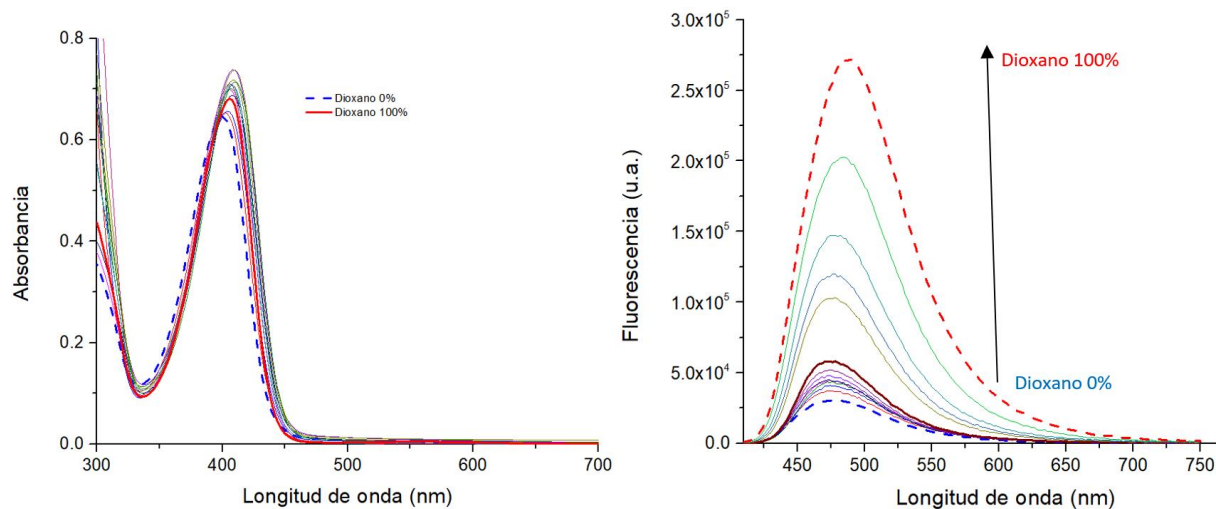


Figura 23. Espectro de absorbancia (izquierda) y espectro de emisión (derecha) con variación de proporción de disolventes (H_2O y dioxano) de la molécula **PirFen2** ($\lambda_{ex} = 400$ nm).

El efecto de hidratación del medio se hace evidente cuando la molécula se encuentra en un medio poco polar, en esta titulación se observó un aumento considerable en la intensidad de fluorescencia cuando la proporción dioxano/agua era 8:2 o mayor.

En los espectros de absorción se observa un ligero aumento gradual en la absorbancia conforme incrementa la proporción de dioxano/agua hasta 7:3, después de esta concentración la absorbancia disminuye.

²¹ Kolthoff, I. M. & Chantooni, M. K. Jr. Hydrogen-bond relations between homoconjugates and heteroconjugates of phenols and phenolates in acetonitrile. *J Am Chem Soc* **91**, 4621–4625 (1969).

La mayoría de las moléculas incrementa su momento dipolar después de la foto excitación, sin embargo, la sonda **PirFen2** disminuye su momento dipolar en el estado excitado.

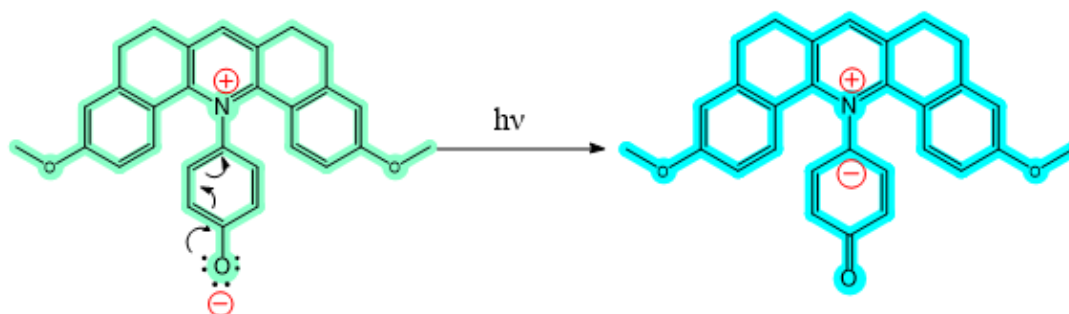


Figura 24. Estructuras zwitteriónicas de la sonda **PirFen2** en el estado basal (izquierda) y posterior a la absorción del fotón (derecha)

Se muestra la separación de cargas que existe entre el estado basal y el estado excitado, en el estado basal la carga negativa se encuentra sobre el átomo de oxígeno del fenolato, cuando ocurre la absorción del fotón el par de electrones ubicado en el orbital vacío (n) del oxígeno al ser de mayor energía absorbe dicho fotón y redistribuye su densidad electrónica, de tal manera que la carga negativa se posiciona en el carbono del fenolato que se encuentra unido al nitrógeno del piridinio, de esta forma las cargas se encuentran próximas entre sí, disminuyendo el momento dipolar de **PirFen2** en el estado excitado, (**Figura 24**)

Debido a la posible rotación del enlace N-C se realizó un estudio espectroscópico UV-Vis de viscosidad empleando 2 disolventes de distinto grado de viscosidad miscibles entre sí, capaces de disolver la sonda **PirFen2**, los disolventes empleados fueron el metanol y el glicerol.

Estudio de respuesta a viscosidad

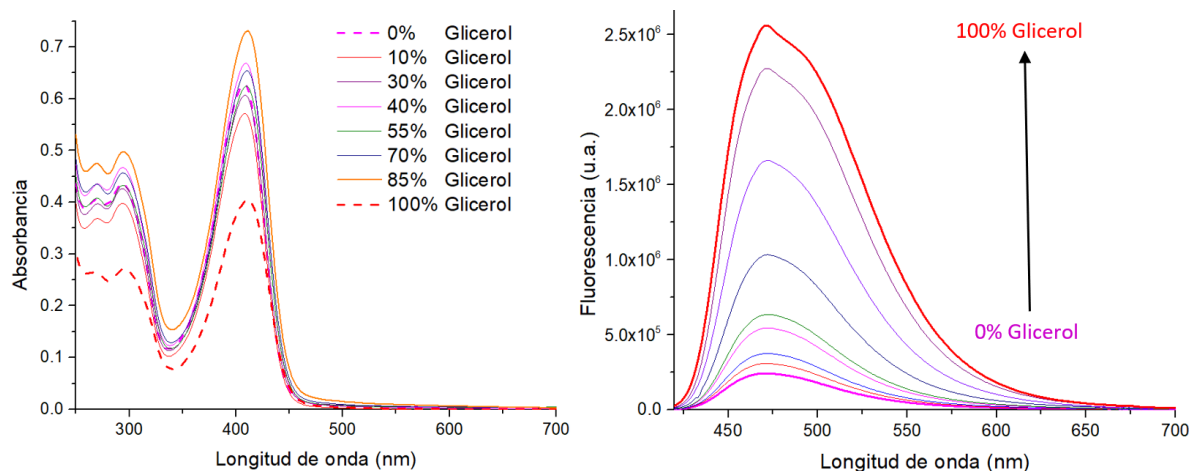


Figura 35. Espectro de viscosidad de absorbancia (izquierda) y espectro de emisión de fluorescencia (derecha) de la molécula PirFen2 ($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$).

Los espectros de emisión muestran una tendencia de aumento en la intensidad conforme la proporción glicerol/metanol aumenta, en los espectros de absorción no hay una tendencia con el cambio del efecto de viscosidad del medio, (**Figura 25**).

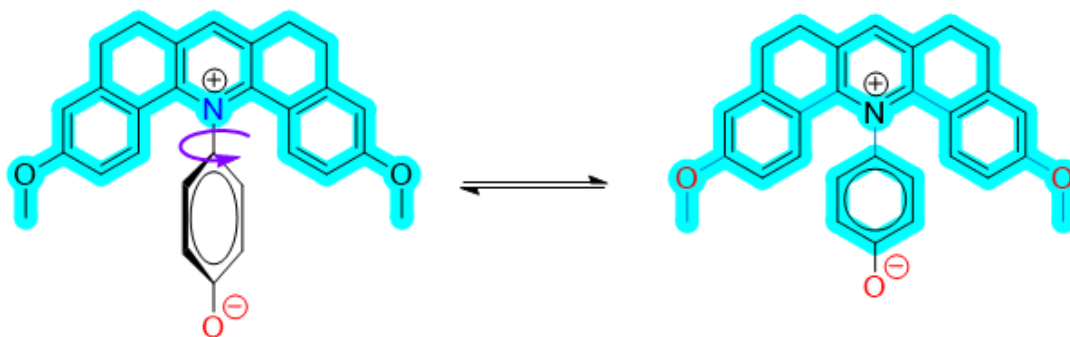


Figura 26. Esquema de la rotación del enlace N-C en la sonda PirFen2.

El enlace N-C puede rotar libremente, el análisis de la estructura optimizada muestra que el anillo del fenolato se encuentra ortogonal al resto del sistema π , sin embargo, en un ambiente de alta viscosidad, el anillo requiere de mayor energía para rotar de tal manera que el fragmento del fenolato se incorpora al sistema π , (**Figura 26**).

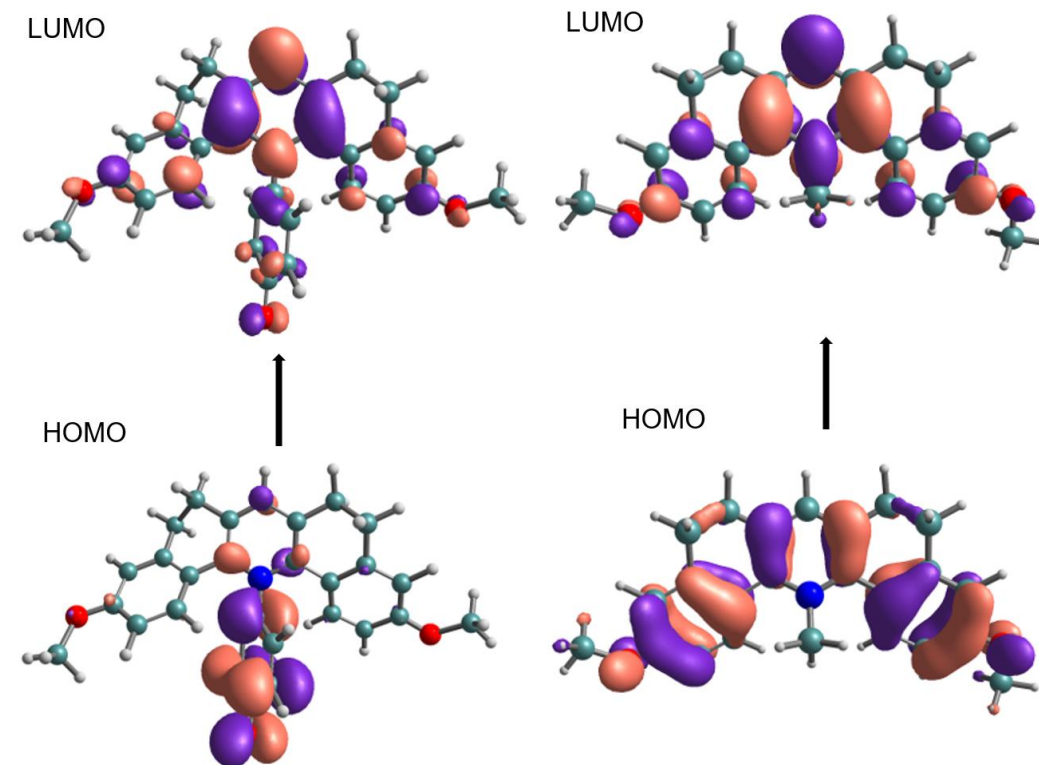


Figura 274. Orbitales moleculares frontera para **PirFen2** (izquierda) y **PirMe2** (derecha).

El análisis de orbitales moleculares nos muestra la diferencia en la distribución electrónica de los orbitales moleculares frontera entre la sonda **PirMe2** y **PirFen2**, en la molécula **PirMe2** la densidad electrónica del orbital HOMO se encuentra distribuida sobre el sistema π del IndiFluor.

Para el caso de la sonda **PirFen2**, al portar un grupo fuertemente donador, la densidad electrónica del orbital HOMO se ubica sobre el anillo de fenolato, por tal motivo existe un cambio en las longitudes de absorción, ya que en **PirMe2** la nube electrónica puede deslocalizarse sobre un sistema más conjugado por lo cual absorbe en longitudes de onda más largas, en el caso de **PirFen2** la nube electrónica se ubica sobre un sistema más pequeño y absorberá en una longitud de onda corta, (**Figura 27**).

Se propuso que la sonda **PirFen2** podría cuantificar diferentes ambientes polares en células vivas, debido a las características hidrofóbicas de la membrana celular, esta es impermeable a la mayor parte de las moléculas hidrosolubles, como la glucosa, los aminoácidos y los iones en general, lo cual presentaba un problema por la naturaleza zwitteriónica de esta molécula, la sonda se incubó en células de glioblastoma humano para comprobar si era permeable a la membrana celular y se observó utilizando microscopia confocal.

Al observar el espectro en disolución de la sonda **PirFen2** se optó por una fuente de excitación de onda corta, es decir, en el canal de DAPI ($I_{ex} = 420 \text{ nm}$, $I_{em} = 455 \text{ nm}$).

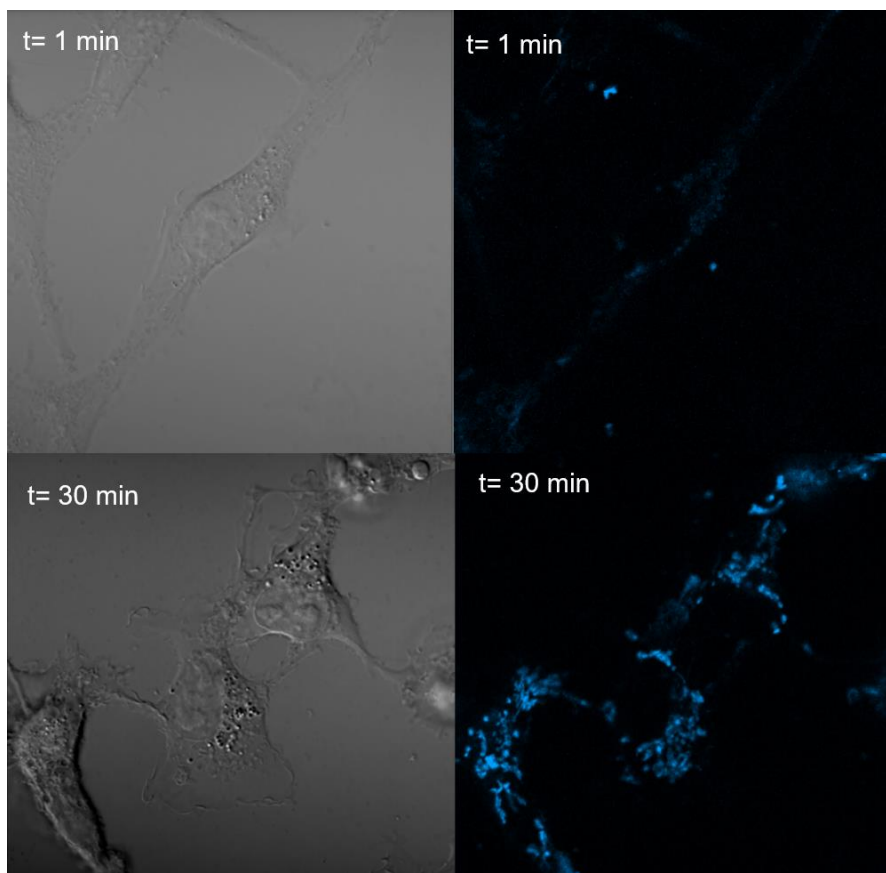


Figura 28. Imágenes de Microscopia confocal de células de glioblastoma humano (línea celular U-251) incubadas con $6\mu\text{L}$ de un estándar de la sonda **PirFen2** al minuto 1 y 30, del lado izquierdo en campo claro, derecha canal azul (DAPI, $I_{ex} = 420 \text{ nm}$, ($I_{em} = 455 \text{ nm}$)).

Al realizar la observación de las células en el microscopio confocal, un minuto después de la incubación con la sonda no se observó en ningún campo alguna señal perteneciente a la sonda, a pesar de haber empleado distintas fuentes de excitación de diferentes longitudes de onda, sin embargo, se dejó incubar hasta un tiempo total de 30 minutos y nuevamente se colocó la muestra para su visualización.

La sonda **PirFen2** si fue capaz de atravesar la membrana celular, no obstante, requería de un mayor tiempo de incubación para cruzarla. Se requieren más estudios para determinar si la sonda puede diferenciar entre diferentes ambientes de polaridad en la célula y/o determinar si es viable para cuantificar viscosidad.

Conclusiones y perspectivas

Se sintetizaron diversos precursores catiónicos y un precursor aniónico, sin embargo, no se concluyó con la sonda originalmente propuesta. Se llevó a cabo el diseño de una sonda fluorescente con interesantes de dependencia del medio local, hasta cierto punto, no se esperaban y su estudio resultó de alto interés para el grupo de investigación. En el transcurso de la síntesis se descubrió que los precursores catiónicos presentaban propiedades espectroscópicas relevantes en el campo de sensores para viscosidad, debido a su respuesta y alta selectividad ya que puede distinguir entre cambios de viscosidad del medio.

Las geometrías optimizadas demostraron los cambios estructurales en las moléculas basadas en piridinio que ocurren al intercalar entre el anillo del fenolato y un sustituyente alquilo.

La microscopia confocal demostró que la sonda **PirFen2** es capaz de permear a la célula, aunque requiere un tiempo de incubación mayor debido a su naturaleza zwitteriónica y podría tener aplicaciones para medir cambios de viscosidad en células vivas para estudios de bioimagen.

Se requieren más ensayos para conocer con mayor profundidad las propiedades y estabilidad de las sondas **PirFen#**, así como su utilidad en bioimagen, no obstante, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran su potencial utilidad, así mismo es posible que estas sondas tengan aplicaciones en óptica no línea debido a su esqueleto con estructura tipo cuadrupolar.

Se propone la síntesis de un derivado de piridinio basado en POMP, cuyas moléculas poseen un efecto de solvatochromismo negativo en la emisión debido a la interacción dipolo-dipolo inducido entre la sonda y la moléculas de disolvente.²² Tal molécula podría ser utilizada para medir la polaridad de diferentes ambientes subcelulares con alta sensibilidad, (**Figura 29**).

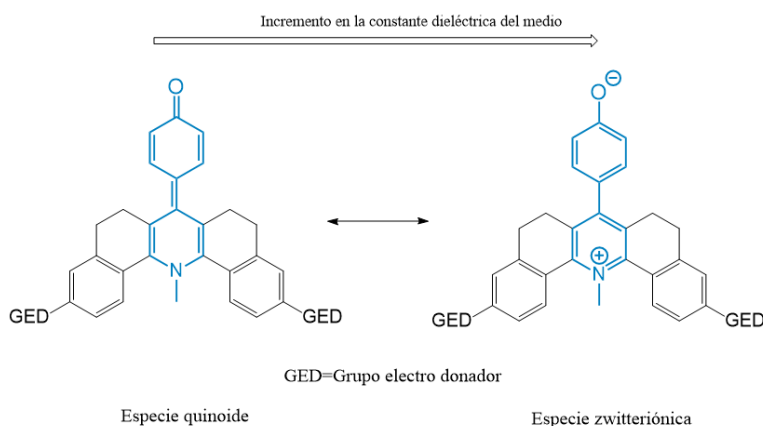


Figura 29. Estructuras de resonancia límites de la sonda propuesta tipo POMP

²² Meng, S., Caprasecca, S., Guido, C. A., Jurinovich, S. & Mennucci, B. Negative solvatochromism of push-pull biphenyl compounds: a theoretical study. *Theor Chem Acc* **134**, 150 (2015).

Parte experimental

Los reactivos y disolventes fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. En los casos que se especifique, los disolventes fueron utilizados recién destilados, sobre un secante adecuado y atmosfera de Argón. El CH₂Cl₂ y el MeOH, se secaron empleando CaH₂ como agente secante. La DMF se secó utilizando BaO. Se empleo etanol anhidro.

El progreso de las reacciones se controló mediante cromatografía en capa fina, utilizando cromatofolios de gel de sílice 60 F254, el revelado de los mismos se realizó bajo luz ultravioleta de longitud de 354 nm.

La espectroscopía de RMN de ¹H y ¹³C se realizó en un equipo Bruker Avance III 400 MHz, utilizando DMSO como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm). Las constantes de acoplamiento (*J*) se informan en Hertz (Hz). La multiplicidad para los espectros de ¹H se indica de la siguiente manera, en señales: s = simple, d = doble, t = triple, dd= doble de dobles, td= triple de dobles, m = múltiple, bs = señal ancha.

Síntesis

Síntesis de 1-cloro-3,4-dihidronaftaleno-2-carbaldehido: Se colocan 5 mL de *N,N*-dimetilformamida en un matraz de fondo plano sobre baño de hielo, y se añade gota a gota 1.95 mL (21.3 mmol) de POCl₃ bajo agitación, una vez finalizada la adición, la mezcla se coloca a temperatura ambiente por 30 min, al término de este tiempo se adiciona gota a gota 2.3 mL (17.12 mmol) de 1-tetralona y se coloca la reacción a 55°C durante 3 horas. Finalizado el tiempo, la reacción se retira del calentamiento y una vez que ha alcanzado la temperatura ambiente, la mezcla se vierte sobre un matraz con hielo y el precipitado obtenido es filtrado a vacío. (80% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 10.28 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.46 (td, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H), 7.41 (td, *J* = 7.1, 1.6 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H) 2.83 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.53 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H)

Síntesis de 1-cloro-6-metoxi-3,4-dihidronaftaleno-2-carbaldehido: Se colocan 2 mL de *N,N*-dimetilformamida en un matraz de fondo plano sobre baño de hielo, y se añade gota a gota 0.4 mL (4.3 mmol) de POCl₃ bajo agitación, una vez finalizada la adición, la mezcla se coloca a temperatura ambiente por 30 min, posteriormente se añade una mezcla de 627 mg (3.55 mmol) de 6-metoxi-1-tetralona disueltos en 3 mL de DMF, se coloca la reacción a 55°C durante 3 horas. Finalizado el tiempo, la reacción se retira del calentamiento y una vez que ha alcanzado la temperatura ambiente, la mezcla se vierte sobre un matraz con hielo y el precipitado obtenido es filtrado a vacío. (70% de rendimiento): ¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 10.23 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 5 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 2.82 (dd, *J* = 6.9 Hz, 2H); 2.53 (t, 2H).

Síntesis de perclorato-5,6,8,9-tetrahidrodibenzo[c,h]xanten-14-io: Se colocan 500 mg (2.6 mmol) del Precursor 1 y 0.346 mL (2.6 mmol) de 1-tetralona en un matraz bola de 2 bocas de 50 mL y se disuelven en 15 mL de tolueno, la reacción se coloca a reflujo por 15 minutos. Posterior al tiempo indicado se adicionan 0.38 mL (2.6 mmol) de una solución de ácido perclórico al 70% y se dejó la reacción durante una hora más. Una vez finalizado, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adiciono éter frío para precipitar el compuesto, el precipitado se filtró a vacío y se obtuvo un sólido rojo. (75% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- δ_6): δ 8.84 (s, 1H), 8.4 (dd, $J = 7.8, 0.8$ Hz, 2H), 7.75 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 2H), 7.63 (dd, $J = 11.0, 4.3$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.23 – 3.12 (m, 8H).

Síntesis de perclorato-3-metoxi-5,6,8,9-tetrahidrodibenzo[c,h]xanten-14-io: Se colocan 500 mg (2.6 mmol) de Precursor 1 y 463 mg (2.6 mmol) de 6-metoxi-1-tetralona en un matraz bola de 2 bocas de 50 mL y se disuelven en 15 mL de tolueno, la reacción se coloca a reflujo por 15 minutos. Posterior al tiempo indicado se adicionan 0.38 mL (2.6 mmol) de una solución de ácido perclórico al 70% y se dejó la reacción durante una hora más. Una vez finalizado, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adiciono éter frío para precipitar el compuesto, el precipitado se filtró a vacío y se obtuvo un sólido amarillo. (68 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- δ_6): 8.69 (s, 1H), 8.37 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.32 (d, $J = 8$, Hz, 1H), 7.69 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.59 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 9$ Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.2-3.09 (m, 8H)

Síntesis de perclorato-3,11-dimetoxi-5,6,8,9-tetrahidrodibenzo[c,h]xanten-14-io: Se colocan 580 mg (2.6 mmol) de Precursor 1 y 463 mg (2.6 mmol) de 6-metoxi-1-tetralona en un matraz bola de 2 bocas de 50 mL y se disuelven en 15 mL de tolueno, la reacción se coloca a reflujo por 15 minutos. Posterior al tiempo indicado se adicionan 0.38 mL (2.6 mmol) de una solución de ácido perclórico al 70% y se dejó la reacción durante una hora más. Una vez finalizado, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adiciono éter frío para precipitar el compuesto, el precipitado se filtró a vacío y se obtuvo un sólido anaranjado oscuro. (68 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO- δ_6): 8.85 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 10$ Hz, 2H), 7.04 (dd, $J = 5$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J = 2$ Hz, 2H), 3.95 (s, 6H), 3.29-3.26 (m, 4H), 3.14-3.10 (m, 4H)

Síntesis de Fenolato-4-(5,6,8,9-tetrahidrodibenzo[c,h]-14-acridinio): Se colocaron 196 mg (0.5 mmol) de Pirilio0, 66mg (0.6 mmol) de 4-aminofenol y 550 mg (5.6 mmol) de acetato de potasio anhidro en 6 mL de metanol anhidro en un matraz de fondo plano a reflujo durante 1 hora, después del término de la reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se retiró el disolvente de la reacción por destilación a presión reducida, el sólido seco se disolvió en una disolución de hidróxido de Sodio al 5% y se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y el disolvente se evaporó por destilación a presión reducida. El sólido obtenido se disolvió en la menor cantidad posible de acetona y se adiciono hexano para precipitarlo. El precipitado se filtró a vacío. Se obtuvo un sólido amarillo. (70% rendimiento). ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): 8.57 (s, 1H), 7.44 (dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 2H), 7.31 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 2H), 7.17 – 7.10 (m, 2H), 7.03 – 6.95 (m, 2H), 6.68 – 6.63 (m, 2H), 6.61 – 6.55 (m, 2H), 2.99 (d, $J = 9.4$

Hz, 8H). ^{13}C NMR (76 MHz, DMSO- d_6) δ 160.05, 148.54, 143.23, 143.04, 139.97, 132.32, 131.13, 130.85, 129.57, 128.84, 127.40, 126.59, 117.03, 28.73, 27.85.

Síntesis de Fenolato-4-(3-metoxi-5,6,8,9-tetrahidrodibenzo[*c,h*]-14-acridinio): Se colocaron 208 mg (0.5 mmol) de Pirilio1, 66 mg (0.6 mmol) de 4-aminofenol y 550 mg (5.6 mmol) de acetato de potasio anhidro en 6 mL de metanol anhidro en un matraz de fondo plano a reflujo durante 1 hora, al término de la reacción, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se retiró el disolvente de la reacción por destilación a presión reducida, el sólido seco se disolvió en una disolución de hidróxido de Sodio al 5% y se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y el disolvente se evaporó por destilación a presión reducida. El sólido obtenido se disolvió en la menor cantidad posible de acetona y se adicionó hexano para precipitarlo. El precipitado se filtró a vacío. (75% de rendimiento). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.47 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.32 – 7.11 (m, 2H), 7.01 (d, $J = 4.7$ Hz, 3H), 6.63 – 6.54 (m, 5H), 3.05 – 2.87 (m, 8H).

Síntesis de Fenolato-4-(3,11-dimetoxi-5,6,8,9-tetrahidrodibenzo[*c,h*]-14-acridinio): Se colocaron 112 mg (0.25 mmol) de Pirilio2, 33 mg (0.3 mmol) de 4-aminofenol y 550 mg (5.6 mmol) de acetato de potasio anhidro en 5 mL de etanol anhidro en un matraz de fondo plano a reflujo durante 1 hora, al término de la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se retiró el disolvente de la reacción por destilación a presión reducida, el sólido seco se disolvió en una disolución de hidróxido de sodio al 5% y se extrajo con diclorometano, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y el disolvente se evaporó por destilación a presión reducida. El sólido obtenido se disolvió en la menor cantidad posible de acetona y se adicionó hexano para precipitarlo. El precipitado se filtró a vacío. (71.8% de rendimiento). HRMS (ESI, $[\text{M} + \text{H}]^+$) m/z : calculada para $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{NO}_3$, 436.19; encontrada, 436.1926. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.31 (s, 1H), 6.98 (d, $J = 2.7$ Hz, 2H), 6.74 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.69 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.59 (dd, $J = 9.1, 2.8$ Hz, 2H), 6.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.77 (s, 6H), 2.92 (q, $J = 6.9$ Hz, 8H).

Síntesis de perclorato 14-metil-5,6,8,9-tetrahidrodibenzo[*c,h*]-14-acridinio: Se colocan 87 mg (0.225 mmol) de Pirilio0 disueltos en 2 mL de diclorometano en un matraz de fondo plano de 25 mL y se adiciona 0.5 mL de metilamina 0.2 M disuelta en metanol (1 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de reacción, se adicionan 10 mL de dietiléter frío, el precipitado se filtra a vacío y es lavado 3 veces con dietiléter. (70 % de rendimiento) ^1H NMR (400 MHz, DMSO- δ_6): 8.49 (s, 1H), 8.41(d, $J = 8\text{Hz}$, 2H), 7.62-7.55 (m, 6H), 4.44 (s, 3H), 2.95 (tt, $J=5.7\text{Hz}$ 8H).

Síntesis de perclorato-14-metil-3-metoxi-5,6,8,9-tetrahidrodibenzo[*c,h*]-14-acridinio: Se colocan 94 mg (0.225 mmol) de Pirilio1 disueltos en 3 mL de diclorometano en un matraz de fondo plano de 25 mL y se adiciona 0.5 mL de metilamina 2 M disuelta en metanol (1 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de reacción, se adicionan 10 mL de dietiléter frío, el precipitado se filtra a vacío y es lavado 3 veces con dietiléter.

(76% de rendimiento). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- δ 6): 8.41 (s, 1H), 8.35 (d, 2H), 7.57 (dd, J = 7, Hz, 3H), 7.16 (d, J= 2.7 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 6.2Hz, 1H), 4.4 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 2.93 (s, 8H)

Síntesis de perclorato-14-metil-3,11-dimetoxi-5,6,8,9-tetrahidrodibenzo[*c,h*]-14-acridinio: Se colocan 100 mg (0.225 mmol) de Pirilio2 disueltos en 3 mL de diclorometano en un matraz de fondo plano de 25 mL y se adiciona 0.5 mL de metilamina 2 M (1 mmol) disuelta en metanol. La mezcla se agita a temperatura ambiente por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de reacción, se adicionan 10 mL de dietiléter frío, el precipitado se filtra a vacío y es lavado 3 veces con dietiléter. (74 % de rendimiento) ^1H NMR (400 MHz, DMSO- δ 6): 8.34 (s, 2H), 8.32 (s, 1H), 7.14 (d, J=2.7Hz, 1H), 7.08 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 4.36 (s, 3H), 3.92 (s, 6H), 2.91 (s, 8H)

Síntesis de 4-sulfo-*N*-(2-hidroxiethyl)-1,8-naftalimida

Se pesan 703 mg (2mmol) de anhídrido-4-sulfonaftalico de potasio, se trituran en mortero, se pasan a un matraz de fondo plano y se disuelven en 10 mL de DMF seco, posteriormente se adicionan 106 μL (2.6 mmol) de 2-aminoetanol, la reacción se calienta a 100°C por 8 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, se deja enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se coloca el baño de hielo, el precipitado se filtra a vacío. (430.1 mg, 61% rendimiento). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- δ 6): 9.25 (dd, = 8.6, 1.2 Hz, 1H), 8.52-8.44 (m, 2H), 8.21 (d, J=7.6 Hz, 1H), 7.88 (dd, J= 8.6, 7.3 Hz, 1H), 4.84 (t, J= 6.0 Hz, 1H), 4.15 (t, J= 6.5 Hz, 2H), 3.63 (q, J=6.3 Hz, 2H)

Mediciones ópticas:

Los disolventes utilizados para las mediciones ópticas son grado reactivo

Preparación de estándar de PY_N_5: Se pesaron 3 mg del sólido PY_N_5 seco en una balanza analítica y se disolvieron en 2 mL de DMSO obteniéndose una concentración del estándar de 3.43×10^{-3} Molar.

Análisis solvatocrómico:

Para el análisis solvatocrómico de absorbancia y fluorescencia se colocaron 50 microlitros del estándar y se diluyeron a 3 mililitros con cada uno de los disolventes empleados en una cubeta de cuarzo. Obteniendo una concentración del estándar de 5.7×10^{-5} molar.

Los espectros de emisión de fluorescencia se eligió la longitud de onda de excitación utilizando la longitud de onda donde se encuentra el máximo de absorción y se recabaron los datos 10 nanómetros después de la longitud de onda de excitación correspondiente.

Valoración ácido-base: Se estandarizo una solución de hidróxido de sodio empleando Ftalato ácido de potasio como estándar primario. Se pesaron 0.884 g de NaOH al 97% y se disolvieron en 10 mL de agua destilada colocado en baño de hielo (solución A). La solución A se llevó a un aforo de 100 mL empleando agua destilada (solución B), la solución B se utilizó para llenar la bureta empleada en la valoración. Se pesaron 3 fracciones de Ftalato ácido de potasio (previamente colocado en un desecador por una noche) en una balanza analítica obteniéndose 0.1521 g,

0.1511 g y 0.1505 g respectivamente, cada una de las fracciones se colocó en un matraz Erlenmeyer y se disolvieron en 10 mL de agua destilada y se añadieron 3 gotas de una solución de fenolftaleína para visualizar el punto de vire. Se obtuvieron 3.45, 3.4 y 3.4 mL como el volumen al punto de vire respectivamente. De lo cual se determinó que la concentración de la solución de NaOH es de 0.2165 M.

Se colocaron 10 microlitros de ácido clorhídrico concentrado (36%) y se aforaron en 10 mililitros de agua (solución ácida).

Se colocaron 0.1 mililitros del estándar de la sonda PY_N_5 con 7.4 mL de la solución ácida en un vaso de precipitado con barra de agitación sobre una parrilla y se adicionaron volúmenes del NaOH estandarizado. Se determinó el pH a cada una de las adiciones, se grabaron los espectros de absorción y emisión en cada punto.

Estudio del efecto de hidratación del medio: Se colocaron 30 uL del estándar de concentración 3.43×10^{-3} molar y se llevaron a un volumen de 2.5 mL con el respectivo disolvente, se prepararon varios sistemas con diferentes proporciones de metanol/Dioxano. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron utilizando una longitud de onda de excitación de 410 nm.

Estudio de la viscosidad del medio: Se colocaron 30 uL del estándar de concentración 3.43×10^{-3} Molar y se llevaron a un volumen de 2.5 mL con el respectivo disolvente, se prepararon 8 sistemas con diferentes proporciones de metanol y glicerol (100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 45/55, 30/70, 15/85, 0/100). Los espectros de fluorescencia se obtuvieron utilizando una longitud de onda de excitación de 410 nm.

Cálculos computacionales

Todos los cálculos se llevaron a cabo en la supercomputadora Miztli (DGTIC UNAM mediante el programa Gaussian 16. Para todos los cálculos se utilizaron 16 núcleos, y 64 GB de memoria RAM

Se empleó el funcional *B3LYP* con la base *6-31G+(d,p)* para la optimización de la geometría, análisis de frecuencias y NBO's, además se emplearon las siguientes keywords para el cálculo de NBO: pop=(full,nboread,savenbo) gfoldprint.