



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Síntesis de Derivados de Rodol como Interruptores  
Moleculares en la Detección de Especies Reactivas  
de Oxígeno**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**QUÍMICO**

Presenta:

**GUSTAVO ALFONSO CARMONA SANTIAGO**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL  
(Titulación o Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado **Síntesis de derivado de rodol como interruptores moleculares en la detección de especies reactivas de oxígeno** que presenté para obtener el título/grado de **Químico**, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por la Facultad de Química, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

**Atentamente**

**Gustavo Alfonso Carmona Santiago**  
312236667

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Profesor: JACINTO EDUARDO MENDOZA PEREZ**

**VOCAL: Profesor: JOSE OSCAR HUMBERTO PEREZ DIAZ**

**SECRETARIO: Profesor: ARTURO JIMENEZ SANCHEZ**

**1er. SUPLENTE: Profesor: MIRZAM ANDREA CARREON GONZALEZ**

**2° SUPLENTE: Profesor: LUIS ANGEL POLINDARA GARCIA**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 5-C,  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA, INSTITUTO DE  
QUÍMICA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA: DR. ARTURO JIMÉNEZ SÁNCHEZ**

**SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. IXSOYEN FELIPE VÁZQUEZ SANDOVAL**

**SUSTENTANTE: GUSTAVO ALFONSO CARMONA SANTIAGO**

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 5-C del instituto de Química a cargo del Dr. Arturo Jiménez Sánchez y bajo la supervisión del M. en C. Ixsoyen Felipe Vázquez Snadoval. Se realizó con apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM-IA200522)

Agradecemos la asistencia de la Dra. Ruth Rincón Heredia, (Unidad de Imagenología, IFC-UNAM) en microscopía de imágenes, M. en C. Teresa Ramírez Apán, y Dra. Adriana Romo Pérez, en cultivo de tejidos, y M. en C. Everardo Tapia Mendoza, junto con M. del Carmen García González y Javier Pérez Flores, para los estudios de HRMS. También agradecemos a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, Dra. Beatriz Quiróz García y Dra. Martha E. García-Aguilera, por su apoyo en el análisis de RMN en el LURMN, IQ-UNAM. La instalación de RMN está financiada por CONACYT México (0224747) y la UNAM.

## AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar, agradezco a **mis padres Anastasia Santiago y Fabian Carmona**, ya que gracias a su duro trabajo pude estudiar lo que yo quería, siempre estuvieron apoyando mis decisiones y creyendo en mí. Ellos son un ejemplo de esfuerzo, dedicación y confianza que seguiré durante toda mi vida. A mis **hermanos Edgar y Fátima**, así como a su familia - **Nohemí Chávez, Cristian y Leo**- que siempre estuvieron para mí “echándome la mano” en situaciones que lo ameritaban.

A **Carlos Chávez**, gracias por soportarme en mis momentos más difíciles, apoyarme y siempre creer en mis capacidades y en que lograría hacer todo lo que me proponga. Por los momentos buenos y malos que hemos pasado, que nos han hecho aprender, espero que sigamos creciendo juntos.

Gracias al **Dr. Arturo** por permitirme trabajar en su laboratorio y por seguir echándome la mano, aprendiendo junto con él y su equipo.

A **mis compañeros de laboratorio: Ixso**, por enseñarme muchas cosas y guiarme en el desarrollo y conclusión de este trabajo; **Santy**, gracias por todo lo que has hecho por mí, por la lap, por las charlas, consejos, por tu amistad y por los momentos divertidos que pasamos mientras fuiste nuestro postdoc; A **Dany, Eri, Fer, Emiliano y Juan Luis** por hacer muy ameno el trabajo en el laboratorio, así como por su amistad y su disposición para compartir ideas, discutir y colaborar en los temas que son importantes en nuestro campo. Gracias también a la dra. Carmen y todo su grupo por los momentos divertidos y las pláticas que compartimos.

Gracias a todos **mis amigos, los de CCH** que siempre me apoyan en todo momento, **los de la FES Z** que, aunque ya no nos vemos tan seguido, sé que puedo confiar en ustedes, a **los de la FQ** que compartimos muchas anécdotas y espero estar en sus vidas por mucho tiempo, como amigos y como colegas.

A mi gata **Carolina** que siempre me acompaña en esas largas noches de trabajo arduo.

Gracias a todos mis profesores de la FQ, aunque muchas veces sentía que ya no podía, al final sus enseñanzas me han llevado muy lejos y reconozco el enorme esfuerzo que hacen para que sus alumnos se lleven, aunque sea una pizca de todo lo grandes que ustedes son.

Sobre todo, quiero dar un inmenso agradecimiento a todas las personas que trabajan y que, gracias a sus impuestos, gente como yo puede estudiar en una de las mejores universidades de Latinoamérica y por las becas que me permitieron terminar la carrera, ya que sin ellas difícilmente lo habría logrado. Ojalá en algún momento de mi vida pueda devolver, aunque sea un poco, algo a la sociedad que me ha apoyado.

# Índice

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	5
INTRODUCCIÓN .....	7
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	9
1.1 PROCESOS DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN DE LUZ .....	9
1.1.1 PROCESOS FOTOFÍSICOS EN COMPUESTOS ORGÁNICOS.....	9
1.1.2 TRANSICIONES ELECTRÓNICAS .....	13
1.1.3 FLUORESCENCIA .....	16
1.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO <i>IN CELLULO</i> .....	19
1.3 FLUORÓFOROS BASADOS EN XANTENO .....	22
1.3.1 FLUORESCÉINAS Y RODAMINAS .....	24
1.3.2 RODOLES.....	26
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	29
2.1 HIPÓTESIS.....	29
2.2 OBJETIVOS GENERALES.....	29
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....	31
3.1 SÍNTESIS.....	31
3.1.1 REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN .....	31
3.1.2 SÍNTESIS DE LOS FLUORÓFOROS .....	31
3.2 ESPECTROFOTOMETRÍA .....	35
3.3 MICROSCOPIA DE IMAGEN .....	35
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
4.1 CARACTERIZACIÓN .....	36
4.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	49
4.2.1ANÁLISIS DE SOLVATOCROMISMO .....	49
4.2.2ANÁLISIS DE AGREGADOS .....	51
4.2.4 ANÁLISIS DE PH.....	52
4.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA. ....	55
CONCLUSIONES.....	56
BIBLIOGRAFÍA .....	58

# Abreviaturas y símbolos

a.u.	Unidades arbitrarias
ACN	Acetonitrilo
CCF	Cromatografía de capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
COSY	Espectroscopía correlacionada
<i>d</i>	doblete
DCM	Diclorometano
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
ESI	Ionización por electrospray
GFP	Green Fluorescent Protein
IC	Conversión interna
IR	Infrarrojo
ISC	Cruce intersistemas
LDs	Gotas lipídicas
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
MHz	Megahertz
min	Minutos
MMP	Potencial de membrana mitocondrial
MS	Espectrometría de masas
PBS	Buffer salino con fosfato
pH	-log[H <sup>+</sup> ]
pKa	Constante de acidez
ppm	Partes por millón
Py	Piridina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
<i>s</i>	singulete
<i>t</i>	Tiempo
THF	Tetrahidrofurano
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visible

$v/v$	Relación volumen-volumen
$\delta$	Desplazamiento químico
$\varepsilon$	Constante dieléctrica
$\eta$	Viscosidad dinámica
$\lambda_{exc}$	Longitud de onda de excitación
$\lambda_{em}$	Longitud de onda de emisión

# Introducción

Desde el comienzo de las civilizaciones, el ser humano ha intentado explicar la manera en que funciona el mundo en general y su organismo en particular. Con el desarrollo de tecnologías cada vez más avanzadas se ha logrado entender una parte del universo, desde el protozoo más simple hasta la galaxia más lejana que se puede observar. Durante los siglos XIX y XX se desarrollaron herramientas capaces de explicar una multitud de fenómenos, a la vez que se avanzaba en la comprensión del mundo, también generaban nuevas preguntas.

Aportaciones de científicos como William Perkin, quien fue pionero en la síntesis de colorantes sintéticos revolucionaron la industria química con la creación del primer tinte artificial, la mauveína. Por otra parte, Santiago Ramon y Cajal, junto con Camillo Golgi, realizaron los primeros estudios en células nerviosas usando diferentes técnicas de tinción, lo que permitió una nueva forma de visualizar la estructura y la fisiología de las células mediante el uso de distintos compuestos coloridos.

Todas y cada una de las disciplinas científicas están conectadas de alguna manera. Bajo este sentido es importante destacar que a finales del siglo XX se encontró la manera de controlar las propiedades de la luz: matemáticos, físicos e ingenieros lograron crear láseres con propiedades ópticas no lineales que, en manos adecuadas fueron usados para construir microscopios capaces de observar la fluorescencia de una sola molécula interactuando con el ambiente subcelular. Por su parte, químicos y bioquímicos aprovecharon las nuevas tecnologías para aislar, sintetizar y caracterizar nuevos compuestos capaces maximizar las capacidades de los láseres y microscopios recién nacidos. Gracias a todos estos trabajos hoy en día, la microscopía de fluorescencia es una de las herramientas más poderosas para entender no solo las funciones y estructuras celulares, si no para controlar de forma precisa la liberación de fármacos (terapias fotodinámicas), la dinámica y la comunicación intercelular (optogenética), así como medir parámetros fisicoquímicos

asociados a condiciones normales y patológicas (desarrollo de sondas fluorescentes).

En estas áreas, el trabajo de los químicos ha sido fundamental. Los bioquímicos han logrado aislar y caracterizar proteínas que hacen que algunos organismos presenten fluorescencia de forma natural. Los fisicoquímicos encuentran, hacen y prueban diferentes teorías que explican los fenómenos ópticos que presentan las moléculas. El trabajo de los químicos orgánicos e inorgánicos ha contribuido en gran manera a la generación de una infinidad de herramientas moleculares capaces no solo de estudiar a las células, si no explorar las posibilidades ópticas y de marcaje. El trabajo de los químicos en general va encaminado a encontrar la manera de controlar las propiedades útiles en microscopía, como los rangos de emisión y absorción, el rendimiento cuántico de fluorescencia, la localización subcelular, el coeficiente de absorción molar o los mecanismos de marcaje.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) constituyen una familia de moléculas generadas como subproductos naturales de la respiración en organismos aeróbicos. Aunque las ROS desempeñan funciones esenciales en procesos biológicos como la señalización celular, un desbalance en sus niveles puede desencadenar estrés oxidativo, lo que contribuye al desarrollo de diversas patologías graves, como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y trastornos cardiovasculares. La capacidad de cuantificar de manera precisa las ROS es, por lo tanto, de gran importancia en el ámbito biomédico y de investigación. Sin embargo, a pesar de los avances en tecnologías de imagen, las sondas fluorescentes actuales son limitadas en su capacidad para detectar ROS *in vivo* con sensibilidad y especificidad adecuadas.

Este trabajo tiene como objetivo diseñar y sintetizar una nueva sonda fluorescente basada en un núcleo de "rodol", optimizada para sensar ROS en entornos subcelulares. Esta sonda ofrecerá una herramienta innovadora para estudiar las ROS en tiempo real, facilitando la investigación de los mecanismos subyacentes al estrés oxidativo y su impacto en la salud.

# Capítulo 1. Antecedentes

## 1.1 Procesos de absorción y emisión de luz

### 1.1.1 Procesos fotofísicos en compuestos orgánicos

La espectroscopía estudia la interacción de la radiación electromagnética y la materia, centrándose en la absorción de energía por parte del sistema y en la medición de la respuesta a esta absorción. A bajas energías, es posible analizar los cambios en el espín nuclear; a energías ligeramente más elevadas, se pueden estudiar los estados vibratorios de una molécula. Se requiere una energía mayor, en el rango del ultravioleta-visible (UV-Vis), para investigar los cambios energéticos en los estados electrónicos. Generalmente, la radiación UV-Vis se identifica por su longitud de onda en nanómetros ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ). La región visible abarca longitudes de onda entre 400 y 800 nm, mientras que la luz ultravioleta abarca longitudes de onda entre 200 y 400 nm.

Existen diferentes modelos que describen las interacciones de la luz con las moléculas orgánicas de una forma cuantitativa. En sistemas conjugados del tipo  $R(\text{CH}=\text{CH})_nR'$ , se puede recurrir al modelo del electrón libre. Para sistemas aromáticos, se utiliza el modelo de orbitales de electrones libres perimetrales (PFEO, por sus siglas en inglés).

Para moléculas con sistemas de dobles enlaces conjugados se observa que las bandas de absorción cambian a longitudes de onda más largas a medida que aumenta el número de dobles enlaces conjugados. En el modelo del electrón libre cada átomo de C contribuye con un electrón al sistema  $\pi$ , estos electrones son libres de moverse a lo largo de todo el sistema. Se plantea entonces que el sistema es una región de potencial uniforme y que la energía aumenta hasta el infinito en los extremos del sistema. Por lo que los niveles de energía disponibles para los electrones ( $e$ ) pueden ser calculados con las ecuaciones que describen a la partícula en una caja unidimensional.<sup>1</sup>

$$E = \frac{n^2 h^2}{8m_e a^2} \quad \text{Ecuación 1}$$

La longitud de la cadena se define como la distancia entre los átomos de carbono terminales. Los electrones  $\pi$  se distribuyen en orbitales de manera que haya dos por nivel (con espines opuestos). En un hidrocarburo completamente conjugado, el número de electrones  $\pi$  es par y el número cuántico del nivel más alto lleno será  $n = N/2$ , donde  $N$  es el número total de electrones  $\pi$ . Durante el proceso de absorción, un electrón del nivel lleno más alto se excita al siguiente nivel con un número cuántico  $n' = N/2 + 1$ . La diferencia de energía entre estos dos niveles es:

$$\Delta E = \frac{h^2}{8m_e a^2} (n'^2 - n^2) = \frac{h^2}{8m_e a^2} \left[ \left( \frac{N}{2} + 1 \right)^2 - \left( \frac{N}{2} \right)^2 \right] = \frac{h^2}{8m_e a^2} (N + 1) \quad \text{Ecuación 2}$$

Y la frecuencia de absorción en número de onda está dada por:

$$\nu = \frac{\Delta E}{hc} = \frac{h(N+1)}{8cm_e a^2} \quad \text{Ecuación 3}$$

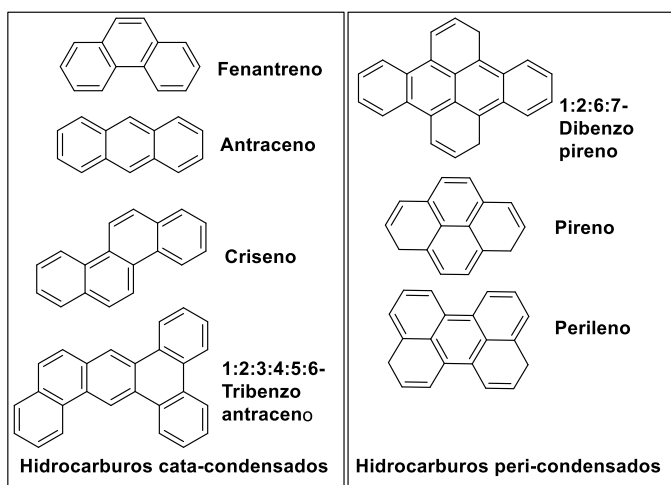


Figura 1. Clasificación de hidrocarburos aromáticos derivados de la condensación de anillos de benceno.

Los compuestos aromáticos o arenos pueden dividirse en dos grupos, según el número y la forma en que estén unidos los anillos de benceno (**Figura 1**): a) hidrocarburos *cata*-condensados, cuya fórmula general es  $C_{4n+2}H_{2n+4}$ , donde ningún átomo de carbono está unido a más de dos anillos; b) hidrocarburos *peri*-

condensados, donde algunos átomos de carbono están unidos hasta con tres anillos.<sup>2</sup>

En este modelo la clasificación de los orbitales en sistemas catacondensados es como la de los orbitales de electrones libres, pero viajando en un bucle unidimensional de potencial constante alrededor del perímetro. Para encontrar las energías y los orbitales perimetrales libres, primero se debe distorsionar el perímetro en un círculo de la misma longitud. Las energías se pueden calcular de la siguiente manera<sup>3,4</sup>:

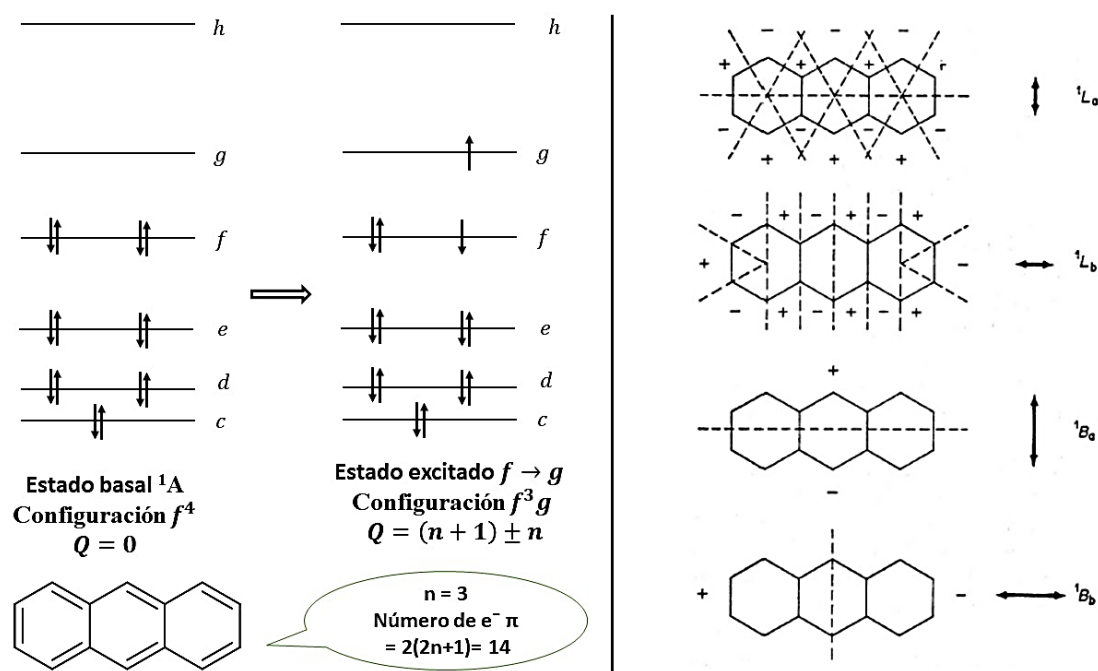
$$E = \frac{q^2 h^2}{2ml^2} = \frac{1.21 \times 10^6 q^2}{l^2} \quad \text{ecuación 4}$$

Donde  $q$  es un entero, 0, 1, 2...;  $h$  es la constante de Planck,  $m$  es la masa del electrón,  $l$  es la longitud del perímetro en angstroms y  $E$  es la energía. Los niveles están espaciados cuadráticamente. El número cuántico de anillo orbital,  $q$ , mide el momento angular, determina los nodos de la función de onda y las reglas de selección. En sistemas grandes, los vectores  $q$  pueden sumarse o restarse algebraicamente, ya que están restringidos a una dimensión, para dar un número cuántico de anillo orbital total,  $Q$ .

En estos sistemas de  $n$  anillos, cada átomo de carbono contribuye con un electrón  $\pi$ , por lo que habrá  $2(2n+1)$  electrones  $\pi$ . El nivel lleno más alto será  $q = n$  y a los 4 electrones en este nivel se les designará como electrones f, aquellos en la capa debajo de ellos se les asignará la letra e y así sucesivamente. El primer nivel vacío será el nivel g, con  $q = n+1$ , la siguiente será el nivel h, y así sucesivamente. En los estados de interés el número total de momentum,  $Q$ , puede tomar los valores, 0, 1, 2,..., que estarán designados por A, B, C... respectivamente. También podría tomar los valores  $2n$ ,  $2n+1$ ,  $2n+2$ ... entonces se designarán como K, L, M... respectivamente. La introducción del potencial periódico debido a los átomos de carbono elimina la degeneración, de modo que cada estado se divide en dos componentes representados por los subíndices a y b.

En el estado basal, el sistema tendrá una configuración  $f^4$ ,  $Q = 0$  y los espines electrónicos están apareados, se trata entonces de un estado singulete  $^1A$ . Cuando

un electrón es excitado del nivel  $f$  al nivel  $g$  ( $\Delta q = 1$ ) el estado excitado tiene la configuración  $f^3g$  y  $Q = (n+1) \pm n$  puede tomar los valores 1 o  $(2n+1)$ . El estado puede ser singulete o triplete dependiendo de si el electrón mantiene o no su valor de espín. Por lo tanto, hay 8 posibles estados excitados correspondientes a la configuración  $f^3g$ :  $^1B_a$ ,  $^1B_b$ ,  $^1L_a$ ,  $^1L_b$ ,  $^3B_a$ ,  $^3B_b$ ,  $^3L_a$ ,  $^3L_b$ . De la misma manera se puede determinar las diferentes configuraciones de estados excitados para diferentes valores de  $\Delta q$ . La **figura 2** muestra un ejemplo de la configuración de los estados basal y excitado del antraceno.



*Figura 2. Izquierda. Niveles electrónicos del antraceno en sus estados basal y excitado. Derecha. posición de los planos nodales y los signos de la función de onda en diferentes regiones para los estados B y L.*

El modelo funciona bien para determinar los nodos de la función de onda electrónica. Los sufijos a y b hacen referencia a las dos posiciones alternativas de los nodos con respecto a la molécula; a) donde los planos nodales cortan los enlaces C-C y b) donde los planos nodales pasan a través de los átomos de C (**figura 2**). En cuanto a la energía de los niveles, se puede demostrar que el modelo predice que la frecuencia de absorción promedio es casi inversamente proporcional a la longitud del perímetro. Para sistemas con un número determinado de anillos, el perímetro es constante, lo que implica que la ubicación de los niveles debería ser aproximadamente la misma en diferentes isómeros. Este modelo también permite

determinar la densidad de carga uniforme para sistemas condensados, de la cual depende la reactividad de los compuestos<sup>3,5</sup>.

### 1.1.2 Transiciones electrónicas

La absorción de la radiación UV-Vis es el resultado de la excitación de los electrones de un enlace, generalmente involucra la promoción de un electrón del nivel HOMO a los niveles LUMO o LUMO + 1. Por lo tanto, las longitudes de onda de las bandas de absorción se pueden relacionar con los tipos de enlace de la especie en estudio. Si se promueve un electrón a un orbital LUMO + 1, existirán procesos vibracionales de relajación que son muy rápidos (aprox.  $10^{-12}$  s) que llevarán al electrón excitado al nivel vibracional más bajo; desocupado de electrones (LUMO), una vez ahí es más probable que la molécula experimente una relajación radiativa (emisión de fotones) hasta llegar al estado basal <sup>6</sup>.

En los compuestos orgánicos los principales enlaces que existen son los enlaces  $\sigma$  y los enlaces  $\pi$ . Al estar formados por el traslape directo de dos orbitales atómicos s, los enlaces  $\sigma$  tienen una mayor energía; por otra parte, los enlaces  $\pi$  están formados por el traslape lateral de dos orbitales atómicos  $\pi$  y son de menor energía; finalmente, las moléculas orgánicas también contienen átomos con orbitales no enlazantes "n" que son todavía de menor energía que los enlaces  $\sigma$  o  $\pi$ . Con la energía adecuada se puede promover el electrón de un orbital enlazante  $\pi$  a un orbital antienlazante  $\pi^*$ , denotando esta transición como  $\pi \rightarrow \pi^*$ , también un electrón que se encuentra en un orbital n puede promoverse a un orbital antienlazante  $\pi^*$ , esta transición es denotada como  $n \rightarrow \pi^*$ . Las transiciones que involucran a los orbitales moleculares  $\sigma$  necesitan demasiada energía que su absorción queda restringida a longitudes de onda muy cortas (**Figura 3**). Por lo tanto, la energía de varias transiciones puede ordenarse de la siguiente manera:  $n \rightarrow \pi < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$  <sup>7,8</sup>.

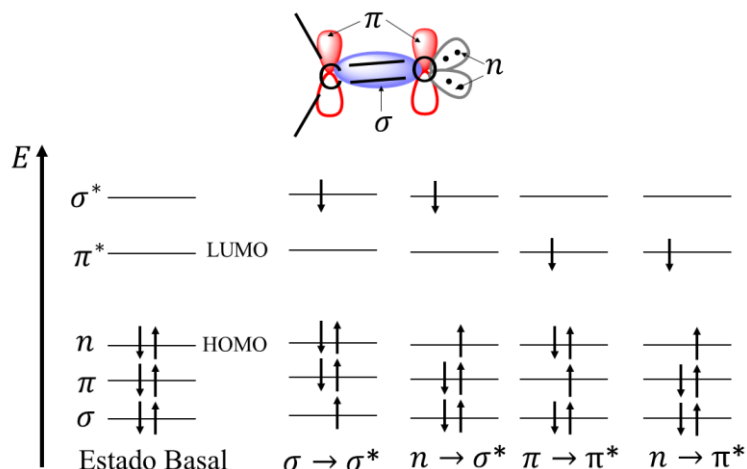


Figura 3. Orbitales moleculares del enlace carbonilo y las posibles transiciones electrónicas que puede experimentar.

Cuando uno de los electrones -que en el estado basal está apareado con otro de espín opuesto- es excitado su espín en principio no cambia por lo que su número cuántico de espín es 0. Como se mencionó anteriormente, la multiplicidad del estado basal y del estado excitado es 1 y se le conoce como estado *singlete*. Usualmente se le conoce como  $S_0$  al estado basal y  $S_1, S_2, \dots$  a los estados excitados. En el caso de que el electrón cambie su espín con respecto al que tenía en el estado basal, su número cuántico de espín será 1, tendrá una multiplicidad de 3, una menor energía y se le conoce como estado *tripleto*. En compuestos orgánicos también pueden existir especies con multiplicidad 2 “estado *dobleto*” y generalmente son los radicales libres los que exhiben este comportamiento. La siguiente tabla muestra un resumen de las configuraciones de espín más comunes<sup>9</sup>.

Orbitales	Nombre	$S = \sum s_i$	Multiplicidad $2s+1$
$\uparrow \downarrow$	Singleto	$+\frac{1}{2} + (-\frac{1}{2})$ $= 0$	1
$\uparrow$	Dobleto	$+\frac{1}{2}$	2
$\uparrow \uparrow$	Tripleto	$+\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$	3

Tabla 1. Multiplicidades de espín experimentadas por compuestos orgánicos.

Existen dos reglas de selección principales para las transiciones de absorción<sup>8</sup>:

1. Transiciones prohibidas por spín. Las transiciones entre estados de diferentes multiplicidades están prohibidas. Sin embargo, siempre existe una débil interacción entre las funciones de onda de diferentes multiplicidades vía acoplamiento espín-orbita, de hecho, el proceso conocido como cruces intersistemas es posible gracias a este acoplamiento.
2. Transiciones prohibidas por simetría. Se puede prohibir una transición por motivos de simetría, sin embargo, se pueden observar estas transiciones prohibidas porque las vibraciones moleculares provocan cierta desviación de la simetría perfecta.

Una medida de qué tan fuertemente absorbe luz una molécula es al coeficiente de absorción molar “ $\epsilon$ ”, cuyas unidades generalmente son  $M^{-1}cm^{-1}$ . Coeficientes de extinción molar altos ( $1000$  y  $15000 M^{-1}cm^{-1}$ ) están asociadas a transiciones permitidas, tales como transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  en compuestos conjugados. Por otra parte, las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  tienen asociados valores bajos de  $\epsilon$  (entre  $10$  a  $100 M^{-1}cm^{-1}$ )<sup>7</sup>.

Experimentalmente, se puede medir la absorbancia “ $A(\lambda)$ ” o la transmitancia “ $T(\lambda)$ ” de un compuesto dentro de una celda de “ $l$ ” cm de longitud. Estos valores están relacionados entre sí con el coeficiente de absorción molar mediante la *Ley de Beer* (Ecuación 5).

$$A(\lambda) = -\log T(\lambda) = \log \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}} = \epsilon(\lambda)lc \quad \text{ecuación 5}$$

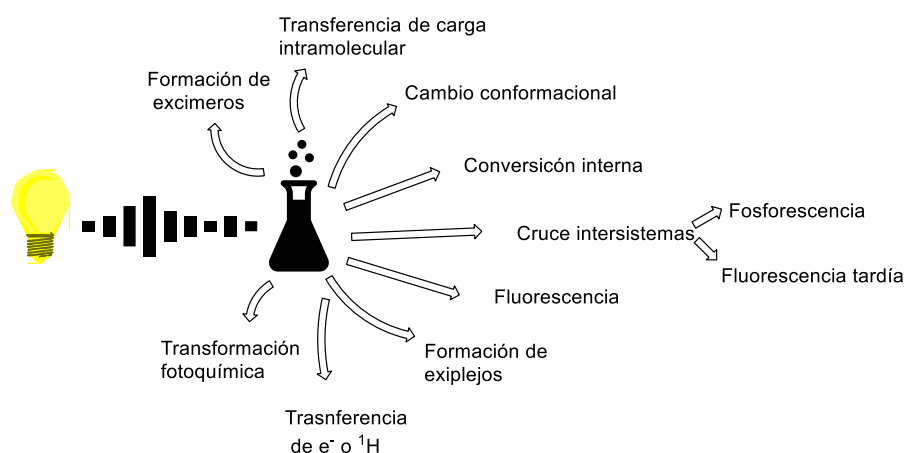
Donde  $I_{\lambda}^0$  e  $I_{\lambda}$  son las intensidades de la luz incidentes y transmitidas por la muestra, respectivamente a una longitud de onda dada.  $l$  es la longitud de la celda o longitud de paso óptico y  $c$  es la concentración de la muestra. La ley de Beer también se puede aplicar a un medio que contenga más de una especie absorbente, siempre y cuando no haya interacción entre las distintas especies la absorbancia total para un sistema multicomponentes es<sup>7</sup>

$$A(\lambda)_{total} = A(\lambda)_1 + A(\lambda)_2 + \dots + A(\lambda)_n = \varepsilon(\lambda)_1lc + \varepsilon(\lambda)_2lc + \dots + \varepsilon(\lambda)_nlc \quad \text{ecuación 6}$$

Los procesos de absorción son muy rápidos (alrededor de  $10^{-15}$ s) por lo que la geometría inicial del estado excitado es la misma que la geometría de la molécula en el estado basal, aunque la configuración electrónica sea diferente. De acuerdo con la aproximación de Born-Oppenheimer los movimientos electrónicos son varios ordenes de magnitud más rápidos que los movimientos moleculares de rotación o vibración, por lo que es más probable que una transición electrónica ocurra sin que existan cambios conformacionales importantes. Estas observaciones son la base del **Principio de Frank-Condon**, al resultado se le conoce como estado de Frank-Condon y se dice que es una transición vertical <sup>9</sup>.

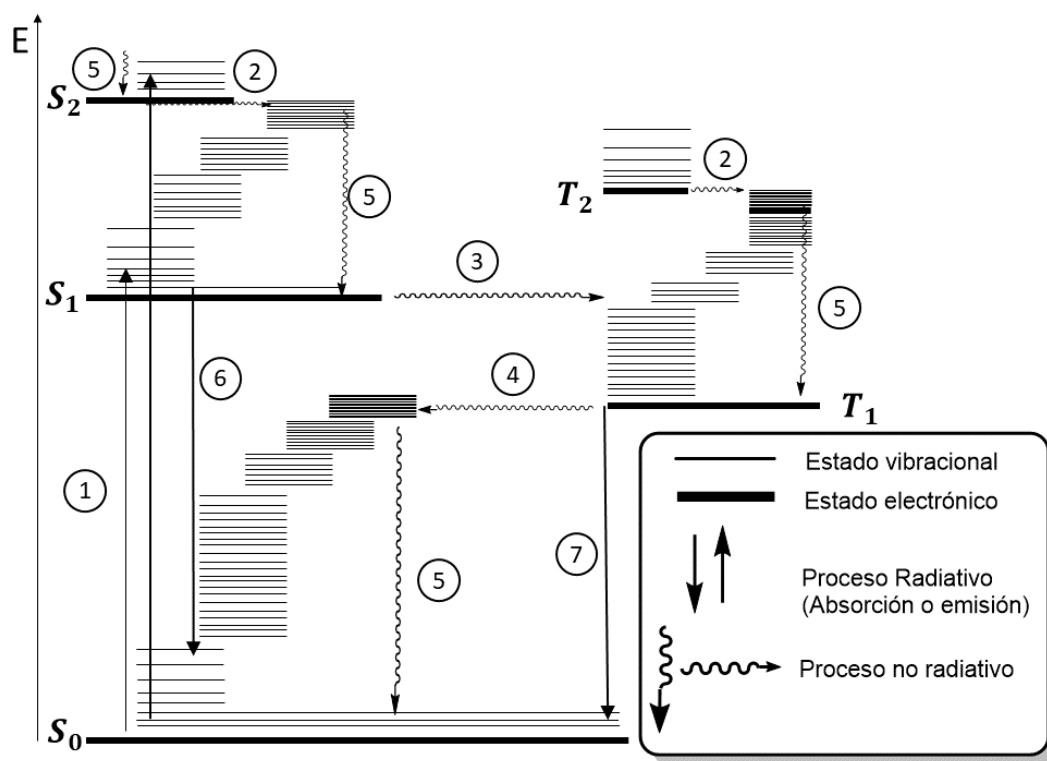
### 1.1.3 Fluorescencia

Una vez que la molécula es sometida a la radiación UV-Vis es excitada por la absorción de un fotón y puede llevar a cabo diferentes procesos, tanto fotoquímicos (reacciones fotoquímicas, fotocatalisis, etc.) como fotofísicos. Los procesos fotofísicos mostrados en la **figura 4** le permiten al sistema excitado regresar al estado basal -o de menor energía-. Estas vías de "desexcitación" pueden competir entre sí cuando tienen lugar en una escala de tiempo comparable con el tiempo promedio durante el cual las moléculas permanecen en el estado excitado.



*Figura 4. Procesos fotofísicos de relajación de moléculas excitadas.*

Una forma de representar los estados electrónicos de las moléculas y los procesos fotofísicos que experimentan al interactuar con la luz es mediante los diagramas de Perrin-Jablonski. En este tipo de diagramas los estados electrónicos son representados con líneas horizontales gruesas ordenadas verticalmente para indicar sus energías relativas. Los estados vibracionales de las moléculas se representan con líneas horizontales más delgadas. Los estados de una multiplicidad dada son separadas en columnas, los estados singulete usualmente se colocan del lado izquierdo, mientras que los estados triplete, de energías más bajas, son colocados del lado derecho. Los procesos fotofísicos pueden ser transiciones radiativas o no radiativa. Las transiciones radiativas hacen referencia a la absorción o emisión de radiación electromagnética y se representan con flechas continuas, las transiciones no radiativas hacen referencia principalmente a transiciones vibrónicas y se representan con flechas onduladas<sup>10</sup>.



**Figura 5.** Diagrama de Perrin-Jablonski que muestra los procesos fotofísicos y los estados electrónicos de las moléculas al interactuar con la radiación electromagnética en la región UV-Vis (Editado de Wirz, 2009)<sup>11</sup>.

En la **figura 5** se observa una forma general de diagrama de Perrin-Jablonski con los diferentes procesos fotofísicos etiquetados con un número de la siguiente manera: 1) *Absorción*; 2) *Conversión interna* (IC), es una transición no radiativa entre dos estados de la misma energía y la misma multiplicidad, se trata de un proceso en el que la energía de la molécula excitada se distribuye en los diferentes modos vibracionales; 3) y 4) *Cruce intersistemas* (ISC) es una transición no radiativa entre dos estados de diferente multiplicidad, este proceso en principio está prohibido pero el acoplamiento espín-orbita puede ser lo suficientemente fuerte como para permitirlo; 5) *Relajación vibracional*, engloba los procesos mediante los cuales la energía vibratoria de una molécula se transfiere al medio circundante, ocurre a través de colisiones con otras moléculas<sup>11</sup> .

El fenómeno de luminiscencia (del latín *lumen = luz*) ocurre cuando el electrón en un estado excitado salta a un estado de menor energía liberando un fotón de luz infrarroja, visible o ultravioleta. Este término se utiliza para describir los fenómenos que producen luz sin incrementar la temperatura. Existen diferentes tipos de luminiscencia, dependiendo del tipo de excitación y de los procesos que se lleven a cabo durante la emisión. Fluorescencia, fosforescencia y fluorescencia retardada son casos particulares de luminiscencia.

En la **figura 5** los números 6) y 7) representan los fenómenos de fluorescencia y fosforescencia, respectivamente. Se habla de fluorescencia cuando la radiación es emitida durante una transición entre estados electrónicos de la misma multiplicidad de espín, el término fosforescencia hace referencia al proceso mediante el cual la radiación se emite entre estados electrónicos de diferentes multiplicidades. Como las transiciones con cambio de espín están prohibidas, la velocidad del proceso de fosforescencia es muy baja y por lo tanto los tiempos de vida de fosforescencia son largos ( $10^{-4}$  hasta 100 s), mientras que los tiempos de vida de los estados singuletes se encuentran usualmente entre  $10^{-6}$  y  $10^{-9}$  s.

Todos los procesos antes citados compiten entre sí, por lo que se puede definir un rendimiento cuántico de fluorescencia  $\varphi_F$  que es la fracción de moléculas excitadas que regresan al estado de menor energía con emisión de fluorescencia (**Ecuación 7**).

$$\varphi_F = \frac{k_r^s}{k_r^s + k_{nr}^s} = k_r^s \tau_s \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:  $k_r^s$  es la constante de velocidad para la desactivación radiativa  $S_1 \rightarrow S_0$  con emisión de fluorescencia;  $k_{nr}^s$  es la constante de velocidad de los procesos no radiativos tales como el cruce intersistema o la conversión interna y  $\tau_s$  se refiere al tiempo de vida media del estado excitado  $S_1$  <sup>4,8</sup>.

Dado que las propiedades de la fluorescencia se ven afectadas tanto por la estructura molecular como por el entorno, la espectroscopía de luminiscencia en general y la espectroscopía de fluorescencia en particular han sido muy explotadas con el fin de desarrollar métodos analíticos con alta sensibilidad, técnicas de microscopía basadas en estos principios, así como marcadores y sondas fluorescentes que permiten estudiar diversos sistemas en múltiples contextos<sup>12-14</sup>. Desde la síntesis de moléculas fluorescentes hasta el descubrimiento de proteínas fluorescentes, algunas de las razones por las que estas técnicas han ganado popularidad son: mayor sensibilidad, mejor resolución espacial, alta velocidad de respuesta y amplia versatilidad<sup>15</sup>.

## 1.2 Especies reactivas de oxígeno *in cellulo*

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son formas parcialmente reducida o excitadas de oxígeno atmosférico (ROS por sus siglas en inglés) son una familia de moléculas que se generan, transforman y consumen continuamente en todos los organismos aeróbicos. ROS abarca una familia de moléculas y no una entidad química discreta, la identidad molecular de cada ROS es de suma importancia para determinar tanto su reactividad química como su respuesta biológica. Las principales ROS en los seres vivos son el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso (HClO), ozono ( $O_3$ ), oxígeno singulete ( $^1O_2$ ) y

radical hidroxilo (HÓ). La **tabla 2** muestra algunas propiedades importantes de las diferentes ROS<sup>16</sup>.

ROS	T <sub>1/2</sub>	Modo de acción	Sistema de eliminación
Superóxido [O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	1-4 μs	Reacciona con proteínas con Fe-S Dismuta con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	SOD, Flavonoides y Ascorbato.
Radical hidroxilo [HO] <sup>·</sup>	1 ns	Extremadamente reactivo con todas las biomoléculas incluidas DNA, RNA, lípidos y proteínas.	Flavonoides, prolina, azucares, ascorbato.
Peróxido de hidrógeno H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	>1ms	Reacciona con residuos de cisteína y metionina de diferentes proteínas. Reacciona con DNA.	APX, CAT, GPX, PER, PRX. Ascorbato, glutation.
Oxígeno Singulete <sup>1</sup> O <sub>2</sub>	1-4μs	Oxida lípidos, proteínas y residuos G de DNA.	Carotenoides y α-tocoferol

*Tabla 2. Propiedades de las diferentes ROS. Abreviaturas: APX, Ascorbato peroxidasa; CAT, Catalasa; GPX, Glutation peroxidasa; PER, peroxidasa; PRX, peroxiredoxina; SOD, superóxido dismutasa (Tabla editada de <sup>16</sup>).*

Las ROS aparecieron en la tierra junto con las primeras moléculas de oxígeno atmosférico hace aproximadamente 2,400 a 3,800 millones de años. En la **figura 6** se muestra la formación de diferentes ROS a partir de oxígeno molecular atmosférico, se puede observar que en presencia de Fe<sup>2+</sup>, ocurre la dismutación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (o de [O<sub>2</sub>]<sup>-</sup>) para formar el radical hidroxilo HO<sup>·</sup> altamente reactivo, a esta reacción se le conoce como *reacción de Fenton*. Gracias a las condiciones altamente reductoras y los altos niveles de hierro solubilizado en los océanos, es muy probable que el oxígeno molecular, nitrógeno, sulfuros y demás gases de la atmosfera primitiva se transformaran inmediatamente en diferentes especies reactivas<sup>17</sup>. La evolución de las especies se llevó a cabo mediante la adaptación a estas condiciones, lo que explica que en los organismos aeróbicos las ROS tengan funciones específicas en procesos como la respiración o la señalización celular.



En condiciones normales, ROS se localizan en organelos que incluyen fagosomas dentro de células especializadas del sistema inmunitario y peroxisomas que median diferentes reacciones dentro del metabolismo. También pueden localizarse diferentes tipos de ROS en mitocondria, donde ocurre la cadena transportadora de electrones del NADH y el succinato a través de una ruta redox muy controlada, culminando en la reducción de O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O durante la respiración y síntesis de ATP. Por lo que la generación de ROS es una inevitable consecuencia de la respiración de organismos aeróbicos. En el retículo endoplasmático la mayor producción de ROS ocurre durante un proceso que se conoce como plegamiento oxidativo. Otra fuente de ROS son diferentes tipos de membranas celulares que cuentan con las proteínas NADPH Oxidasas (Nox)<sup>18</sup>.

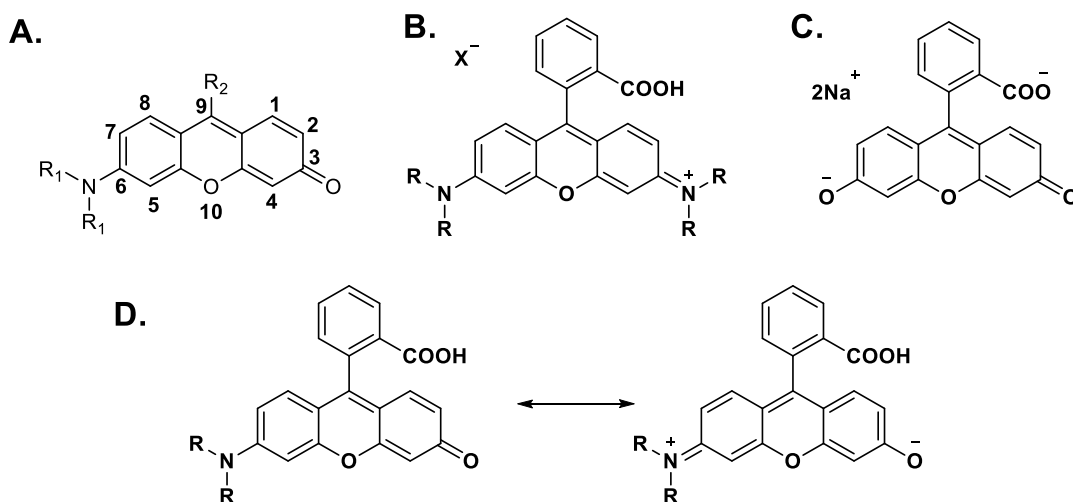
Dada la importancia de la homeostasis REDOX en las reacciones metabólicas y en la fisiología, el desajuste de las cantidades de ROS en la célula está relacionado con el desarrollo y mantenimiento de diferentes patologías. En la diabetes tipo 2 por ejemplo, los altos niveles de ROS están asociados a anomalías como la hiperglucemia, incremento en la glicosilación, inflamación, además de alterar la síntesis de insulina en células pancreáticas. Por otra parte, las características distintivas del cáncer incluyen una señalización proliferativa sostenida, evasión de supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular y metástasis. Todas estas características pueden analizarse desde un punto de vista de alteraciones de rutas REDOX. Las células cancerígenas mantienen niveles de ROS más altos de lo normal, como para mediar reacciones que permiten su proliferación, pero no a niveles citotóxicos. En las células del sistema nervioso central el desajuste del equilibrio de ROS afecta tanto el desarrollo como la plasticidad neuronal, lo que se traduce en la aparición y mantenimiento de enfermedades como Parkinson o Alzheimer<sup>16,19</sup>.

### **1.3 Fluoróforos basados en xanteno**

Las sondas fluorescentes de molécula pequeña hoy en día juegan un rol importante en áreas de investigación como la bioquímica, la biomedicina o la biología en general. Los xantenos son una clase especial de compuestos tricíclicos, similares

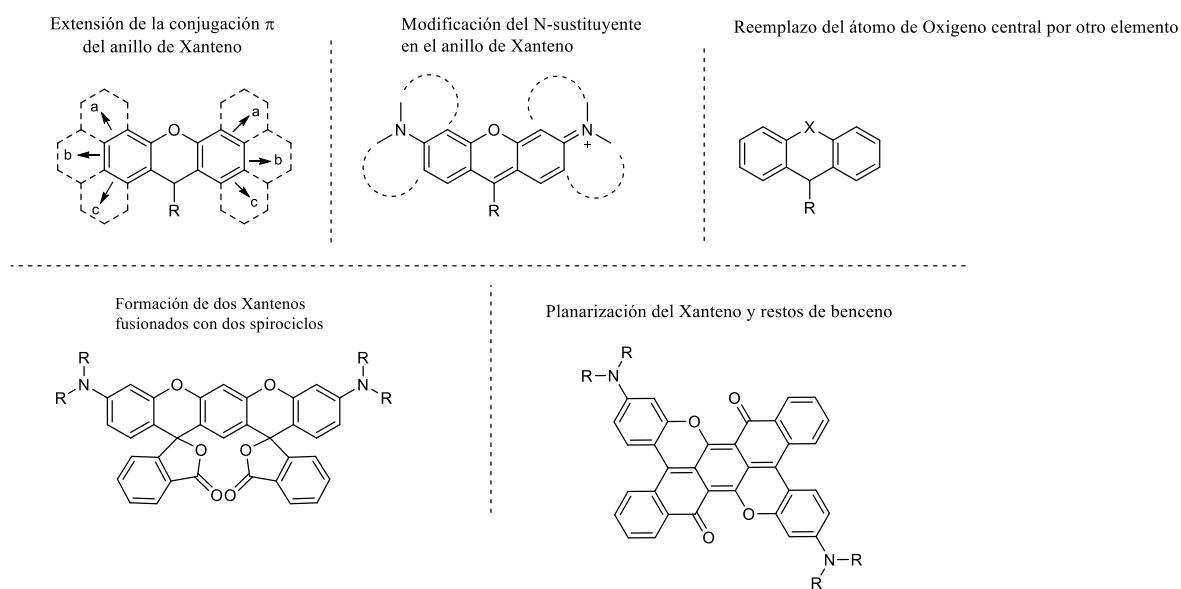
al antraceno, pero en donde el anillo central ha sido reemplazado por un anillo de pirano. Constituyen una clase de heterociclos importantes ya que están presentes en una gran variedad de productos naturales, exhiben un buen número de actividades biológicas y farmacéuticas. Sus propiedades fotofísicas y su facilidad de modificación estructural los han hecho muy útiles en el desarrollo de técnicas de microscopía de fluorescencia, aplicaciones analíticas y terapia fotodinámica<sup>20</sup>.

Con base en su estructura, los derivados de xanteno se pueden dividir en tres clases principales: fluoresceínas, rodaminas y rodoles. Estos derivados tienen excelentes propiedades fotofísicas tales como altos coeficientes de extinción, buenos rendimientos cuánticos y longitudes de onda largas tanto de absorción como de emisión. La presencia de diferentes sustituyentes en la posición 9 involucra un gran impacto en sus propiedades fotofísicas y biológicas. Los tres derivados mencionados arriba contienen un ácido carboxílico en la posición 9 que puede formar un espirociclo y actúa como interruptor molecular al interrumpir el sistema  $\pi$  conjugado. Este equilibrio entre las forma *abierta* y *cerrada*, depende externamente de las condiciones del medio como el pH y la polaridad, y dependen internamente de los sustituyentes con los que sea derivada cada molécula<sup>20,21</sup>.



**Esquema 2.** A. Estructura general del núcleo de Rodol con los carbonos enumerados. B. y C. Estructuras de rodamina y fluoresceína respectivamente, nótese que se trata de estructuras cargadas. D. Los rodoles pueden presentar una forma neutra y otra iónica dependiendo del medio.

La radiación electromagnética de baja energía es especialmente útil porque penetra fácilmente los tejidos vivos, además de causar menos daño que las longitudes de onda de mayor energía. Por esta razón se han hecho varios estudios con el fin de modular las propiedades fotofísicas de los compuestos de xanteno. En la literatura se pueden encontrar al menos cinco formas de modular estas respuestas (**Esquema 3**): 1. Aumentar la conjugación  $\pi$  del cromóforo; 2. Modificación de los grupos *N* sustituidos del sistema  $\pi$  del cromóforo; 3. Reemplazo del átomo de oxígeno central con el de otros elementos; 4. Formación de xantenos fusionados incorporando dos anillos espirocíclicos y 5. Planarización de los grupos xanteno y benceno <sup>22</sup>.



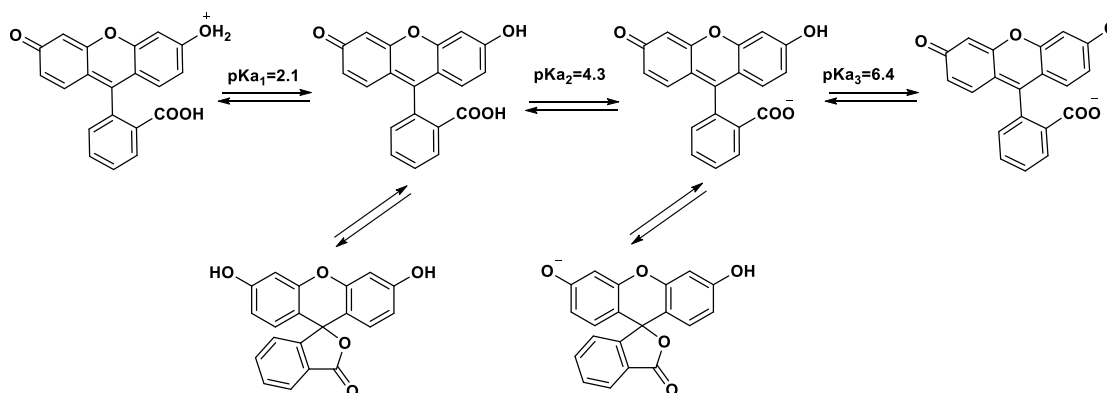
**Figura 7.** Estrategias generales usualmente usadas para modular las propiedades ópticas de las sondas basadas en Xanteno.

### 1.3.1 Fluoresceínas y rodaminas

La preparación de fluoresceína por condensación de resorcinol con anhídrido ftálico, usando un ácido de Lewis como catalizador, fue reportada por primera vez por Von Bayer en 1871. Es uno de los fluoróforos mas ampliamente usados en bioquímica moderna, así como en la investigación biológica y médica, debido a la facilidad de obtenerla a bajo costo.

Este compuesto existe como cuatro especies en equilibrio en disolución acuosa que dependen del pH: catiónica, neutra, aniónica y dianiónica. En el **esquema 3** se muestran los  $pK_a$  de cada una de las formas que presenta<sup>22</sup>. Como dianión absorbe luz azul con un máximo de absorción de  $\lambda_{max} = 490 \text{ nm}$  y un coeficiente de emisión de  $\epsilon = 9.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a una longitud de onda de emisión  $\lambda_{em} = 512 \text{ nm}$  que está dentro de la región verde del espectro electromagnético, también presenta un rendimiento cuántico de  $\Phi_F 0.95$ <sup>23</sup>.

Respecto al ajuste de las propiedades fotofísicas de las fluoresceínas, la alquilación o acilación del oxígeno fenólico mantiene la molécula en la forma de espirolactona (no fluorescente). Sin embargo, existen dos métodos para aumentar los máximos de absorción: a) la halogenación en el anillo de xanteno o en el fenilo colgante, por ejemplo, la halogenación con cloro provoca un cambio batocrómico alrededor de 40 nm. Sin embargo, la introducción de átomos pesados como Br y I también aumentan la probabilidad de un cruce intersistemas desde el estado excitado singulete hasta el estado excitado triplete; b) otro método que se puede usar para aumentar los máximos de absorción implica la sustitución del oxígeno del xanteno por otro átomo, como C o Si<sup>22,24</sup>.



*Esquema 3. Posibles estructuras que puede adoptar la fluoresceína dependiendo del pH. Las formas abierta y cerrada que se muestran entre el primer y el tercer valor de  $pK_a$  dependen de la polaridad del medio.*

Entre los fluoróforos derivados de xanteno más famosos y útiles están las rodaminas, cuyo nombre proviene del griego *rodhon* que significa rosa. Son básicamente compuestos sintéticos que contienen varios derivados de amina ya sean cíclicos o lineales. La rodamina B fue sintetizada por primera vez por Noelting

y Dziejonsk en 1905 y ha sido usada ampliamente en muchos campos de investigación. Las rodaminas tienen longitudes de onda de absorción y emisión mucho más largas que las fluoresceínas -entre 450 y 700 nm-, además de altos valores de coeficiente de extinción y buenos rendimientos cuánticos. Comparadas con las fluoresceínas, las rodaminas tienen una alta resistencia al fotoblanqueo. Las rodaminas también pueden presentar una forma abierta y una forma de espirolactona cerrada, en su forma de espirolactona los compuestos no son fluorescentes y son a menudo incoloros, mientras que la apertura del anillo da como resultado una fuerte emisión de color rosado<sup>13,23,24</sup>.

Las rodaminas se usan frecuentemente como materiales de referencia para espectrofotometría de fluorescencia, gracias a su alta fotoestabilidad. Por ejemplo, la rodamina B y la rodamina 101 son empleadas como material de referencia para determinar el rendimiento cuántico de otros compuestos fluorescentes. La mayoría de las rodaminas existen como cationes fluorescentes de amonio cuya carga está deslocalizada en todo el sistema conjugado en un amplio rango de valores de pH<sup>7</sup>.

La modificación de las propiedades ópticas de las rodaminas como el brillo, la fotoestabilidad o las longitudes de onda de emisión o absorción, puede lograrse mediante la alquilación de los grupos de anilina (por ejemplo, para hacer una molécula más rígida), también se puede aumentar el tamaño del sistema conjugado o reemplazando el átomo de oxígeno central por otros átomos como el carbono, silicio, Germanio o Selenio<sup>22,25,26</sup>.

### 1.3.2 Rodoles

Los rodoles son híbridos estructurales de fluoresceína y rodamina. Dependiendo de los sustituyentes con los que cuente la longitud de absorción máxima varía de 490 a 550 nm, mientras que la longitud de onda de emisión varía de 520 a 580 en solución acuosa. A diferencia de las fluoresceínas y las rodaminas que tienen cargas formales negativas y positivas respectivamente, los rodoles muestran dos estructuras, una neutra y una dipolar (**esquema 2**)<sup>27</sup>. Por otra parte, el **Esquema 4** muestra las características estructurales que usualmente se tienen en cuenta al diseñar sondas, al modular cada una de estas partes se puede dirigir tanto las

propiedades ópticas como las características generales de la molécula. Un sustituyente polar en la posición 2 permite una transferencia intramolecular de protón en el estado excitado (ESIPT por sus siglas en inglés).

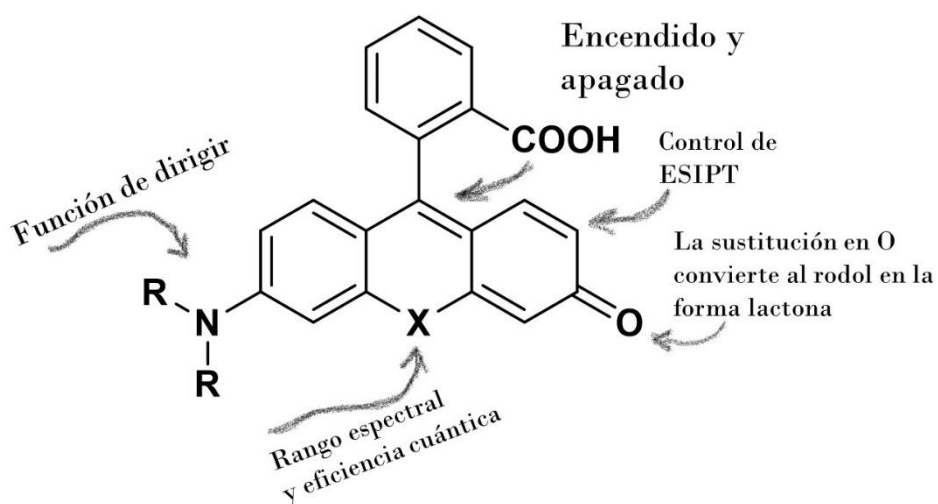
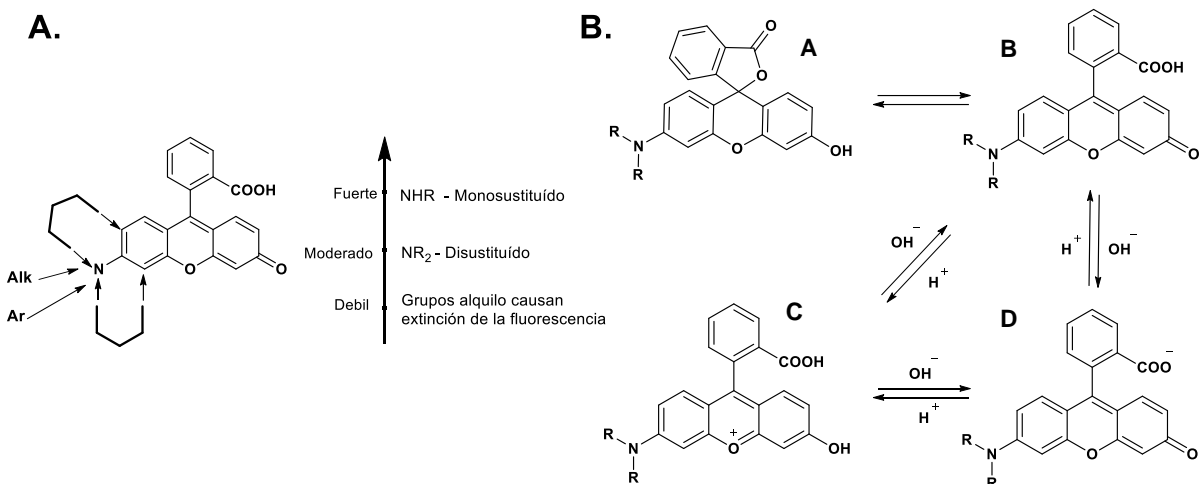


Figura 8. Características estructurales de los rodoles usadas en el diseño de sondas fluorescentes.

En los rodoles, una gran parte de la densidad electrónica se localiza en el grupo amino terminal. Bajo la excitación, la densidad electrónica se redistribuye desde el grupo amino hasta el grupo cetona. Por esto el momento dipolar del estado  $S_1$  es mucho más alto que el estado  $S_0$ . Por lo tanto, los disolventes polares estimulan la separación de carga y disminuyen la diferencia de energías entre HOMO y LUMO, lo que explica el solvatocromismo positivo que muestran generalmente. Rodoles no sustituidos exhiben una absorción máxima a 493 nm en agua con una fuerte respuesta de fluorescencia. La adición de uno o dos sustituyentes alquílicos aumenta la fuerza electro donadora del grupo amino y conduce a un desplazamiento hacia el rojo tanto en el máximo de absorción como de emisión. En contraste con los rodoles *N*-alquilados, los rodoles con sustituyentes arilo muestran menores señales de fluorescencia<sup>22,27</sup>



*Esquema 4. A. Influencia de los sustituyentes polares en las propiedades ópticas de los rodoles. B. Equilibrios entre las formas de espirolactonas y la forma abierta dependientes del pH.*

Al igual que las rodaminas y fluoresceínas, los rodoles muestran una forma de espirolactona cerrada que interrumpe el sistema  $\pi$  conjugado y bloquea la fluorescencia. Este comportamiento es dependiente en gran medida del pH, el **esquema 4B** muestra las diferentes especies que pueden estar en equilibrio. En condiciones básicas, los rodoles existen en la Forma D -la formación de la sal previene del cierre de anillo-, en condiciones ácidas dependiendo de los sustituyentes se puede encontrar en la forma espiro A o protonada C.

El método más común para la preparación de rodoles, al igual que en los otros fluoróforos derivados de xanteno, se basa en la acilación tipo Friedel-Crafts. Para los derivados simétricos la síntesis se realiza en un solo paso usando anhídrido ftálico y resorcinol (para fluoresceína) o *p*-aminofenol (para rodamina). Sin embargo, en el caso de los rodoles, la síntesis se debe hacer mediante un intermediario de benzofenona que requiere un exceso de anhídrido ftálico para suprimir la formación del compuesto simétrico en competencia, posteriormente la condensación del intermediario con resorcinol usando catálisis ácida<sup>20,22</sup>. Otra metodología hace uso de la aminación de Buchwald-Hartwig usando como materia prima fluoresceínas monoprotectadas en la forma espiro, formando un intermediario de trifluorometil sulfonato y posteriormente realizando la aminación y desprotección del compuesto. Usando este método se ha sintetizado una biblioteca de rodoles con diferentes sustituyentes<sup>28</sup>.

# Capítulo 2. Hipótesis y Objetivos

## 2.1 Hipótesis

Considerando las propiedades estructurales y el comportamiento fotofísico de los rodoles, se postula que la introducción de determinados grupos funcionales en su estructura permitirá la creación de interruptores moleculares altamente sensibles y selectivos para la detección de especies reactivas de oxígeno, específicamente peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ). La presencia de sustituyentes acetilo podría influir significativamente en sus propiedades de absorción y emisión, así como en su capacidad para cambiar entre estados dipolares y neutros bajo diferentes condiciones de pH y disolventes. Se espera que la manipulación de estos sustituyentes permita diseñar rodoles con afinidades específicas hacia las especies de interés, generando así una respuesta fluorescente distintiva y sensible ante la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $^1\text{O}_2$ . La combinación de la versatilidad sintética de los rodoles y su capacidad para interrumpir el sistema  $\pi$  conjugado ofrece una plataforma prometedora para el desarrollo de sensores altamente eficaces y selectivos para la detección de especies reactivas de oxígeno, lo que podría tener aplicaciones significativas en la investigación biomédica.

## 2.2 Objetivos Generales

El objetivo principal de este proyecto es llevar a cabo la síntesis y caracterización químicas de un derivado de rodol sustituido con un grupo acetilo en la estructura de xanteno, así como realizar estudios espectroscópicos y de imagenología para evaluar su respuesta frente a especies reactivas de oxígeno (ROS), particularmente peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ). Además, se busca caracterizar exhaustivamente estas moléculas mediante técnicas analíticas y espectroscópicas para comprender sus propiedades fotofísicas y su capacidad de detección de ROS. Por último, se pretende realizar estudios de imagenología para visualizar la interacción del fluoróforo con las ROS en líneas celulares, lo que permitirá validar su potencial aplicación como sondas fluorescentes para la detección y monitoreo de ROS en diversos contextos.

## 2.3 Objetivos específicos

2.3.1 Sintetizar el derivado de rodol sustituido con un grupo acetilo en la posición 6' de la estructura de xanteno mediante métodos de síntesis orgánica.

2.3.2 Los compuestos sintetizados de los derivados del rodol serán caracterizados mediante las técnicas espectroscópicas como RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C, así como por espectrometría de masas.

2.3.3 Realizar estudios espectroscópicos para evaluar la respuesta del derivado de rodol frente a ROS, mediante técnicas como espectroscopía de absorción y fluorescencia, para determinar su sensibilidad y selectividad hacia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

2.3.4 Realizar estudios de imagenología para visualizar la interacción del derivado de rodol con ROS en líneas celulares, mediante microscopía de fluorescencia confocal, con el fin de validar su potencial aplicación como sonda fluorescente para la detección y monitoreo de ROS en sistemas biológicos.

## Capítulo 3. Procedimiento experimental

### 3.1 Síntesis

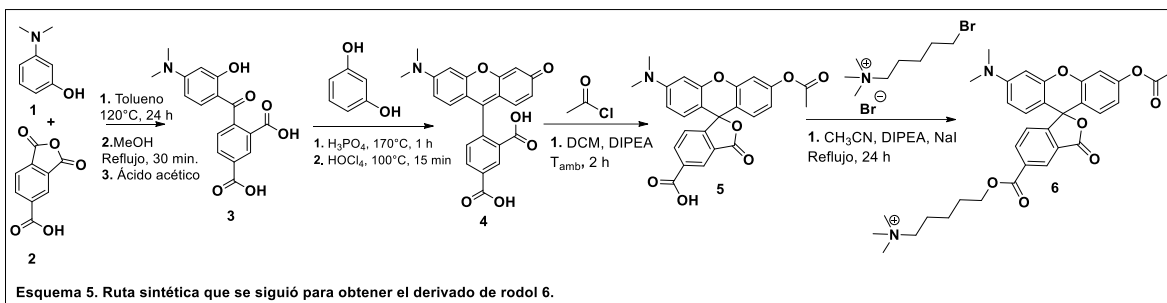
#### 3.1.1 Reactivos e instrumentación

Los reactivos utilizados fueron obtenidos de proveedores comerciales y fueron utilizados sin previa purificación, fueron almacenados según las indicaciones de los proveedores. Para la síntesis y los estudios de fluorescencia se usaron disolventes grado RA, los cuales fueron tratados y secados a través de métodos estandarizados. A las reacciones se les dio seguimiento mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF) de gel de sílice, fueron reveladas mediante exposición a luz UV ( $\lambda$  254 nm y  $\lambda$  365 nm), con una disolución de vainillina y con vapores de Yodo. Los rendimientos reportados corresponden a los productos purificados, las metodologías no fueron optimizadas.

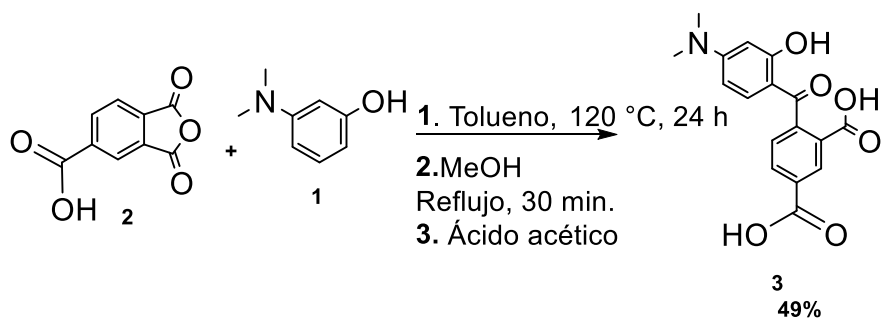
Los análisis de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se llevaron a cabo a 25 °C en los equipos: Bruker Fourier de 300 MHz y Bruker AVANCE III de 400 MHz. Los espectros obtenidos mediante estos métodos muestran desplazamientos químicos con respecto a  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ , empleando diferentes disolventes deuterados. Los espectros de masas en modo de ionización ESI+ fueron adquiridos en un equipo Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, usando DMSO o metanol como disolvente.

#### 3.1.2 Síntesis de los fluoróforos

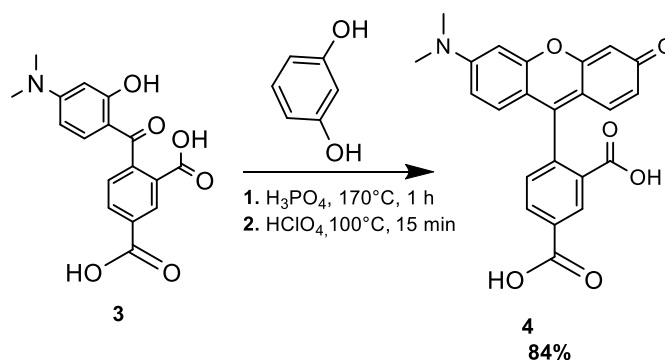
En el esquema 1 se muestra la ruta que se siguió para llevar a cabo la síntesis de la sonda, posteriormente se detallan los procedimientos que se llevaron a cabo en cada paso de la síntesis. El análisis de los espectros correspondientes a la caracterización de cada uno de los productos se puede leer en la sección 4.1.



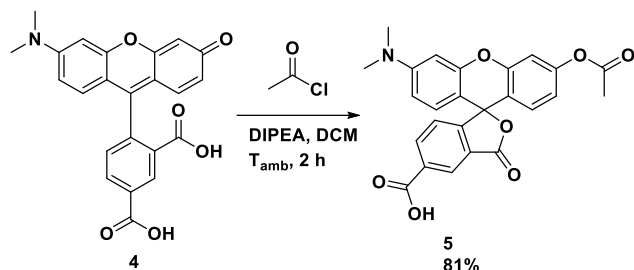
**Ácido 4-(4-(dimetilamino)-2-hidroxi-benzoil) isoftálico (3).** Se pesó 1.4 g (7.4 mmol) de **2** y se molió en un mortero hasta lograr un polvo fino. En un matraz bola se añadió 1 g (7.3 mmol) de **1** y se disolvió en 20 mL de tolueno, se llevó la mezcla a 60°C y posteriormente se añadió lentamente el compuesto **2**. Después se llevó la reacción a 120 °C por 24 h. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se evaporó el disolvente a presión reducida. Se añadieron 10 mL de metanol y se llevó a reflujo por 30 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 3 mL de ácido acético dando como resultado un precipitado de color rosa. La mezcla se evaporó a presión reducida, se recristalizó con la mínima cantidad de metanol frío. Se filtró el producto obteniendo 1.815 g (49%) de un polvo rosa.



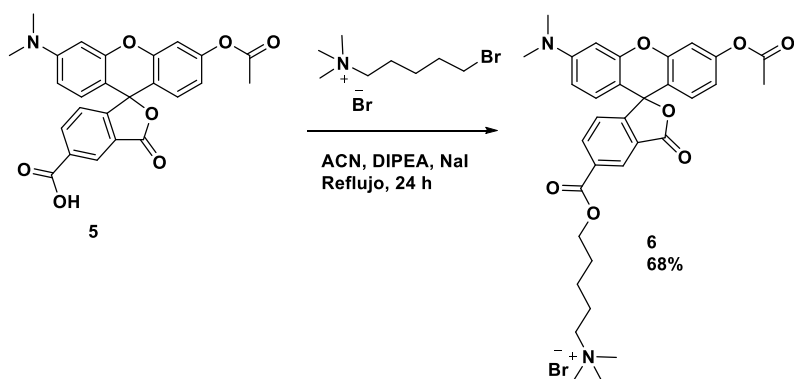
**Ácido 4-(6-(dimetilamino)-3-oxo-3H-xanthen-9-il) isoftálico (4).** Se pesaron y se colocaron dentro de un matraz 100 mg de **3** (0.303 mmol) y 34 mg de **resorcinol** (0.303 mmol), se añadió 1 mL de ácido fosfórico y se llevó a una temperatura de 170 °C por una hora. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadió 1 mL de ácido perclórico y se llevó a 100 °C por 15 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 2 mL de agua aproximadamente. Se llevó a un pH de 5.5 y se filtró el precipitado. Se obtuvieron 103 mg (84%) de un polvo de color rojo oscuro.



**Ácido 3'-acetoxi-6'-(dimetilamino)-3-oxo-3H-spiro[isobenzofurano-1,9-xanteno]-5-carboxílico (5).** La reacción se llevó a cabo en atmosfera inerte, para eso se colocaron 200 mg (0.496 mmol) de **4** en un matraz seco, se cerró y se hizo vacío, después se purgó con Ar y el procedimiento se repitió 3 veces. Se agregaron 10 mL de DCM seco y se colocó en un baño de hielo. Posteriormente, se agregaron 0.65 mL de DIPEA (1.488 mmol) y se dejó agitando por 15 min. Pasado ese tiempo, se añadieron 0.15 mL (2 mmol) de cloruro de acetilo, se retiró del baño de hielo y se dejó agitando a temperatura ambiente por dos horas. El producto se extrajo 3 veces usando una disolución de HCl 1M y DCM, en cada ocasión. Luego, se lavó 3 veces con una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl y DCM, en cada ocasión. La fase orgánica se evaporó al vacío y posteriormente se purificó mediante cromatografía en columna usando sílica como fase estacionaria y un sistema DCM/MeOH (97:3). Se obtuvieron 452 mg de un polvo rojo (**5**) lo que corresponde a un 81% de rendimiento.



**Bromuro de 5-((3'-acetoxi-6'-(dimetilamino)-3-oxo-3H-spiro[isobenzofurano-1,9'-xanteno]-5-carbonil) oxi)-N, N, N-trimetilpentan-1-amonio (6).** Se colocaron en un matraz 100 mg de **5** (0.224 mmol), se agregaron 80 mg de 5-bromo-*N, N, N*-trimetilpentan-1-amonio (0.269 mmol) y 3 mg de NaI (0.022 mmol), la mezcla de reacción se disolvió en 10 mL de ACN y se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadieron 80  $\mu\text{L}$  (4.59 mmol) de DIPEA y se llevó a reflujo durante 24 horas. Luego, se realizó una cromatografía en columna usando silica como fase estacionaria. Para la fase móvil, se usó un sistema de elución de polaridad creciente iniciando con DCM y aumentando la polaridad de 2% en 2% hasta llegar a 12% con MeOH. Se obtuvieron 98 mg de un sólido color naranja claro que corresponde a un 68% de rendimiento.



### 3.2 Espectrofotometría

Los disolventes empleados para las mediciones fueron de grado reactivo en su mayoría y en algunos casos, de grado HPLC. Todas las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura de 25 °C. Se preparó una solución stock de cada sonda a una concentración de 5 mM en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). El contenido final de DMSO se mantuvo por debajo del 1% en cada medición. Los espectros UV-Vis se obtuvieron en celdas de cuarzo utilizando un espectrofotómetro de arreglo de diodos Edinburgh Instruments. Los espectros de fluorescencia también se obtuvieron en celdas de cuarzo, utilizando un espectrofluorómetro FS5 de Edinbrough Instruments.

### 3.3 Microscopía de imagen

La línea celular empleada en este estudio fue la U-251, derivada de glioblastoma humano (U-251 MG cell line human, #09063001, Merck, USA). Las células se cultivaron en monocapas a una densidad de 10,000 células por pozo en cajas de 8 pozos de 10 mm con fondo de vidrio de la marca ibidi ( $\mu$ -Slide 8 well high Glass Bottom, #80807, ibidi GmbH, Germany). El medio utilizado fue RPMI-1640, suplementado con un 10% de suero fetal bovino. La incubadora se configuró a una temperatura de 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Se realizaron tratamientos celulares para microscopía de imagen utilizando cianuro de carbonilo *m*-clorofenilhidrazona (CCCP) a 150 nM; NaCl al 10%. Para los estudios de localización, las células se lavaron con PBS y se les cambió el medio nuevamente. La disolución stock de las sondas para microscopía se preparó a 5 mM en 2 mL de DMSO, añadiendo 1  $\mu$ L de cada sonda.

La configuración del microscopio confocal utilizada en todos los experimentos fue la siguiente: Texas Red con  $\lambda_{exc}$  = 590 nm y  $\lambda_{em}$  = 615 nm, proteína verde fluorescente (PVF) con  $\lambda_{exc}$  = 488 nm y  $\lambda_{em}$  = 520 nm, y DAPI con  $\lambda_{exc}$  = 358 nm y  $\lambda_{em}$  = 450 nm. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa FiJi (ImageJ).

## Capítulo 4. Resultados y Discusión

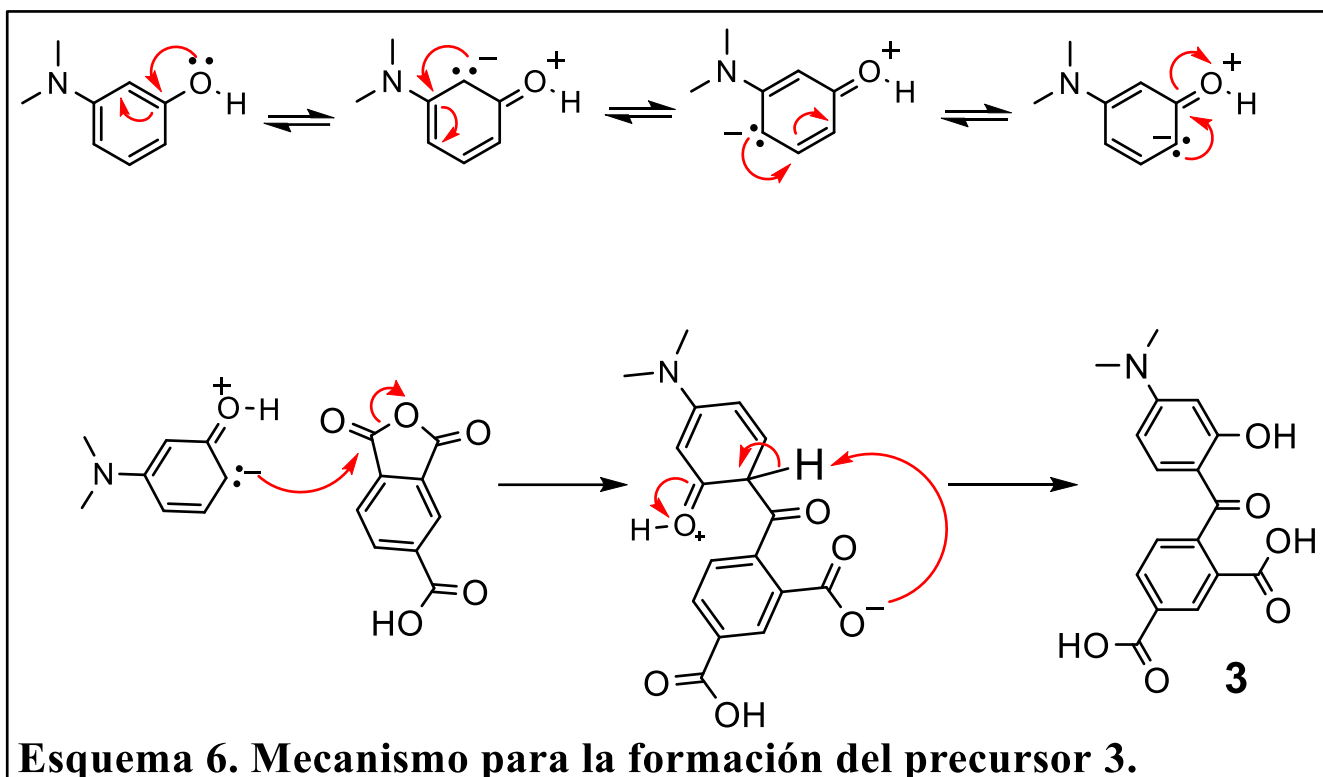
En el presente trabajo se logró sintetizar un derivado de rodol (**6**, **esquema 5**) que contiene un grupo acetilo en el oxígeno de la posición 3 y una cadena de *N, N, N*-trimetilpentilamonio. A continuación, se describirá a detalle el proceso de síntesis y la caracterización, cabe resaltar que solamente se realizó una caracterización completa del producto final (**6**) ya que los productos intermedios han sido reportados ampliamente en la literatura.

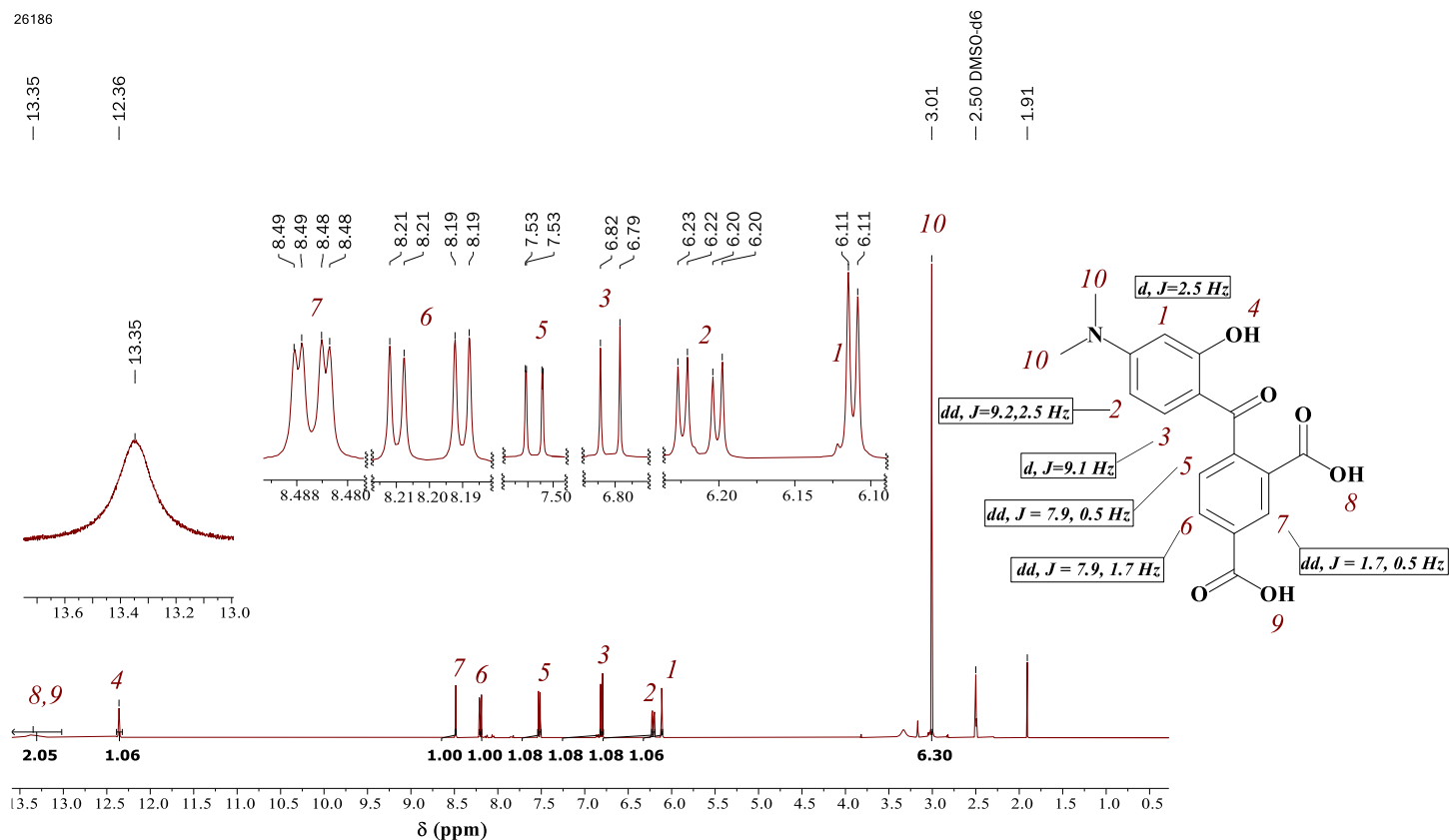
### 4.1 Caracterización

El primer paso de la ruta planteada fue la preparación del intermediario derivado de benzofenona (**3**), la cual se llevó a cabo mediante una acilación de tipo Friedel-Crafts usando como materias primas dimetilaminofenol (**1**) y el derivado de anhídrido ftálico (**2**). Se usó un ligero exceso de anhídrido ftálico. En el **esquema 6** se muestra el mecanismo propuesto, se observa que el dimetilaminofenol está activado en la posición *orto*; por lo que experimenta un ataque nucleofílico aromático sobre el carbono carbonílico del anhídrido ftálico. Posteriormente, hay un intercambio de protón entre uno de los ácidos carboxílicos y el hidrógeno del anillo, lo que recupera su aromaticidad y se obtiene el producto **3**.

La **figura 13** muestra el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **3**. En primer lugar, en la región de hidrógenos aromáticos se encuentra una señal doble de dobles en 8.49 ppm que corresponde al hidrógeno 7. Está desplazado a mayor frecuencia porque tiene dos grupos carboxílicos adyacentes y se encuentra acoplado con el hidrógeno 6 ( $J=1.7\text{Hz}$ ) y con el hidrógeno 5 ( $J=0.5\text{Hz}$ ). Se puede observar otra señal doble de dobles con un desplazamiento de 8.20 ppm correspondiente al hidrógeno 6 que está acoplado a los hidrógenos 5 ( $J=7.9\text{ Hz}$ ) y 7 ( $J=1.7\text{Hz}$ ). Se observa una señal doble con un desplazamiento de 7.53 ppm que corresponde con el hidrógeno número 5 que está acoplado a los hidrógenos 6 ( $J=7.9\text{ Hz}$ ) y 7 ( $J=0.5\text{ Hz}$ ). Existe una señal doble en 6.81 ppm que integra para un núcleo

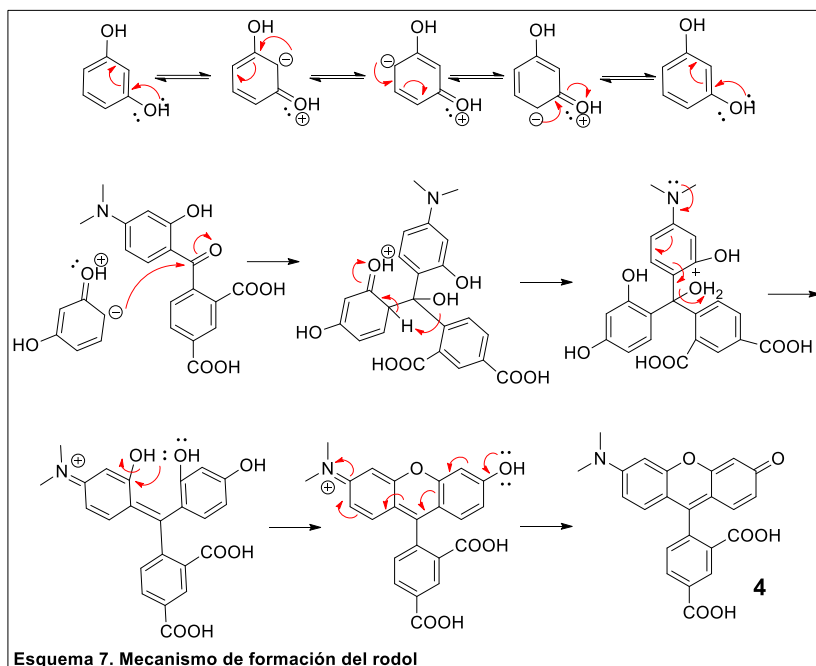
y corresponde al hidrógeno número 3 que está acoplado con el hidrógeno 2 ( $J=9.1$  Hz). El protón 2 aparece como una señal doble de dobles con un desplazamiento entre 6.22ppm, se observa acoplamiento con el protón 1 ( $J=2.5$  Hz) y 3 ( $J=9.2$  Hz). El protón 1 aparece como una señal doble cuyo desplazamiento es 6.11 ppm y está acoplado únicamente con el protón número 2 ( $J=2.25$  Hz). Los protones correspondientes a los ácidos carboxílicos muestran una señal ancha en 13.36 ppm, mientras que en 12.36 ppm se observa un singulete que corresponde al protón número 4, del fenol. Finalmente, en 3.01 ppm se observa un singulete que integra para 6 núcleos, correspondiente al grupo dimetilamino.



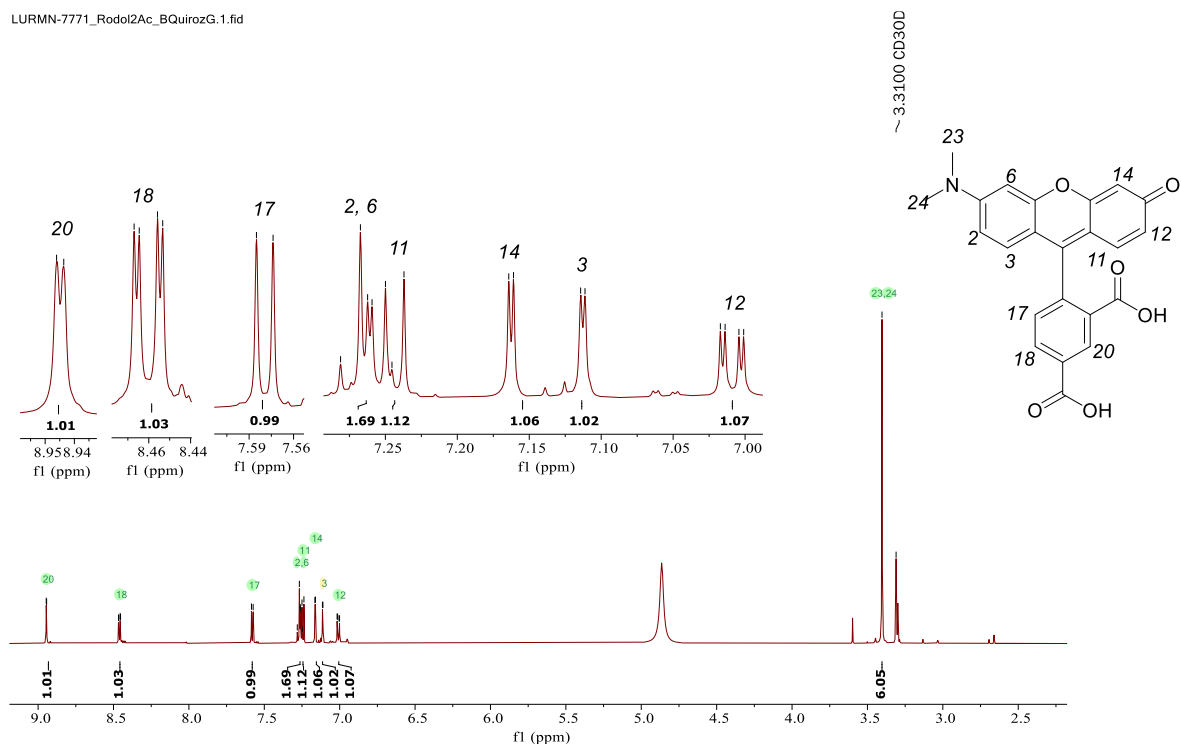


**Figura 6.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) del intermediario **1**.  $\delta$  13.35 (s, 2H), 12.36 (s, 1H), 8.49 (dd,  $J = 1.7, 0.5$  Hz, 1H), 8.20 (dd,  $J = 7.9, 1.7$  Hz, 1H), 7.52 (dd,  $J = 7.9, 0.5$  Hz, 1H), 6.81 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 6.21 (dd,  $J = 9.2, 2.5$  Hz, 1H), 6.11 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 3.01 (s, 6H).

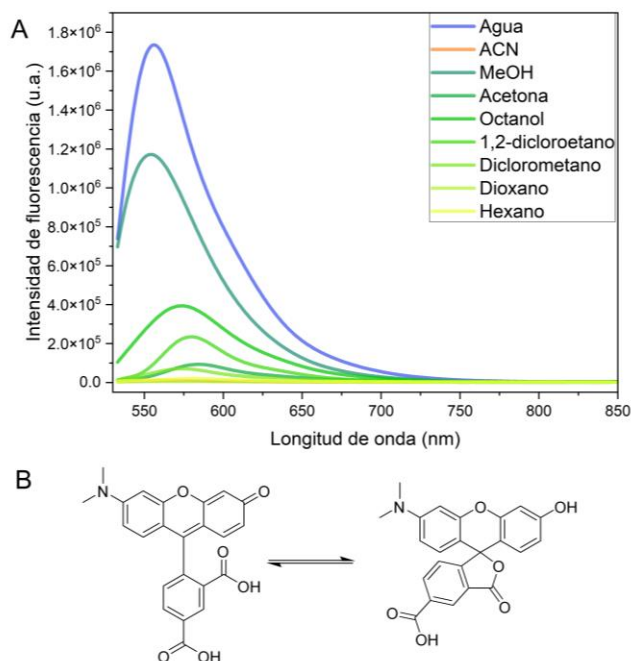
En el **esquema 3** se representa el mecanismo para la formación del rodol (**4**). Cómo se observa, el resorcinol es un anillo aromático activado en las posiciones *orto* y *para* por dos grupos hidroxilo. En primer lugar, ocurre una reacción de sustitución electrofílica aromática, en donde los electrones  $\pi$  del sistema aromático atacan al carbonilo del compuesto **3**, para luego experimentar una rearomatización. Posteriormente, el grupo dimetilamino dona su densidad electrónica liberando una molécula de agua y dejando al anillo -derivado del dimetilaminofenol- susceptible a un ataque por parte el hidroxilo -derivado del resocinol- para luego reordenar los electrones y dar la especie neutra **2** que es más estable. Teniendo el compuesto preparado, se caracterizó por  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, además se llevó a cabo un estudio solvatocrómico y la determinación del pKa en el que se lleva a cabo la formación de espirolactona.



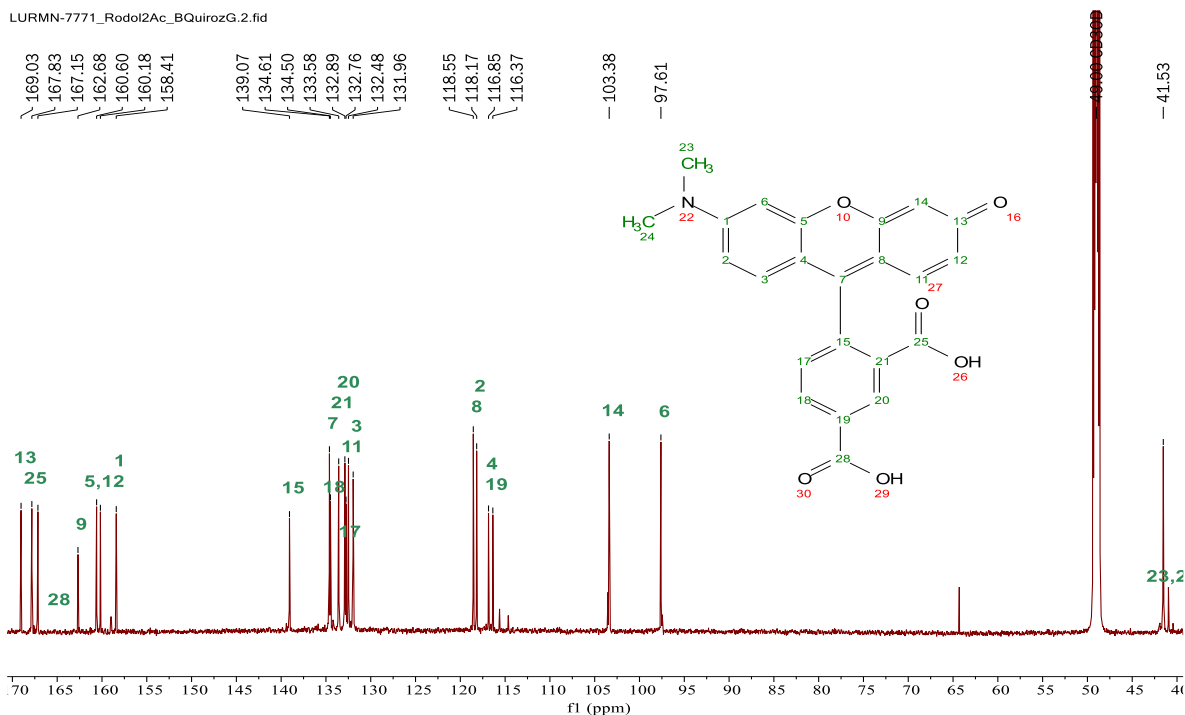
La **figura 13** muestra el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del rodol sintetizado. En esta especie hay 9 hidrógenos aromáticos (tres por cada anillo) y 6 hidrógenos alquílicos (correspondientes al grupo dimetilamino). En el espectro se muestra que el protón 20 está desplazado a mayor frecuencia, a 8.94 ppm ( $J=1.7\text{MHz}$ ), debido a que se encuentra entre dos carbonilos que lo desprotegen electrónicamente. La siguiente señal, que se encuentra con un desplazamiento de 8.46 MHz ( $J=7.8, 1.7\text{MHz}$ ) tiene una forma doble de dobles y la constante  $J=1.7\text{ MHz}$  indica que hay un acoplamiento en la posición *meta*, por lo que se deduce que se trata del protón 18. Se observa una señal cuyo desplazamiento es 7.58 ppm ( $J=7.8\text{ MHz}$ ) cuya constante de acoplamiento nos indica que se trata del protón 17. El mismo análisis se hizo para los demás protones aromáticos (2,6,11,14,3,12). Por último, se observa una señal en 3.40 ppm que integra para 6 núcleos de hidrógeno, por lo que se asignó a los protones del grupo dimetilamino (23, 24). La figura 15 muestra el espectro de <sup>13</sup>C del compuesto 4 en Metanol. Es importante notar que como se trata de un disolvente polar prótico, el rodol se encuentra en su forma “abierta” lo cual se confirma con las tres señales con desplazamientos en 169.03 ppm, 167.83 ppm y 167.15 ppm, que corresponden a los carbonos carbonílicos 13, 26 y 28 respectivamente.



**Figura 13.** Espectro de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  (700MHz,  $\text{MeOD-d}_4$ ) del producto 4.  $\delta$  8.94 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H), 8.46 (dd,  $J = 7.8, 1.7$  Hz, 1H), 7.58 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.27 – 7.26 (m, 2H), 7.24 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.16 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.11 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.01 (dd,  $J = 9.0, 2.3$  Hz, 1H), 3.40 (s, 6H).



**Figura 14.** A. Efecto del disolvente en la intensidad de fluorescencia del producto 4. B. Equilibrio de espirolactonización del producto 4.

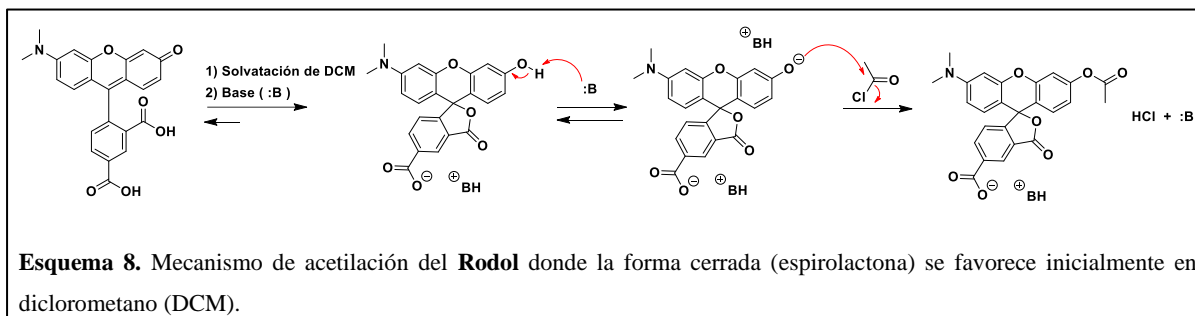


**Figura 15.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (MeOD- $d_4$  100 MHz) del compuesto 4.

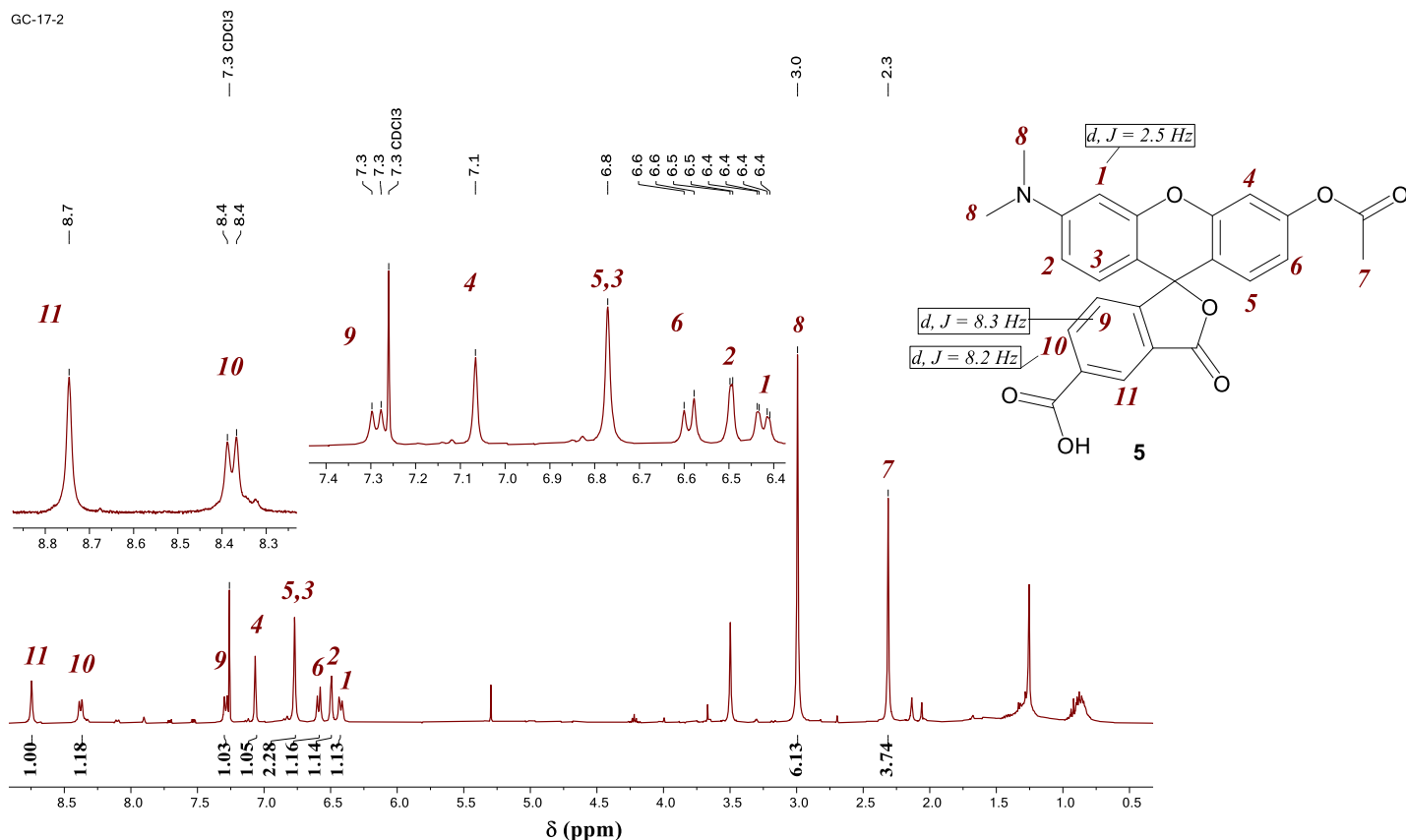
Como se mencionó anteriormente, los rodolos experimentan un equilibrio de espirolactonización que depende del pH y de la polaridad del medio. Por esta razón se realizaron mediciones de emisión de fluorescencia en disolventes con distinta polaridad. En su forma abierta la mayor conjugación permite que el compuesto absorba y emita luz en forma de fluorescencia. Como se muestra en la **figura 14**, cuando la polaridad disminuye la emisión de fluorescencia también disminuye, hasta que prácticamente deja de emitir en medios apolares como el hexano. Estas características se aprovecharon para llevar a cabo la siguiente reacción.

En medios no polares se favorece la especie ciclada, por lo que se utilizó diclorometano como disolvente ya que tiene una polaridad media y es un disolvente no prótico y una base para desprotonar el grupo fenol, promoviendo un ataque nucleofílico hacia el carbono carbonílico del cloruro de acetilo. El grupo acetilo cumple dos funciones principales en la molécula objetivo: 1. Mantener la especie ciclada en vez de la especie abierta, controlando así la emisión de fluorescencia y 2. Permitir su hidrólisis con las especies reactivas de oxígeno una vez dentro de la

célula. Tener la especie ciclada es ventajoso porque mantiene libre solo uno de los grupos carboxílicos y hace posible la funcionalización con la sal de amonio.



En la **figura 16** se observa el espectro de RMN de hidrógeno del rodol acetilado (**5**). Se observa una señal sencilla cuyo desplazamiento es de 8.70 ppm, correspondiente al protón 11, está desplazado hacia mayores frecuencias debido a que se encuentra entre dos grupos carbonilos: uno correspondiente a la espirolactona y el otro al ácido carboxílico. Se observa una señal doble en un desplazamiento de 8.4 ppm la cual corresponde al protón 10 y que se acopla con el protón 9 ( $J=8.20$  Hz). Por otra parte, la señal correspondiente al protón 9 aparece como una señal doble cuyo desplazamiento es de 7.3 ppm ( $J=8.30$  Hz) lo que indica que se acopla con el protón 10. Por otra parte, el protón número 4 muestra una señal con un desplazamiento de 7.1 ppm, mientras que los protones 5 y 3 muestran un mismo desplazamiento de 6.8 ppm y sin acoplamiento. El protón número 6 aparece como una señal doble cuyo desplazamiento es 6.59 ppm ( $J=8.91$  Hz). El protón 2 aparece como una señal doble con un desplazamiento de 6.49 ppm ( $J=2.50$  Hz). El protón 1 aparece como un multiplete cuyo desplazamiento está entre 6.44 y 6.40 Hz. Las señales de los protones asignados como 1, 2 y 3 sugieren que están acoplados entre sí, sin embargo, debido a la resolución del instrumento no fue posible calcular las constantes de acoplamiento de cada señal. Finalmente, los metilos de grupo dimetilamino aparecen como una señal sencilla cuyo desplazamiento es de 2.99 ppm que integra para 6 núcleos, mientras que el metilo del grupo acetil genera una señal sencilla con un desplazamiento de 2.31 ppm que integra para 3 núcleos.

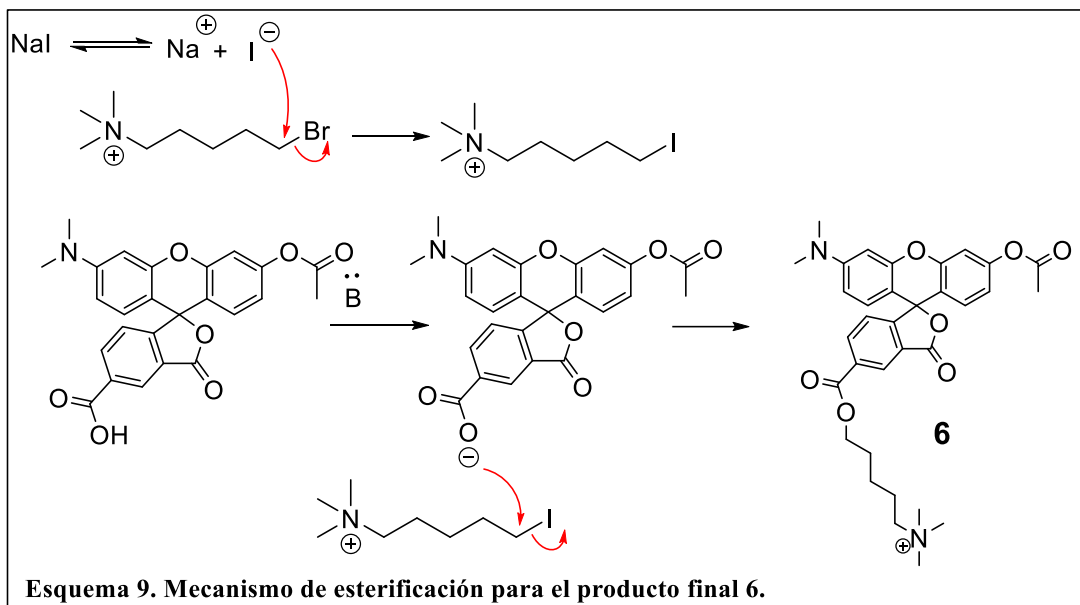


**Figura 16.** Espectro de NMR- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del rodol acetilado (5).  $\delta$  8.75 (s, 1H), 8.38 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.29 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.77 (s, 2H), 6.59 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 6.49 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 6.44 – 6.40 (m, 1H), 2.99 (s, 6H), 2.31 (s, 3H).

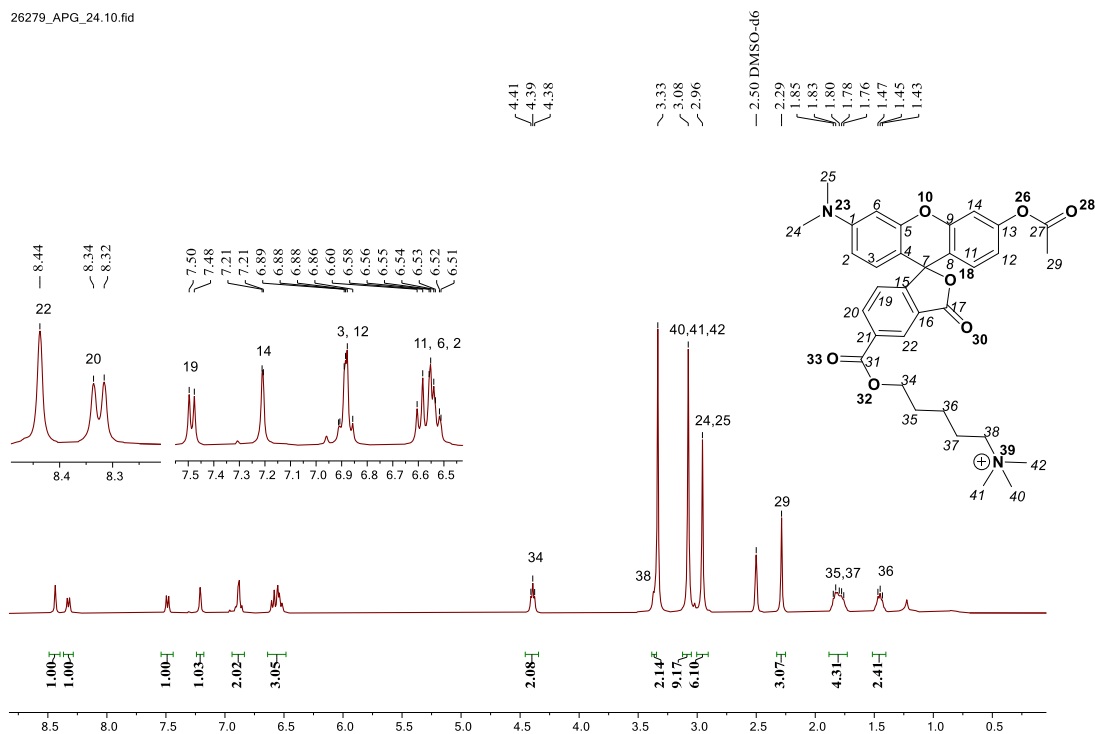
Por otra parte, una vez que el fluoróforo ha permeado la célula, el grupo de *N, N*, *N*-trimetilpentilamonio permite que la molécula sea dirigida hacia la mitocondria aprovechando la diferencia de potencial de este organelo. Por esta razón se funcionalizó el compuesto usando Bromo-trimetilpentilamonio, mediante una reacción de Finkelstein *in situ* para cambiar el grupo saliente de Br a I y posteriormente lograr un ataque nucleofílico por parte del ácido libre del rodol. El **esquema 9** muestra el mecanismo propuesto para llevar a cabo este proceso.

El compuesto **6** se sometió a diferentes experimentos de RMN para lograr su caracterización completa, además del análisis de masas, para analizar el espectro de RMN- $^1\text{H}$ . La **figura 17** muestra el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , en principio este espectro presenta algunos problemas: algunas señales del área de aromáticos tienen un desplazamiento químico similar, lo que dificulta determinar las constantes de acoplamiento; las señales de 4 hidrógenos unidos a la cadena alquílica se

sobreponen, lo que dificulta su asignación completa; la señal que tiene un desplazamiento de 3.33 ppm corresponde a impurezas de agua, que oculta la señal de dos hidrógenos alquílicos como se demuestra más adelante. Para tener la caracterización completa se requiere un estudio bidimensional de RMN. En primero lugar, se realizó el análisis de espectroscopia de correlación (COSY por sus siglas del inglés **CO**rrelation **S**pectroscop**Y**) **figura 18**.



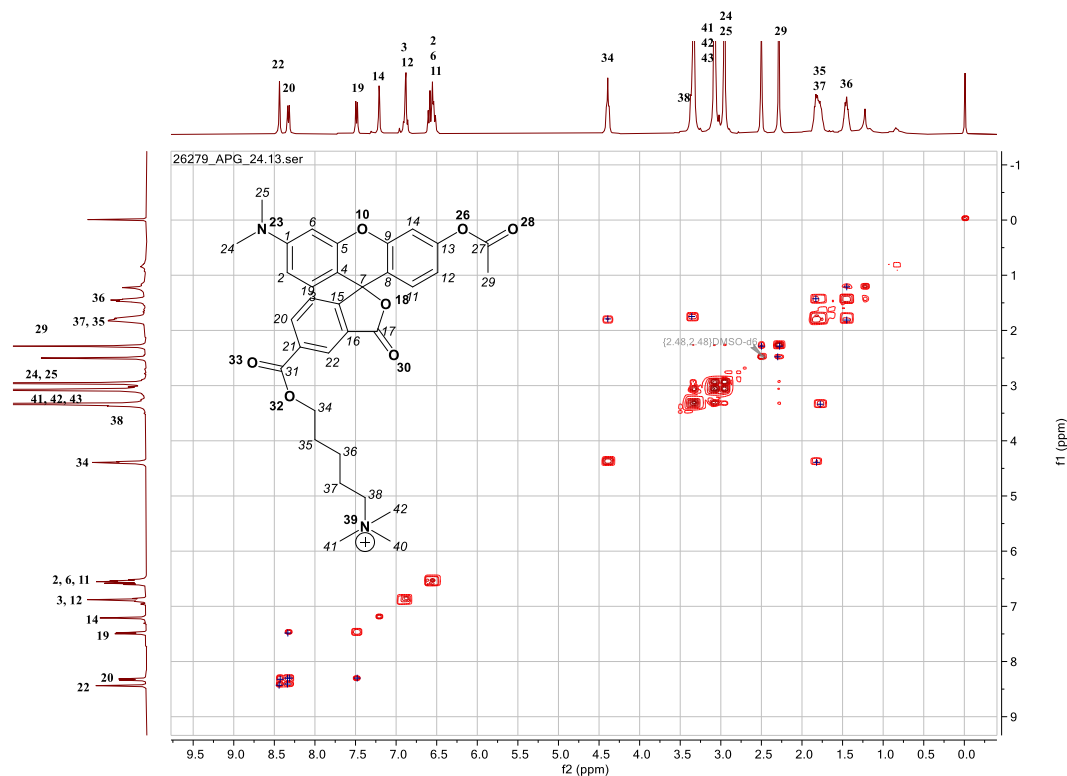
El espectro de RMN-<sup>1</sup>H muestra una señal simple en 8.44 ppm lo que corresponde al hidrógeno 22, está más desplazado porque se encuentra entre dos carbonilos. Las señales en 8.33 y 7.49 ppm corresponden a los protones 19 y 20 respectivamente, tienen una constante de acoplamiento de 8.1 Hz que coincide con los acoplamientos para protones en posición *orto*. Se encuentran 3 señales simples: en 3.08ppm correspondientes a los protones 40, 41 y 42; en 2.96 ppm que pertenecen a los protones 24 y 25; y en 2.29 ppm para el metilo 29. Las señales que se encuentran entre 1 y 4.5 ppm corresponden a los hidrógenos de la cadena alquílica, para asignarlos se recurrió al análisis del espectro COSY.



**Figura 17.** Espectro de  $^1\text{H}$  NMR del **compuesto 6** (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.44 (s, 1H), 8.33 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.49 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.21 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 6.98 – 6.83 (m, 2H), 6.65 – 6.47 (m, 3H), 4.39 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 3.08 (s, 11H), 2.96 (s, 7H), 2.29 (s, 4H), 1.80 (dt,  $J = 15.2, 7.8$  Hz 5H), 1.45 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H).

En la **figura 18** se observa el espectro bidimensional COSY. En primer lugar, se asume que las señales que se encuentran en 4.38-4.41 ppm corresponden a los hidrógenos unidos al **C-34** ya que están muy cerca de un grupo carboxílico, lo cual hace que se observe un desplazamiento mayor, luego se puede ver que correlacionan con las señales que están en 1.76-1.85 ppm, cómo estas últimas señales integran para 4 protones, 2 de ellos corresponden a los hidrógenos unidos al carbono **C-35**. Como se mencionó anteriormente, existe una señal sencilla en 3.33 que corresponde a los protones del agua presente en el disolvente, sin embargo, HMBC (Figura 20) muestra que hay un acoplamiento con la señal que está en 3.08, la cual corresponde a los protones unidos a los carbonos C-40, C-41 y C-42, por lo que se espera que la señal de agua esté sobrepuesta sobre la señal de los protones correspondientes a los unidos al **C-38**. El grupo de señales que está en 1.43-1.47 ppm únicamente se acopla con el grupo que está en 1.76-1.85 ppm por lo que se asume que este grupo de señales corresponda a los dos protones unidos al **C-36**. Finalmente, los últimos dos protones del grupo que está en 1.76-

1.85 corresponden a los unidos al **C-37**. De esta manera se logró asignar las señales correspondientes a los protones **34, 35, 36, 37, 38** de la **figura 16**.



*Figura 18. Espectro COSY del compuesto 6(MeOD-d<sub>4</sub>, 400 MHz).*

Con COSY y RMN-<sup>1</sup>H fue posible realizar casi todas las asignaciones de los hidrógenos de la molécula, sin embargo, los protones unidos a los carbonos aromáticos del núcleo de Xanteno todavía no se asignaban. Para esto fue necesario recurrir a los otros espectros bidimensionales mostrados en las **figuras 18 y 19**. Primero se analizó el espectro HSQC (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence) que muestra acoplamiento heteronuclear entre átomos de <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H. Con base en las asignaciones del espectro de RMN-<sup>1</sup>H se encontraron los carbonos unidos a cada uno de los protones (**figura 18**). Posteriormente se realizó el análisis del espectro HMBC (**H**eteronuclear **M**ultibond **C**onnectivity) que puede detectar los acoplamiento protón-carbono a dos y tres enlaces de distancia. Por ejemplo, el carbono cuaternario 7, se acopla con los protones unidos a los carbonos 11, 3, y 19. El espectro de la **figura 19** muestra que la señal en 83.06 ppm del espectro de

$^{13}\text{C}$  está acoplada con las tres señales de los carbonos 11, 3 y 19. Por otra parte, el protón del C-22 muestra un acoplamiento con las señales de los carbonos carbonílicos 31 y 17, en el espectro de HMBC las señales que están en 168.85 y 164.49 ppm muestran acoplamiento con el protón del C-22 por lo que se puede afirmar que estas señales correspondan a los carbonos 31 y 17 respectivamente. De esta manera se asignaron las señales de RMN- $^1\text{H}$  de los protones unidos al núcleo de Xanteno y todas las señales del espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ , mostrado en la **figura 20**. Por último, se realizó un estudio de espectrometría de masas (**figura 21**) para el compuesto 6 mediante la técnica ESI (Electrospray Ionization). El compuesto tiene una masa teórica de 573.2595 uma, en la figura 20 se muestra el espectro de masas que indica una masa es de 573.2625 uma que corresponde con lo esperado.

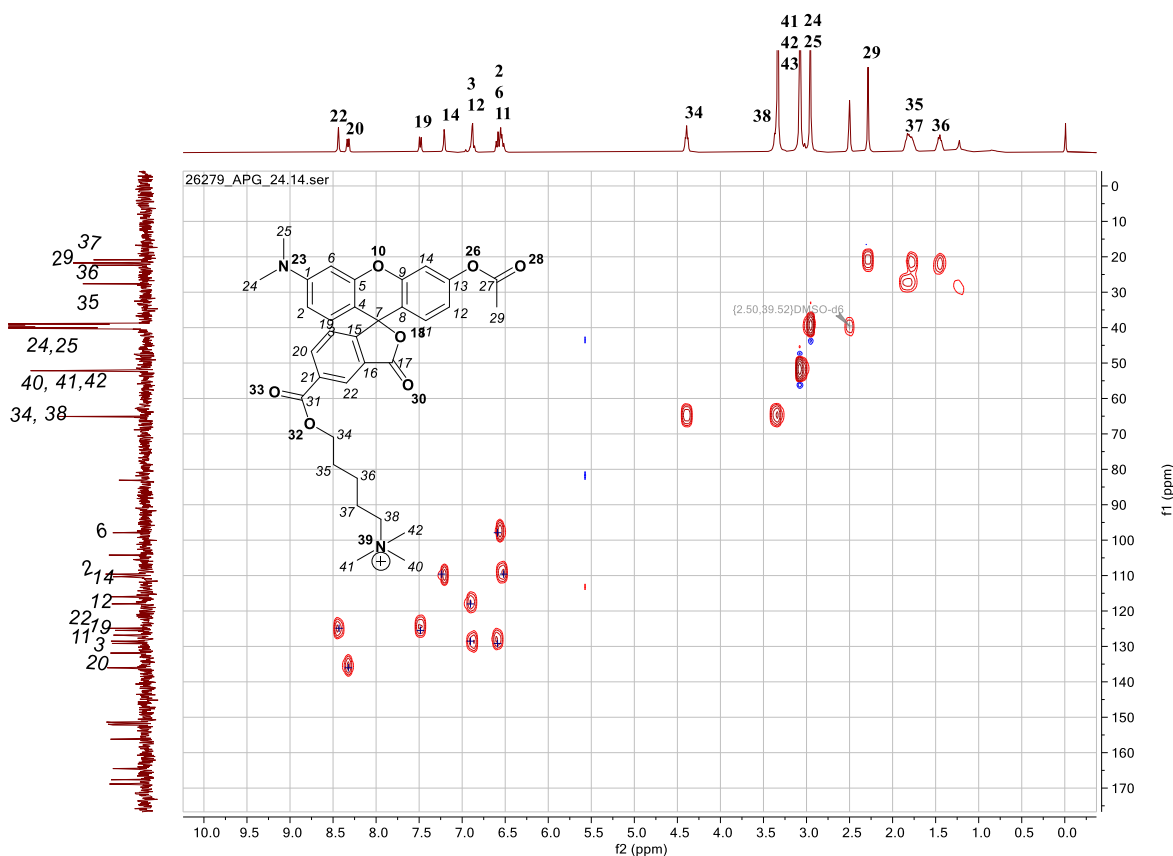


Figura 19. Espectro HSQC del compuesto 6 (MeOD- $d_4$ , 400 MHz).

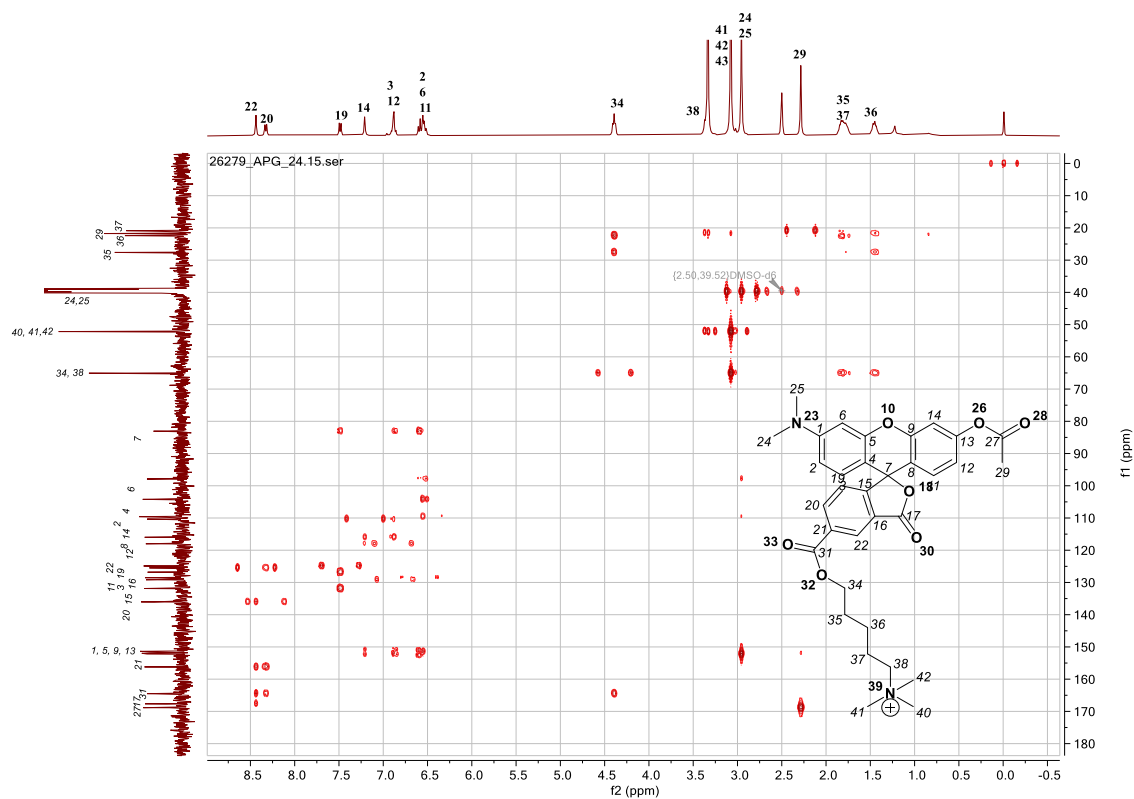


Figura 20. Espectro HMBC del compuesto 6 (MeOD-d<sub>4</sub>, 400 MHz).

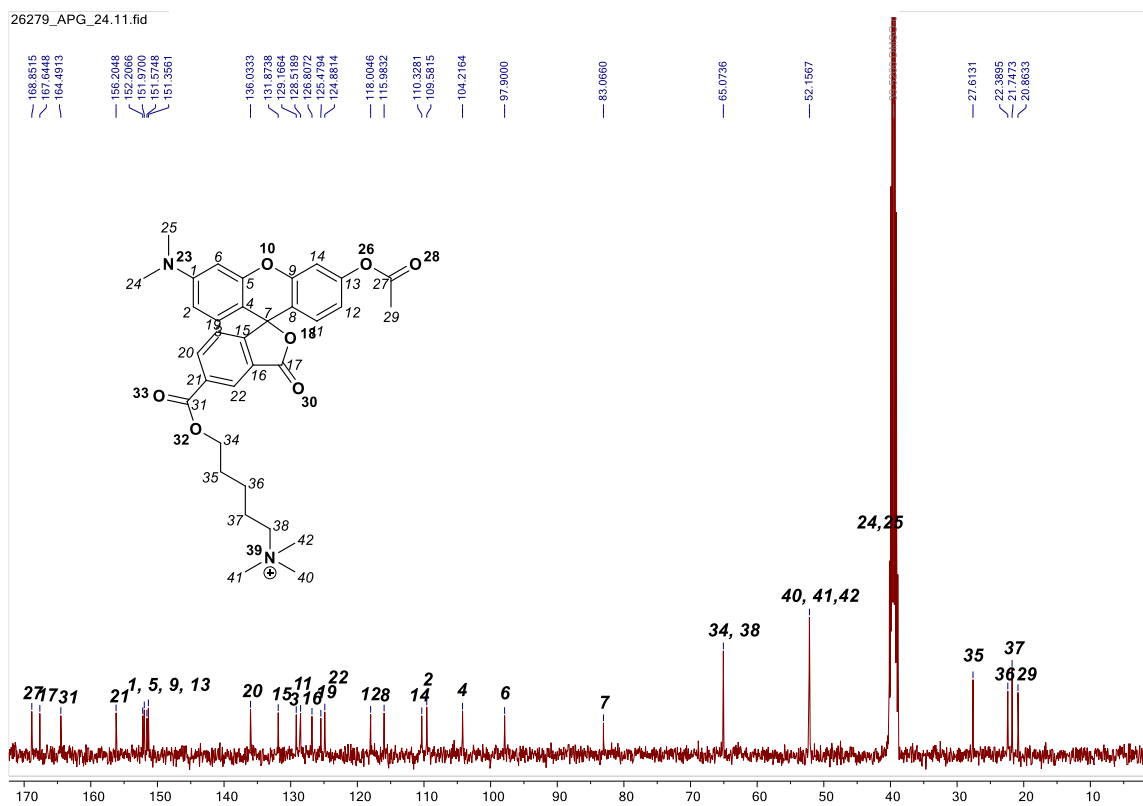


Figura 21. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 100MHz) del compuesto 6.

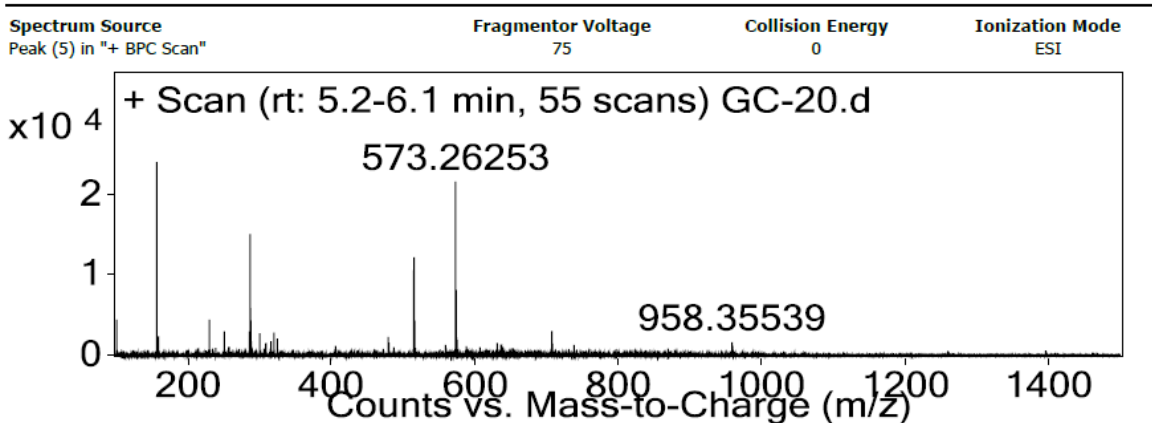


Figura 22. Espectro de masas del compuesto 6. Se observa que el ion molecular tiene la masa 573.26253uma que corresponde con la masa del compuesto esperado 573.2517uma

## 4.2 Espectroscopía de fluorescencia

Una vez que la sonda estuvo completamente caracterizada se estudiaron sus propiedades fotofísicas mediante espectroscopía de absorción y de emisión. Se llevaron a cabo experimentos de solvatocromismo, agregación, pH y diferentes ROS, con el fin de entender los efectos del ambiente molecular sobre las transiciones electrónicas que el fluoróforo puede experimentar. De esta manera se puede evaluar su viabilidad como sensor en algún tipo de microscopía de fluorescencia.

### 4.2.1 Análisis de solvatocromismo

El efecto del disolvente en las propiedades fotofísicas de la sonda de rodol sintetizada fue evidente a través de los experimentos de solvatocromismo, los cuales mostraron un notable cambio en la distribución dual de los perfiles de absorción y emisión en función del tipo de disolvente. Este fenómeno sugiere que la interacción del fluoróforo con el entorno modula la distribución electrónica en su estado excitado, alterando las transiciones electrónicas que experimenta. En disolventes como agua, dicha dualidad se hizo presente en absorción UV-Vis de manera significativa, mientras que en fluorescencia se observó un ligero desplazamiento batocrómico, lo que indica una mayor estabilización del estado excitado debido a interacciones dipolares y probablemente de enlace de hidrógeno,

mientras que, en medios menos polares, la energía de absorción se incrementó un poco, provocando un desplazamiento hipsocrómico ligero. Estos resultados son consistentes con el comportamiento típico de los rodosles y demuestran la capacidad del derivado para ajustar sus propiedades ópticas en función del entorno, haciéndolo adecuado para aplicaciones en las que las variaciones microambientales son cruciales, como la detección de ROS en sistemas biológicos.

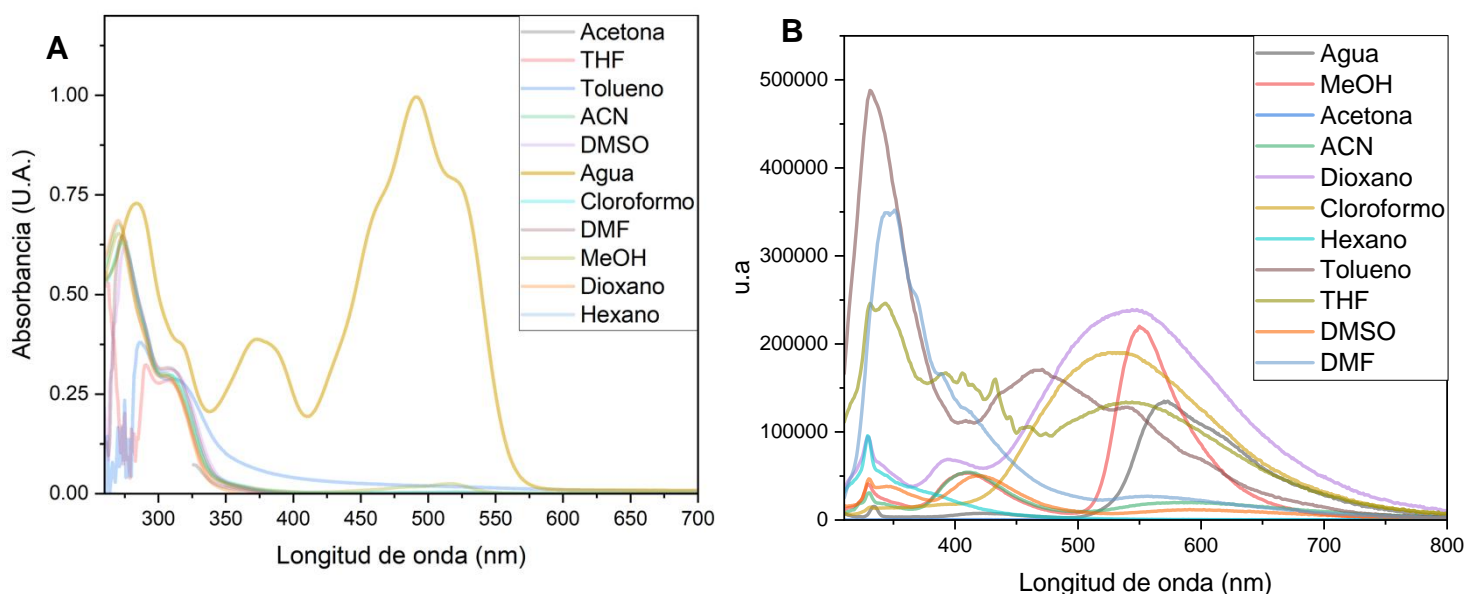
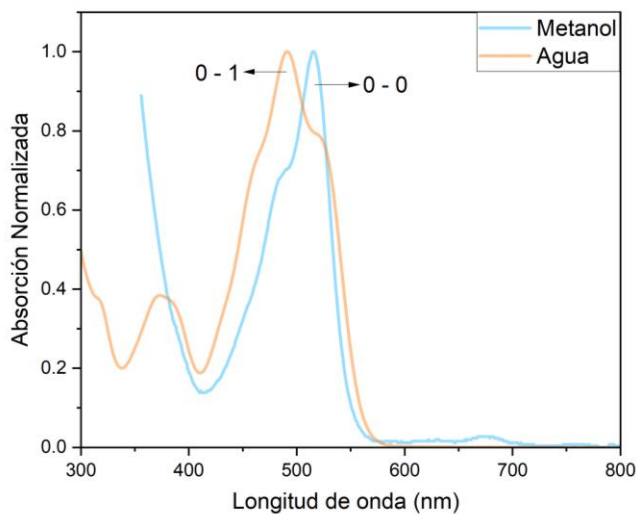


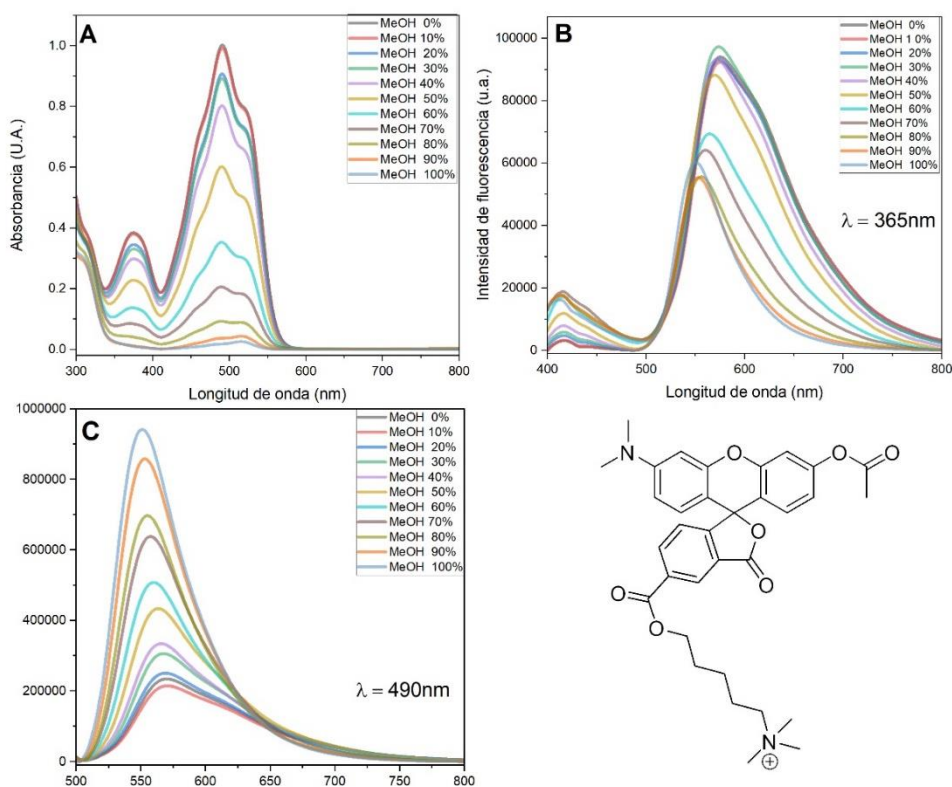
Figura 23. Espectros de A) Absorción UV-vis y B) Fluorescencia del compuesto 6, 10  $\mu\text{M}$  en diferentes disolventes.

Al normalizar las señales de los espectros de absorción, se observó que en agua y en metanol parecía haber una inversión de las bandas (**Figura 22**), lo que sugiere la formación de agregados. Para estudiar esta hipótesis se procedió a hacer un análisis de agregados más riguroso, utilizando como disolventes agua y metanol en distintas proporciones.



**Figura 24.** Espectro de absorción normalizado del compuesto 6, 10  $\mu\text{M}$  en metanol y agua. Las flechas indican las transiciones 0-0 y 0-1.

#### 4.2.2 Análisis de agregados



**Figura 25.** Análisis de agregados del compuesto 6 en diferentes concentraciones de Agua y metanol. A) Espectros de absorción. B) y C) espectros de fluorescencia.

El fenómeno de agregación molecular en el sistema metanol:agua reveló una notable inversión en las características vibrónicas de los espectros de absorción UV-Vis, particularmente entre las transiciones 0-0 y 0-1, donde la transición 0-0 experimentó un aumento en intensidad conforme crecía el contenido de agua. Este comportamiento sugiere la formación de agregados moleculares tipo J, de acuerdo con la teoría del excitón de Frenkel <sup>29</sup>, la cual describe cómo la excitación electrónica se deslocaliza sobre varias moléculas cuando éstas forman agregados ordenados. Los agregados tipo J se caracterizan por un desplazamiento batocrómico (hacia longitudes de onda más largas) en la absorción, o un aumento en las características vibrónicas 0-0 vs. las 0-1, lo que concuerda con los resultados observados. Además, en los espectros de fluorescencia, se detectó un incremento en la emisión a medida que aumentaba el contenido de agua y disminuía el de metanol, lo que sugiere que la formación de agregados en este sistema favorece una mayor eficiencia en la emisión fluorescente. Estos hallazgos indican que el entorno (o disolvente) no solo afecta la absorción, sino también la emisión, lo que podría ser aprovechado para diseñar sistemas con propiedades fluorescentes ajustables, adecuados para aplicaciones en microscopía y detección de especies reactivas de oxígeno.

#### 4.2.4 Análisis de pH

La variación del pH en los experimentos de espectroscopía UV-Vis y fluorescencia ha permitido observar un comportamiento sensible del rodol, en consonancia con la hipótesis planteada sobre la influencia de los grupos funcionales en su estructura y propiedades fotofísicas. Los resultados indican que el rodol responde de manera clara a los cambios en el pH del medio, mostrando un punto isobéptico en las mediciones de UV-Vis, lo cual sugiere la existencia de un equilibrio entre diferentes especies del compuesto. Dicho punto isobéptico ubicado en 485 nm es característico de una transición entre dos estados bien definidos del rodol, la forma abierta (ácido carboxílico) y cerrada (espirolactona) con un valor de  $pK_a$  (absorción) =  $5.79 \pm 0.02$  lo que refuerza la idea de que las modificaciones estructurales inducidas por el pH están relacionadas con cambios en el equilibrio ácido-base de ciertos grupos funcionales.

En cuanto a las mediciones de fluorescencia, se observó una disminución global en la intensidad de emisión al aumentar el pH de 3 a 11, dicho cambio fue completamente monotónico, lo que sugiere la coexistencia de las especies ácido - base en equilibrio influenciadas por el pH. Esta variabilidad en la fluorescencia refleja una modificación estructural significativa, confirmada por un  $pK_a$  claramente definido,  $pK_a$  (emisión) =  $5.76 \pm 0.02$ , correspondientes a la protonación del grupo dimetil(amino) a pH bajo y la hidrólisis del grupo éster a pH alcalino.

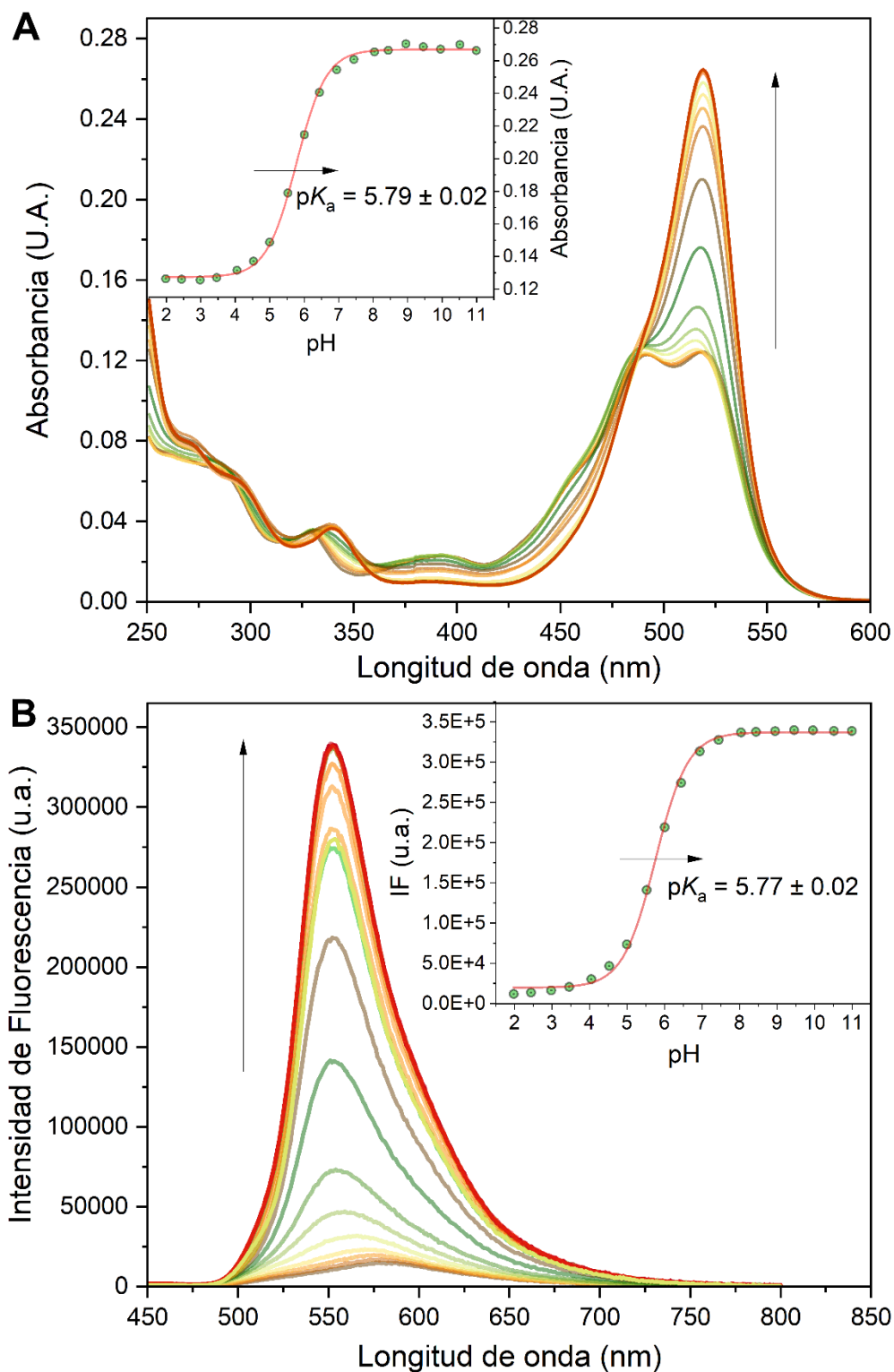


Figura 7. Espectros de A) UV-Vis y B) fluorescencia del compuesto 6  $40 \mu\text{M}$  en medio acuoso a pH variable. Las flechas indican los cambios al aumentar el pH. Los recuadros muestran los perfiles de absorbancia o fluorescencia vs. pH a las longitudes de onda máximas y los perfiles de ajuste teórico (ecuación 1) y el  $pK_a$  obtenido.

El valor de  $pK_a$  de este equilibrio se calculó a partir de los espectros de absorción UV-Vis y fluorescencia mediante la ecuación 8, obteniendo así los valores de dicha constante de equilibrio ácido-base. Tras el ajuste correspondiente, se determinó un  $pK_a$  de  $5.79 \pm 0.02$  en absorción y de  $5.77 \pm 0.02$  en emisión.

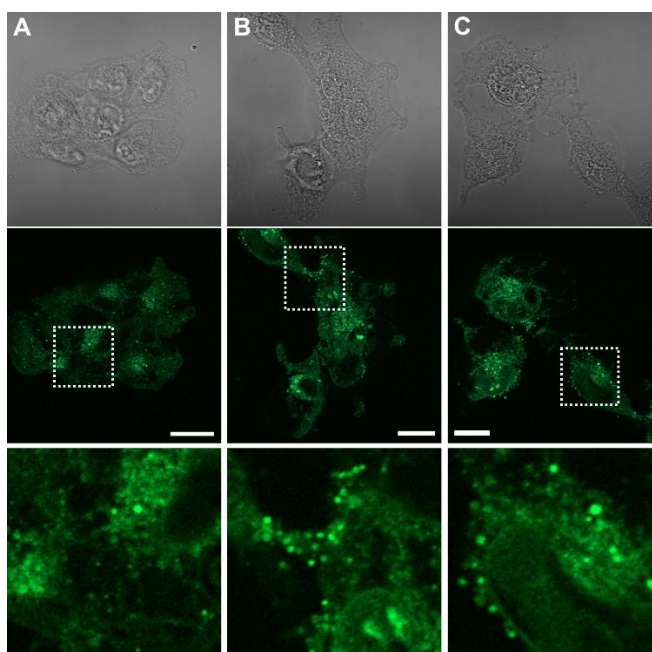
$$y = \frac{A+B \times 10^{pK_a-x}}{1+10^{pK_a-x}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde A es la absortividad molar de la especie desprotonada, B de la especie protonada y x el valor de pH.

Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que la manipulación de los sustituyentes funcionales podría permitir diseñar rodoles con afinidades específicas hacia especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno y el oxígeno singulete, al modificar sus propiedades electrónicas y fotofísicas.

### 4.3. Microscopía de Fluorescencia.

Como se mencionó anteriormente, el propósito de esta molécula es hacer estudios de microscopía de fluorescencia, por lo que se procedió a evaluar su potencial como marcador celular. Las imágenes obtenidas se realizaron en cultivos celulares de la línea U-251, derivada de glioblastoma humano. Se ensayaron varias concentraciones y varios tiempos de incubación, finalmente se determinó que 30 min eran suficientes para que hubiera una permeabilidad celular apropiada con una concentración de  $0.1 \mu\text{M}$ . Se identificó el canal en el que se observara la señal del fluoróforo, ensayando los canales predeterminados siguientes: Azul (DAPI  $\lambda_{\text{exc}}=359\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=461\text{nm}$ ), verde (GFP  $\lambda_{\text{exc}}=488\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=510$ ), y rojo (Texas red  $\lambda_{\text{exc}}=596\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=615\text{nm}$ ). Solo se observó señal en el canal de GFP, lo cual concuerda con los estudios fotofísicos previamente realizados donde se observaba una absorción máxima en  $490\text{nm}$ . En la **figura 25** se observan las imágenes obtenidas a partir de estos experimentos.



*Figura 8. Imágenes de microscopía confocal del compuesto 6 en la línea celular U-251. Tiempo de incubación: 30 min, 0.1  $\mu$ M.*

## Conclusiones

En este trabajo se logró sintetizar un derivado de rodol con un grupo acetilo en la estructura de xanteno, demostrando su capacidad como sonda molecular sensible para la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS), en particular peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ). Las pruebas de solvatocromismo y actividad ácido-base mostraron que las propiedades fotofísicas del derivado sintetizado dependen en gran medida de los sustituyentes involucrados, lo que da pauta para el diseño de nuevos compuestos.

El análisis espectroscópico permitió identificar un desplazamiento batocrómico en la absorción de la sonda al modificar el medio solvente, lo que sugiere que las interacciones del fluoróforo con su entorno influyen en su comportamiento óptico. Además, los estudios de fluorescencia evidenciaron una alta selectividad hacia  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $^1\text{O}_2$ , con una respuesta clara en presencia de estas ROS. Esto refuerza el potencial del rodol sintetizado para el monitoreo de procesos oxidativos *in cellulo*, relevante para el estudio de estrés oxidativo en sistemas biológicos.

Los resultados indican que la estructura del rodol puede ser modificada mediante cambios en el pH, lo que afecta tanto su absorción como su emisión. Estas propiedades ajustables, junto con la presencia de puntos isobésticos que reflejan transiciones equilibradas entre especies, sugieren que los rodoles tienen un gran potencial en aplicaciones bioanalíticas, específicamente como sensores de pH y detectores de especies reactivas de oxígeno.

Los estudios de microscopía indican que la molécula es capaz de penetrar la membrana celular, detectar y mapear diferentes ROS en tiempo real. Esta capacidad la convierte en una herramienta valiosa para estudios biomédicos donde la detección precisa de ROS es crítica, como en investigaciones sobre enfermedades degenerativas o cáncer. Sin embargo, todavía queda por hacer estudios de colocalización para detectar específicamente el organelo al que se dirige, además de estudios para evaluar si la sonda es específica para cierto tipo de ROS.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que el derivado de rodol sintetizado es un candidato prometedor para su aplicación en sistemas moleculares fluorescentes de ROS. Su versatilidad sintética y capacidad de respuesta al microambiente local abren la posibilidad de su implementación en una amplia gama de estudios bioquímicos y biomédicos.

## Bibliografía

- (1) Silbey, R. J.; Alberty, R. A.; Bawendy, M. G. *Physical Chemistry*, Fourth Edition.; Brennan, D., McFadden, P., Batey, M., Eds.; John Wiley & Sons: New York, 2005; Vol. 1.
- (2) Randić, M. Aromaticity of Polycyclic Conjugated Hydrocarbons. *Chem Rev* **2003**, *103* (9), 3449–3606. <https://doi.org/10.1021/cr9903656>.
- (3) Platt, J. R. Classification of Spectra of Cata-Condensed Hydrocarbons. *J Chem Phys* **1949**, *17* (5), 484–495. <https://doi.org/10.1063/1.1747293>.
- (4) Birks, J. B. *Photophysics of Aromatic Molecules*, 1st ed.; Birks, J. B., Ed.; Wiley Interscience: New York, 1970; Vol. 1.
- (5) Lopata, K.; Reslan, R.; Kowalska, M.; Neuhauser, D.; Govind, N.; Kowalski, K. Excited-State Studies of Polyacenes: A Comparative Picture Using EOMCCSD, CR-EOMCCSD(T), Range-Separated (LR/RT)-TDDFT, TD-PM3, and TD-ZINDO. *J Chem Theory Comput* **2011**, *7* (11), 3686–3693. <https://doi.org/10.1021/ct2005165>.
- (6) Scaiano, J. C. A Beginners Guide to Understanding the Mechanisms of Photochemical Reactions: Things You Should Know If Light Is One of Your Reagents. *Chem Soc Rev* **2023**, *52* (18), 6330–6343. <https://doi.org/10.1039/D3CS00453H>.
- (7) Skoog, D. A.; Holler, J. F.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed.; González, S., Ed.; CENGAGE Learning: México, 2008; Vol. 1.
- (8) Valeur, Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 1st ed.; Valeur, B., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2001; Vol. 1.
- (9) Scaiano, J. *Light Photochemistry*; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 2022. <https://doi.org/10.1021/acsinfocus.7e5031>.
- (10) Lakowicz, J. R. Introduction to Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer US: Boston, MA, 2006; pp 1–26. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_1).
- (11) Klán, Petr.; Wirz, J. A Crash Course in Photophysics and Classification of Primary Photoreactions. In *Photochemistry of organic compounds: From concepts to practice.*; Coxon, James., Bailey, Pat., Field, Les., Gladysz, J., Parsons, P., Stang, P., Eds.; Wiley: United Kingdom, 2009; Vol. 1, pp 25–71.
- (12) Schnermann, M. J.; Lavis, L. D. Rejuvenating Old Fluorophores with New Chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **2023**, *75*, 102335. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2023.102335>.

- (13) Lavis, L. D. Chemistry Is Dead. Long Live Chemistry! *Biochemistry* **2017**, *56* (39), 5165–5170. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00529>.
- (14) Tamura, T.; Hamachi, I. Recent Progress in Design of Protein-Based Fluorescent Biosensors and Their Cellular Applications. *ACS Chem Biol* **2014**, *9* (12), 2708–2717. <https://doi.org/10.1021/cb500661v>.
- (15) Demchenko, Alexander. General Aspects. In *Advanced fluorescence reporters in chemistry and biology I*; 2010; Vol. 8, pp 3–24.
- (16) Mittler, R. ROS Are Good. *Trends Plant Sci* **2017**, *22* (1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>.
- (17) Anbar, A. D. Elements and Evolution. *Science (1979)* **2008**, *322* (5907), 1481–1483. <https://doi.org/10.1126/science.1163100>.
- (18) Dickinson, B. C.; Chang, C. J. Chemistry and Biology of Reactive Oxygen Species in Signaling or Stress Responses. *Nat Chem Biol* **2011**, *7* (8), 504–511. <https://doi.org/10.1038/nchembio.607>.
- (19) Lennicke, C.; Cochemé, H. M. Redox Metabolism: ROS as Specific Molecular Regulators of Cell Signaling and Function. *Mol Cell* **2021**, *81* (18), 3691–3707. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.018>.
- (20) Maia, M.; Resende, D. I. S. P.; Durães, F.; Pinto, M. M. M.; Sousa, E. Xanthenes in Medicinal Chemistry – Synthetic Strategies and Biological Activities. *Eur J Med Chem* **2021**, *210*, 113085. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113085>.
- (21) Samanta, S.; Lai, K.; Wu, F.; Liu, Y.; Cai, S.; Yang, X.; Qu, J.; Yang, Z. Xanthene, Cyanine, Oxazine and BODIPY: The Four Pillars of the Fluorophore Empire for Super-Resolution Bioimaging. *Chem Soc Rev* **2023**, *52* (20), 7197–7261. <https://doi.org/10.1039/D2CS00905F>.
- (22) Kamino, S.; Uchiyama, M. Xanthene-Based Functional Dyes: Towards New Molecules Operating in the near-Infrared Region. *Org Biomol Chem* **2023**, *21* (12), 2458–2471. <https://doi.org/10.1039/D2OB02208G>.
- (23) Sameiro, M.; Goncalves, T. Optimized UV/Visible Fluorescent Markers. In *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I*; Demchenko, A., Ed.; Springer: Germany, 2010; Vol. 1, pp 27–65.
- (24) Lavis, L. D. Teaching Old Dyes New Tricks: Biological Probes Built from Fluoresceins and Rhodamines. **2017**. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>.
- (25) Fu, M.; Xiao, Y.; Qian, X.; Zhao, D.; Xu, Y. A Design Concept of Long-Wavelength Fluorescent Analogs of Rhodamine Dyes: Replacement of Oxygen with Silicon Atom. *Chemical Communications* **2008**, No. 15, 1780. <https://doi.org/10.1039/b718544h>.

- (26) Chen, X.; Pradhan, T.; Wang, F.; Kim, J. S.; Yoon, J. Fluorescent Chemosensors Based on Spiroring-Opening of Xanthenes and Related Derivatives. *Chem Rev* **2012**, *112* (3), 1910–1956. <https://doi.org/10.1021/cr200201z>.
- (27) Poronik, Y. M.; Vygranenko, K. V.; Gryko, D.; Gryko, D. T. Rhodols-Synthesis, Photophysical Properties and Applications as Fluorescent Probes. *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry October 21, 2019, pp 5242–5265. <https://doi.org/10.1039/c9cs00166b>.
- (28) Peng, T.; Yang, D. Construction of a Library of Rhodol Fluorophores for Developing New Fluorescent Probes. *Org Lett* **2010**, *12* (3), 496–499. <https://doi.org/10.1021/ol902706b>.
- (29) Cai, K.; Xie, J.; Zhang, D.; Shi, W.; Yan, Q.; Zhao, D. Concurrent Cooperative J-Aggregates and Anticooperative H-Aggregates. *J Am Chem Soc* **2018**, *140* (17), 5764–5773. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b01463>.