



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**MONITOREO DE PROPIEDADES QUÍMICAS Y FISCOQUÍMICAS DINÁMICAS EN MEMBRANA
MITOCONDRIAL CON SONDAS FLUORESCENTES**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. RICARDO DAVID FLORES CRUZ

TUTOR:

DR. ARTURO JIMÉNEZ SÁNCHEZ

COMITÉ TUTOR:

DR. ANATOLI IATSIMIRISKI

DR. JORGE PEÓN PERALTA

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad de México AGOSTO, 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

MONITOREO DE PROPIEDADES QUÍMICAS Y FISICOQUÍMICAS DINÁMICAS EN MEMBRANA
MITOCONDRIAL CON SONDAS FLUORESCENTES

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. RICARDO DAVID FLORES CRUZ

TUTOR:

DR. ARTURO JIMÉNEZ SÁNCHEZ

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM



Posgrado
Ciencias
Químicas

Ciudad de México AGOSTO, 2020.

JURADO

Presidente	Dr. Anatoly Iatsimirski
Vocal	Dra. Lena Ruiz Azuara
Vocal	Dr. Hiram Isaac Beltrán Conde
Vocal	Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig
Secretario	Dra. Susana Porcel García

Lugar donde se desarrolló la tesis

Laboratorio 5C del Instituto de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México
Paseo de la Investigación Científica s/n, Ciudad de México

Tutor

Dr. Arturo Jiménez Sánchez

Sustentante

M. en C. Ricardo David Flores Cruz

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada. No. de Becario 576635 y No. de CVU 660410.

Al Instituto de Química por el acceso a cursos, talleres, instalaciones, capacitaciones y conferencias.

Al Dr. Arturo Jiménez Sánchez por su apoyo y guía durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Jorge Peón, Dr. Luis Demetrio Miranda, Dr. Braulio Rodríguez y al Dr. Anatoli Iatsimirski, por sus observaciones, insumos y la facilitación de equipos.

A los miembros del jurado: Dr. Anatoly Iatsimirski, Dra. Lena Ruiz Azuara, Dr. Hiram Isaac Beltrán Conde, Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig, Dra. Susana Porcel García, por sus observaciones y revisión de este escrito.

A la Dra. Daniela Araiza por las capacitaciones en cultivo celular.

Al Instituto de Fisiología con la Dra. Ruth Rincón y el Dr. Abraham Rosas por sus capacitaciones en microscopía confocal, también al Dr. Fernando López por sus estudios en el modelo Pez Cebra.

Al Instituto de investigaciones biomédicas con el Dr. Miguel Tapia por sus observaciones y capacitaciones en microscopía confocal y al Dr. Salvador Ramírez por cultivos celulares.

Al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo con el M. en C. Carlos Castellanos por las capacitaciones en citometría de flujo.

Al Dr. Rafael López por los estudios en fluorescencia resuelta en tiempo.

A los técnicos del Instituto de Química por sus capacitaciones y por la colaboración experimental, en particular a la Maestra Lucia del Carmen Márquez (HPLC), Dr. Everardo Tapia Mendoza (MS), Beatriz Quiroz García (NMR), Nuria Esturau Escofet (NMR).

Al posgrado en Ciencias Químicas y a la UNAM por permitir la estadía y desarrollo profesional.



Hasta el momento, el proyecto culminó en las siguientes publicaciones:

- **Flores-Cruz, R.**, López-Arteaga, R., Ramírez-Vidal, L., López-Casillas, F., Jiménez-Sánchez, A. Unravelling the modus-operandi of chromenylium-cyanine fluorescent probes: A case study. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2019**, *21* (28), pp. 15779-15786.
- **Flores-Cruz, R.**, Jiménez-Sánchez, A. Tracking mitochondrial $^1\text{O}_2$ -ROS production through a differential mitochondria-nucleoli fluorescent probe. *Chemical Communications* **2018**, *54* (99), pp. 13997-14000.

También se participó en otros proyectos y publicaciones relacionados.

- Trámite de Patente: Monitoreo de la viabilidad, proliferación y funciones celulares mediante ensayos únicos y de bajo costo. Jiménez-Sánchez, A. Bernal-Escalante, J. **Flores-Cruz R.** Solicitud: MX/a/2019/007725. Estatus: En proceso.
- Supervisor Técnico en el proyecto de tesis: “Síntesis y análisis de sondas fluorescentes para microscopía de imagen” para obtener el título de Licenciada en Química Farmacéutico-Biológica, presentada por Eva Guadalupe Palacios Serrato.
- Yoarhy A. Amador-Sánchez, Andrés Aguilar-Granda, **Ricardo Flores-Cruz**, Davir González-Calderón, Cynthia Orta, Braulio Rodríguez-Molina, Arturo Jiménez-Sánchez* and Luis D. Miranda. Multicomponent Diversity-Oriented Synthesis of Highly Fluorescent Fused-isoquinolines for Specific Subcellular Localization. *J. Org. Chem.* **2019**, *85* (2), pp 633-649.
- Pablo Labra-Vázquez, **Ricardo Flores-Cruz**, Aylin Galindo-Hernández, Justo Cabrera, Cristian Guzmán-Cedillo, Arturo Jiménez-Sánchez Pascal G. Lacroix, Rosa Santillan, Norberto Farfán and Rosario Núñez. Tuning the cell uptake and subcellular distribution in BODIPY-carboranyl dyads: An experimental and theoretical study. *Chem. Eur. J.* **2020**, Accepted manuscript DOI: 10.1002/chem.202002600

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviaturas y símbolos	Significado	Por sus siglas en inglés
ISC	Cruce Intersistemas	Intersystem crossing
IC	Conversión Interna	Internal conversion
Φ_{\square}	Rendimiento cuántico de fluorescencia	
Log P	Coefficiente de partición	
λ	Longitud de onda	
μ	Momento dipolar	
ICT	Transferencia de carga interna	Internal Charge Transfer
LE	Estado local	Locally Excited state
ρ	Anisotropía fundamental	
pK_a	Constante de acidez	
ϵ	Coefficiente de absortividad molar	
TCSPC	Conteo de fotones correlacionado en tiempo	Time-correlated single-photon counting
δ	Desplazamiento químico	
Ccy	Cromenilio cianina	Chromenylum Cyanine
FUC	Suma de frecuencias de fluorescencia	Fluorescence up-conversion
n	Índice de difracción	
ϵ_r	Constante de permitividad eléctrica	
η	Microviscosidad	
ϵ	Micropolaridad	
ROS	Especies reactivas de oxígeno	Reactive Oxygen Species
A.U.	Unidades de absorbancia	Absorbance Units
a.u.	Unidades arbitrarias	Arbitrary units
τ	Tiempo de vida de fluorescencia	
E	Energía	
ν	Frecuencia	
h	Constante de Planck	
QD	Puntos cuánticos	Quantum Dots
FP	Proteínas fluorescentes	Fluorescent Proteins
SOM	Moléculas orgánicas pequeñas	Small organic molecules
SOKR	Supresión a la regla de Kasha	Suppression of Kasha's Rule
Hpf	Horas <i>post</i> fecundación	
PC	Coefficiente de Pearson	Pearson's Coefficient

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	iv
1. ABSTRACT.....	1
2. RESUMEN.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1 Fluorescencia.....	5
4. ANTECEDENTES.....	10
4.1 Clasificación de los compuestos fluorescentes	10
4.2 Moléculas con localización celular-organelar	12
4.2.1 Mitocondria.....	14
4.3 Método ratiométrico o medida de proporción.	16
4.4 Sondas para micropolaridad	17
4.5 Sondas para microviscosidad	19
4.6 Sondas para especies reactivas de oxígeno ROS.....	22
4.7 Citometría de flujo.....	23
4.8 Modelos biológicos.....	25
4.9 Espectroscopía de fluorescencia resuelta en tiempo.....	27
5. Hipótesis y objetivos	30
5.1 Hipótesis	30
5.2 Objetivo principal.....	30
5.3 Objetivos particulares.....	30
6. Metodología.....	31
6.1 Diseño.....	31
6.2 Síntesis	32
6.3 Caracterización	35

6.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución	35
6.3.2 RMN de ^1H y ^{13}C	35
6.3.3 Espectrometría de masas.....	35
6.3.4 Espectroscopía UV-vis y de fluorescencia.....	36
6.3.5 Microscopía confocal.....	38
6.3.6 Citometría de flujo	39
6.3.7 Estudios <i>in vivo</i> con el modelo pez cebra	40
6.3.8 Fluorescencia resuelta en tiempo.....	40
Conteo de fotones individuales con correlación de tiempo	40
Emisión ultrarrápida resuelta en el tiempo.....	41
6.3.9 Estudios computacionales.....	41
7. Resultados.....	42
7.1 Diseño.....	42
7.2 RMN ^1H y ^{13}C	42
7.3. Espectrometría de masas de alta resolución.....	54
7.4 Caracterización fotofísica	58
7.4.1 Determinación de constantes de acidez pK_a	58
7.4.2 Pruebas de polaridad	64
7.4.3 Pruebas de viscosidad	67
7.4.4 Sensibilidad a especies reactivas de oxígeno.	70
7.4.5 Rendimientos cuánticos de fluorescencia.....	76
7.5 Microscopía confocal	78
7.6 Citometría de Flujo.....	82
8. Funcionamiento de la sonda CC334	88
8.1. Fluorescencia resuelta en tiempo.....	88
8.1.1 Conteo de fotones individuales con correlación de tiempo	88
8.1.2.....	90
Suma de frecuencias transitorias	90

8.3 Experimentos <i>in vivo</i> con <i>Danio rerio</i>	91
8.4 Metodología computacional	96
9. CONCLUSIONES	97
10. APÉNDICES	99
1.- Ajuste para determinación de pK_a por absorción.....	99
2.- Ajuste para determinación de pK_a por fluorescencia.....	99
3.- Espectros de Absorción y emisión para los compuestos a) y b) de la síntesis	99
4.- Estudio solvatocrómico para la sonda CCy (1) análisis de Catalán ^{25,55}	99
5.- Espectros de RMN de protón para la titulación de la sonda CCy (1) con 1O_2	101
6.- Mecanismos de reacción CCy (1). Cicloadición 2-2, 2-4 y ene-adición ^{56,57}	102
7.- Mecanismo de reacción CCy (2). Epoxidación nucleofílica asimétrica con H_2O_2 ⁵⁸	
.....	102
Mecanismo de reacción CCy (2). Epoxidación nucleofílica asimétrica con $NaClO$ ⁵⁸ .	103
8.- Ejemplo de colocación de la sonda CCy (6) con TMRM (Tetramethylrhodamine)	
.....	103
9.- Despolarización de la membrana mitocondrial con CCCP, sonda CCy (3).....	104
10. Biblioografía.....	105
Publicaciones.....	109

1. ABSTRACT

In this project, a family of organic compounds with modular fluorescent properties were synthesized to be used as molecular probes in the measurement of chemical and physicochemical parameters in the mitochondrial membrane. The change in fluorescence emission according to their different chemical properties was the tool that helped to calibrate the changes in the properties of medium or in some cases, to be able to measure the concentration of an analyte. The family of fluorescent compounds synthesized are known as chromenilium-cyanines (CCy).

In general, CCy molecules presented dual fluorescence emission, with low to moderate fluorescence quantum yields ($\Phi_f = 0.03 - 0.54$). The molecules were lipophilic with partition coefficient values $\log P$ between -0.19 and 0.56. The probes presented acid-base equilibria that resulted in the formation of three different species, which had dissimilar fluorescence intensities according to their structural change. A similar solvatochromic behavior was observed between them when tested in different media, with a notable difference between protic and non-protic solvents. Fluorescence changes of the probes were studied with changes in the media properties like acidity, polarity, viscosity and oxidation sensitivity with some reactive oxygen species.

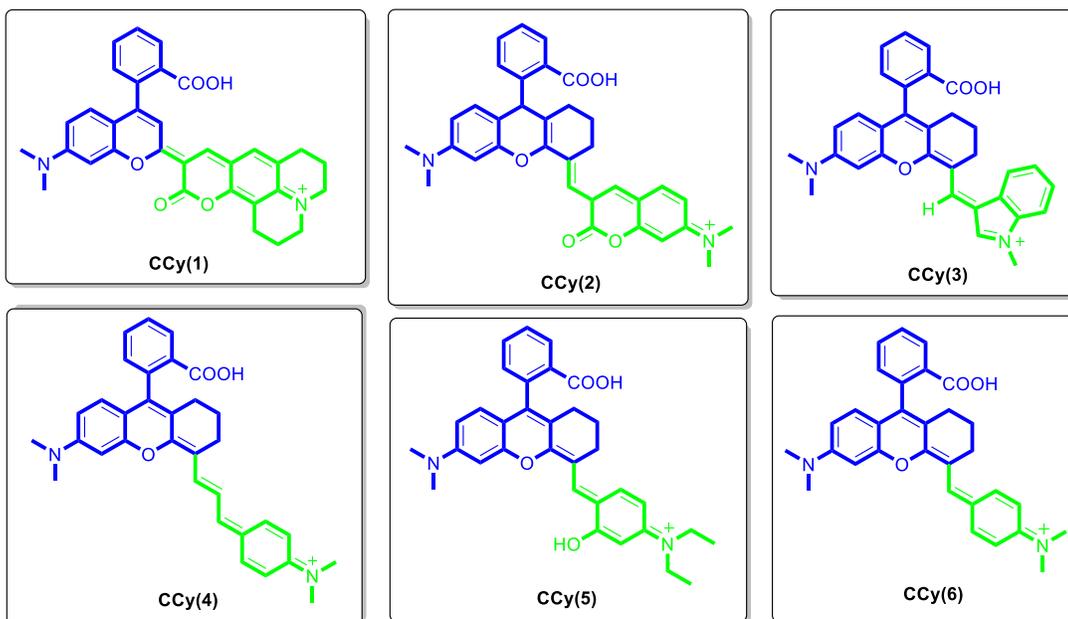
After carrying out the calibration of the fluorescence changes and determining the possible *ex situ* interference, the corresponding studies were carried out in cell cultures, for which HeLa and SK-LU1 cell types were used. The molecules mainly presented mitochondrial membrane localization, because in their acidic form have a positive charge, which interacts with the negative mitochondrial membrane potential (-180 mV), also thanks to its lipophilicity that allows it to permeate through the plasmatic membrane. This was corroborated with colocalization studies with commercial fluorescent markers used as standards. A minimum cytotoxicity was observed in cell culture studies, for all molecules an IC_{50} over 100 μ M was obtained.

In the case of the probe called **CCy (1)**, it was possible to perform some ultrafast fluorescence studies and combine it with some *in vivo* studies with the biological model, zebrafish. From the studies of time-resolved fluorescence it was possible to elucidate the different photophysical processes that govern the molecule, among which it was possible to identify, a charge transfer process and a Kasha's rule suppression, depending on the medium. While *in vivo*

studies with the zebrafish, it was possible to observe a similar behavior to that described in the studies carried out in cell cultures, demonstrating the same functioning of the probe in a more complex system. Finally, flow cytometry studies allowed a statistical analysis of cell sets and generated more robust results for the analytical part of the stimulus-response type with different analytes.

In this way, the project contributed to the generation of small organic molecules that can work as fluorescent probes in various biological systems. The project also helps to elucidate the different photophysical processes that this type of molecules can present and, above all, demonstrates that sometimes the analytical interpretation should not be taken obvious since it is necessary to try to avoid any type of interference. Finally, other properties of the molecules could be explored, for example, to study the possibility of generating fluorescent blinking with these molecules, to perform super-resolution microscopy studies. Another possible interest would be the implementation of *in vivo* studies in more complex biological systems, taking advantage of the near-infrared emission that some molecules presented. It would also be interesting to be able to do comparative studies with FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging microscopy) and obtain more information on real-time fluorescence monitoring of probe lifetimes in cells.

Synthesized structures in this work



2. RESUMEN

En el presente proyecto se sintetizó una familia de compuestos orgánicos con propiedades fluorescentes modulables, para ser utilizados como sondas moleculares en la medición de parámetros químicos y fisicoquímicos en membrana mitocondrial. El cambio en la emisión de fluorescencia que presentan las moléculas según sus diferentes propiedades químicas fue la herramienta que ayudó a calibrar la variación en las propiedades del medio o en algunos casos, poder medir la concentración de un analito. A la familia de compuestos fluorescentes sintetizada se les conocen como cromenilios-cianinas (**CCy**).

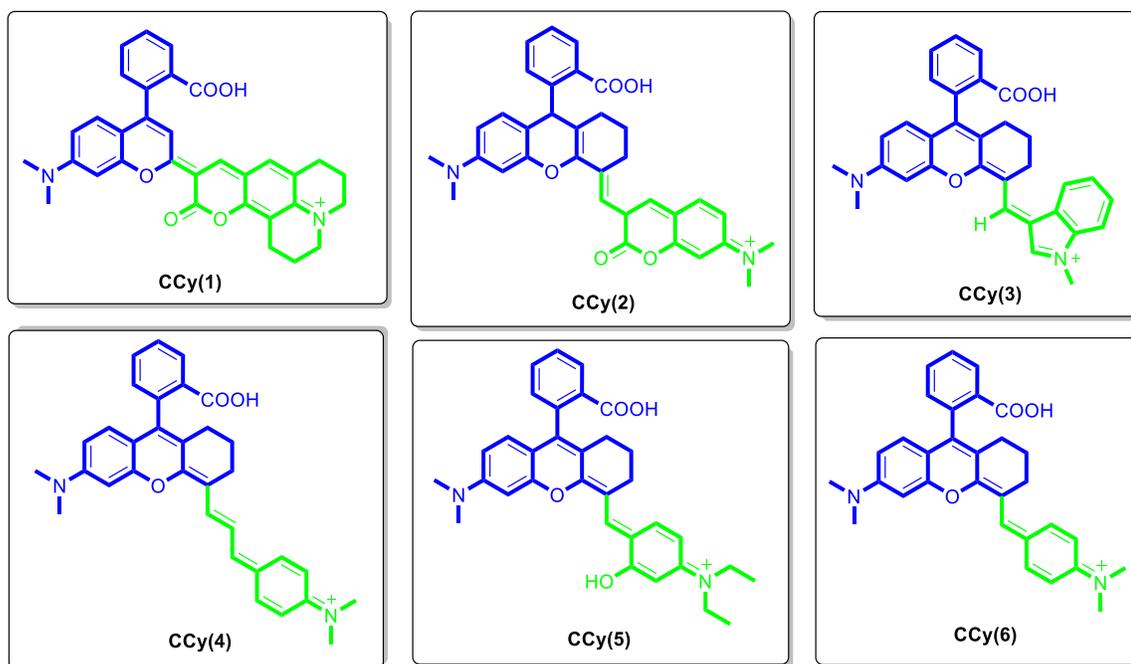
En general las moléculas presentaron emisión de fluorescencia dual, con valores de rendimientos cuánticos de fluorescencia de bajos a moderados ($\Phi_f = 0.03 - 0.54$). Las moléculas fueron lipofílicas con valores de coeficientes de partición entre -0.19 y 0.56. Las sondas presentaron equilibrios ácido-base que daban lugar a la formación de tres diferentes especies, que tenían intensidades disímiles de fluorescencia según su cambio estructural. Se observó un comportamiento solvatocrómico similar entre las sondas cuando se encontraban en diferentes medios, con una diferencia notable entre los disolventes próticos y no próticos. Se estudió la dependencia de las sondas con los cambios en acidez, polaridad, viscosidad y la sensibilidad a la oxidación con algunas especies reactivas de oxígeno.

Después de realizar la calibración de los cambios de fluorescencia y de determinar las posibles interferencias *ex situ*, se realizaron los correspondientes estudios en cultivos celulares, para lo que se utilizaron células tipo HeLa y SK-LU1. Las moléculas presentaron localización en membrana mitocondrial principalmente, debido a que en su forma ácida presentan carga positiva, la cual interactúa con el potencial negativo de la membrana mitocondrial (-180 mV) y también gracias a su lipofilicidad que le permite permear a través de la membrana plasmática. Lo anterior se corroboró con estudios de colocalización con marcadores fluorescentes comerciales utilizados como estándar. En los estudios en cultivos celulares se observó una mínima citotoxicidad, para todas las moléculas se obtuvo un IC_{50} mayor a 100 mM.

Para el caso de la sonda denominada **CCy (1)**, fue posible realizar algunos estudios de fluorescencia ultrarrápida y compaginarlo con algunos estudios *in vivo* en el modelo biológico, pez cebra. De los estudios de fluorescencia resuelta en tiempo fue posible elucidar los diferentes

procesos fotofísicos que rigen a la molécula, entre los que se pudieron identificar, un proceso de transferencia de carga y un proceso de supresión a la regla de Kasha, dependiendo del medio en el que se encontraba. Mientras que en los estudios *in vivo* con el pez cebra, fue posible observar un comportamiento similar a lo descrito en los estudios realizados en los cultivos celulares, demostrando el mismo funcionamiento de la sonda en un sistema más complejo. Finalmente, los estudios de citometría de flujo permitieron realizar un análisis estadístico de conjuntos de células y generar resultados más robustos para la parte analítica del tipo estímulo-respuesta con diferentes analitos.

De esta forma el proyecto contribuyó a la generación de moléculas orgánicas pequeñas que pueden servir como sondas fluorescentes en diversos sistemas biológicos. También el proyecto ayuda a elucidar los diferentes procesos fotofísicos que pueden presentar este tipo de moléculas y sobre todo demostrar que en ocasiones la interpretación analítica, no debiera de ser tomada a la ligera ya que es necesario tratar de evitar cualquier tipo de interferencia. Por último, para las sondas se podrían seguir explorando otras propiedades de las moléculas, por ejemplo, estudiar la posibilidad de generar el parpadeo fluorescente con estas sondas, para realizar estudios de microscopía de súper resolución. Otro posible interés sería en la implementación de estudios *in vivo* en otros sistemas biológicos más complejos, aprovechando la emisión en el infrarrojo cercano, que algunas moléculas presentaron. También sería interesante poder hacer estudios comparativos con microscopía FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) y obtener una mayor información de los tiempos de vida de fluorescencia en tiempo real en células.



3. INTRODUCCIÓN

3.1 Fluorescencia

La *fluorescencia* es un proceso de relajación electrónica de forma radiativa que presenta una sustancia que se encuentra en un *estado excitado* (S_n) la cual mediante una transición electrónica pasa a un estado de menor energía, formalmente a su estado basal o a su *estado fundamental* (S_0) y esto sucede con retención de la multiplicidad del spin electrónico. Para ello es necesario primeramente que la estructura electrónica de dicha sustancia haya sido promovida a un estado energético excitado mediante la absorción de energía cuantizada en forma de luz. De tal forma que los procesos se pueden representar como: *excitación*-($S_0 + h\nu \rightarrow S_1$) y el proceso de *emisión*-($S_1 \rightarrow S_0 + h\nu + \Delta$), donde $h\nu$ es el término genérico para representar la energía del fotón; h es la constante de Planck, ν es la frecuencia de la luz y Δ es energía en forma de calor. Además de la fluorescencia existen otros procesos de relajación electrónica, los cuales pueden competir entre ellos si se encuentran en escala de tiempo cercana al tiempo de vida del estado excitado de la sustancia^{1,2}. Los principales procesos de relajación electrónica se presentan en el esquema de la **Figura 3.1.1**. Dichos procesos son en su mayoría no radiativos con excepción de la fluorescencia y la fosforescencia, aunque algunos pueden dar como resultado “fluorescencia no primaria”. En la **Figura 3.1.2** se enlistan algunos procesos y los intervalos de tiempo en los que pueden ocurrir.

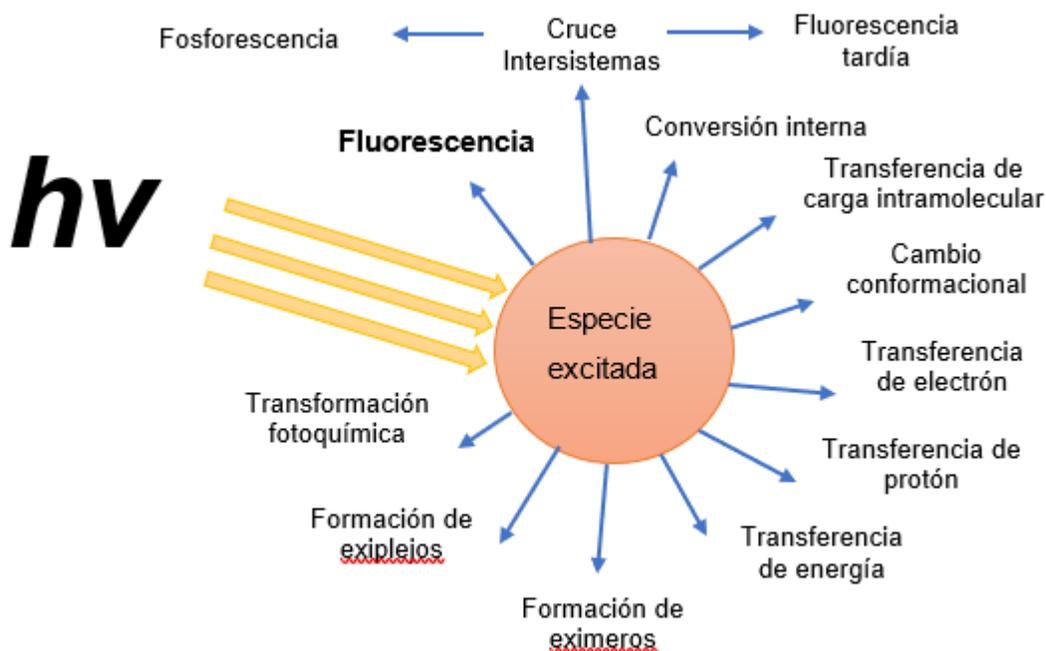


Figura 3.1.1 Esquema de los procesos de relajación para moléculas en estado excitado¹.

<u>Intervalo de tiempo del proceso</u>	
Absorción	10^{-15} s
Relajación vibracional	10^{-12} - 10^{-10} s
Fluorescencia	10^{-10} - 10^{-7} s
Cruce intersistemas	10^{-10} - 10^{-8} s
Conversión interna	10^{-11} - 10^{-9} s
Fosforescencia	10^{-6} - 1 s

Figura 3.1.2 Lista de algunos procesos de relajación electrónica y los intervalos de tiempo¹.

Un exímero es un dímero (especie química que consiste en dos subunidades estructuralmente similares denominadas monómeros unidas por algún tipo de interacción química) de corta vida homodimérica es decir que está formada por dos especies de la misma estructura química, donde al menos una de ellas se encuentra en un estado electrónico excitado, mientras que un excíplejo es un dímero heterodimérico, es decir, donde las dos especies de diferentes estructura química pero al menos una de ellas se encuentra en estado excitado.

Una forma fácil de visualizar los procesos de relajación electrónica es mediante los diagramas de Perrin y Jablonski donde representan las transiciones electrónicas de las moléculas entre los diferentes niveles energéticos y vibroelectrónicos. En la **Figura 3.1.3** se presenta un diagrama de Jablonski simplificado donde se representan procesos de absorción, fluorescencia, fosforescencia, cruce intersistemas, conversión interna y relajación vibracional. Se utilizan flechas que representan procesos que siguen el principio de Franck-Condon, el cual básicamente considera que los procesos ocurren a una velocidad en que las coordenadas nucleares no cambian y por tanto cumple con un proceso *adiabático* (cambio rápido que evita que el sistema se adapte durante el proceso); mientras que las flechas punteadas representan procesos en los cuales hay un cambio en la posición del núcleo (proceso *diabático*). Las líneas horizontales gruesas representan los niveles energéticos y las líneas delgadas representan los niveles vibroelectrónicos.

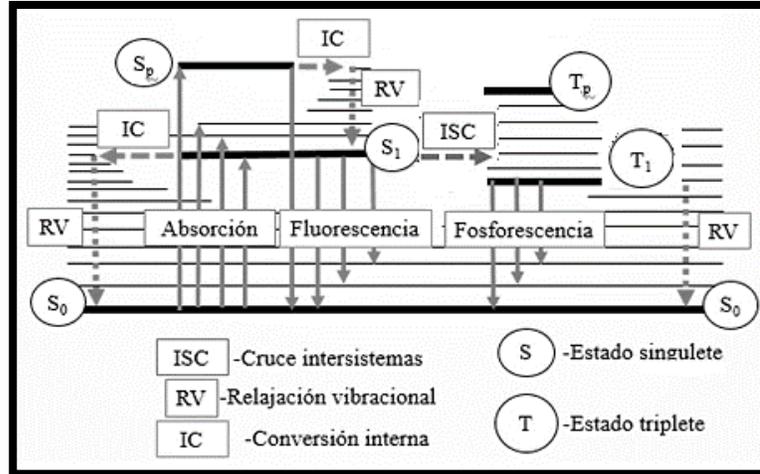


Figura 3.1.3 Diagrama de Perrin-Jablonski simplificado de algunos procesos fotofísicos como: absorción, fluorescencia, fosforescencia, conversión interna, cruce intersistemas y relajación vibracional¹.

La mayoría de las moléculas fluorescentes presentan espectros de absorción y emisión en forma de bandas anchas, eso se debe a que cada estado electrónico consiste en una variedad continua de niveles vibroelectrónicos a los que el electrón puede acceder (**Figura 3.1.4**). De acuerdo con la *regla de Stokes* la emisión debe ser mayor a la longitud de onda de absorción, lo que implica que la longitud de onda de fluorescencia siempre es de menor energía que la longitud de onda de absorción. En ocasiones el espectro de emisión y absorción pueden traslaparse, esto se explica porque a temperatura ambiente una fracción de las moléculas se encuentra en estados vibroelectrónicos más altos que el estado basal-fundamental (de acuerdo con la distribución de Boltzmann). Por lo general los niveles vibracionales son similares tanto en el estado electrónico basal como en el estado excitado, por lo que el espectro de emisión se asemeja al espectro de absorción y a esto se le conoce como regla de *imagen en el espejo*. Asimismo, a la diferencia entre el máximo de emisión y absorción en los correspondientes espectros, se le denomina como *desplazamiento de Stokes*^{1,2}.

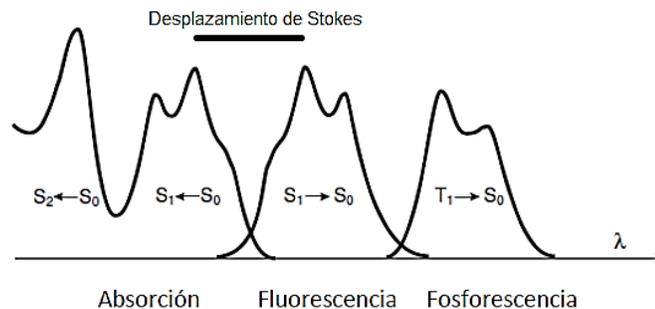


Figura 3.1.4 Representación de espectros de absorción, emisión de fluorescencia y fosforescencia¹. Las flechas indican la transición de un nivel vibroelectrónico a otro.

La emisión del fotón es casi tan rápida como la absorción del fotón, sin embargo, la especie puede permanecer en el estado excitado (S_n) por cierto tiempo, que va del orden de decenas de picosegundos a cientos de nanosegundos antes de emitir el fotón. A ese tiempo en que el fluoróforo se encuentra en estado excitado antes de emitir el fotón, se le conoce como *tiempo de vida de fluorescencia* (τ). El tiempo de vida de fluorescencia presenta una cinética de decaimiento similar al decaimiento radiactivo, es decir, de forma exponencial. Otro concepto importante es la *anisotropía de fluorescencia* (r), es decir, que un fluoróforo posee diferentes intensidades en diferentes ejes de polarización. El proceso de excitación y relajación involucra la redistribución de electrones en la molécula. Sin embargo, la excitación va a producirse primordialmente si el campo eléctrico de la luz se encuentra orientado en un eje de polarización particular con respecto a la molécula. De igual forma, el fotón emitido también posee un plano de polarización particular en relación con la molécula. Los fluoróforos tienen más probabilidades de ser excitados por los fotones si el momento de transición del fluoróforo es paralelo al vector eléctrico del fotón. El momento de transición representa al dipolo transitorio resultante del desplazamiento de cargas durante la transición y se puede figurar como un vector en un sistema de coordenadas definido por la localización de los núcleos de los átomos del fluoróforo. Ese momento de transición depende de la orientación física del fluoróforo y la polarización de la luz emitida también dependerá del momento de transición. Para los fluoróforos en disolución, esto significa que la intensidad y la polarización de la luz emitida dependen de la difusión rotacional (de acuerdo con la Ley de Stokes o ley de arrastre en dinámica de fluidos). Por lo tanto, las mediciones de anisotropía se pueden usar para investigar qué tan libremente se mueve una molécula fluorescente en un entorno particular y como afecta el cambio de estructura en el estado basal y excitado a la fluorescencia. Finalmente, otro concepto importante es el *rendimiento cuántico de fluorescencia* (Φ), que es la eficiencia del proceso de emisión, es decir, la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos ($\Phi = \text{fotones emitidos} / \text{fotones absorbidos}$), de tal forma que el máximo de eficiencia es 1.

En lo que respecta a las aplicaciones de la fluorescencia, ésta se ha implementado en la investigación biológica y analítica debido a la sensibilidad de la técnica. Un ejemplo muy importante es que, con las técnicas actuales de microscopía de súper resolución se ha logrado romper la barrera del límite de difracción de la microscopía óptica convencional y de esta forma se han logrado detectar emisiones de moléculas “únicas”. De igual forma, durante las últimas décadas los avances en la química de fluoróforos ha permitido el desarrollo de compuestos con diversas aplicaciones principalmente para el área de investigación biológica de imagen. Se han generado moléculas con emisión dual para implementar el método ratiométrico y obtener mediciones más confiables de

diferentes parámetros. Se han desarrollado compuestos con emisiones en el infrarrojo cercano para evitar la fototoxicidad generada al excitar en longitudes de onda del ultravioleta. También se han mejorado propiedades de los fluoróforos como el rendimiento cuántico de fluorescencia, la sensibilidad, la localización específica, la solubilidad y la selectividad para la detección de ciertos analitos, por lo que existe una plétora de fluoróforos descritos en la literatura. En la siguiente sección se discuten algunos de los trabajos más representativos en el área de química de fluoróforos y su uso como sondas moleculares en la detección de parámetros químicos y fisicoquímicos, aplicados a sistemas biológicos^{2,3}.

4. ANTECEDENTES

4.1 Clasificación de los compuestos fluorescentes

Los compuestos fluorescentes se pueden clasificar según su tamaño en: moléculas orgánicas pequeñas (<2 nm), proteínas fluorescentes (>2 nm) y nanopartículas (>5 nm). Aunque la principal aplicación de los compuestos fluorescentes es para realizar estudios de bioimagen, es decir, observar sistemas biológicos como células y organismos subcelulares, existe también una amplia aplicación analítica sin relación biológica. La enorme selección de fluoróforos ofrece una mayor sensibilidad y especificidad de emisión, variaciones estructurales y rendimientos cuánticos de fluorescencia con diversas aplicaciones en la investigación biológica³. En la **Figura 4.1.1** se esquematizan la clasificación de los compuestos fluorescentes y en la **Tabla 4.1.1** se presentan algunas características generales de forma comparativa entre los tipos de fluoróforos.

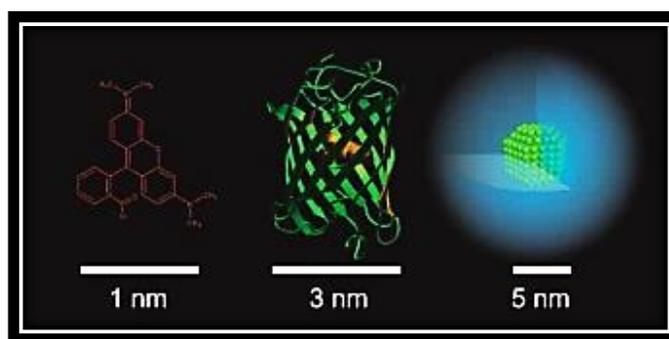


Figura 4.1.1 Clasificación de fluoróforos en moléculas orgánicas pequeñas, macromoléculas y nanopartículas.

Tabla 4.1.1 Propiedades generales de los compuestos fluorescentes⁴.

Fluoróforo	Tamaños	Brillo	Fotoestabilidad	Localización Cellular- organelar	Citotoxicidad	Modificación
Nanopartículas	> 5 nm	✓✓ ✓	✓✓✓	✓	Baja-Media	Difícil
Proteínas fluorescentes	2-5 nm	✓✓	✓✓✓	✓✓✓	Baja-Media	Difícil
Moléculas orgánicas pequeñas	< 2 nm	✓✓ ✓	✓✓	✓✓	Media- Alta	Fácil

Las nanopartículas fluorescentes, también llamados puntos cuánticos (QD) fueron desarrollados en la década de 1980 y desde entonces se ha intentado dar aplicaciones en diversos estudios de bioimagen. Los puntos cuánticos son semiconductores de tamaños nanométricos (>5 nm) que, cuando se excitan, emiten fluorescencia a una longitud de onda basada en el tamaño y en

la geometría de la partícula. En general los QDs más pequeños emiten a mayor energía que los grandes, por ello es posible controlar con la variación del tamaño la región del espectro que se requiere que emita. Es necesario conjugarlos con biomoléculas para dirigir su localización en las células, por ello se suelen hacer conjugados con anticuerpos u otras biomoléculas. Una de las principales ventajas de los puntos cuánticos es que son más fotoestables que otros fluoróforos, algunos permaneciendo fluorescentes hasta por tres meses en un estudio de imagen *in vivo*⁵. Si bien el uso de las nanopartículas en aplicaciones biológicas está aumentando, hay informes de toxicidad celular en respuesta a la descomposición de dichas nanopartículas^{5,6}.

Por otro lado, las proteínas fluorescentes (xFP) con aplicaciones en bioimagen se comenzaron a utilizar en la década de 1990, con la proteína verde fluorescente (GFP) que se clonó a partir de la medusa *Aequorea victoria* y se usó como indicador de expresión génica⁷. Desde entonces se han desarrollado derivados de la GFP original, las ficobiliproteínas, la ficocianina, la ficoeritrina, entre muchas otras, que se han diseñado para su uso en sistemas de expresión biológica. El beneficio de estos tipos de fluoróforos es que los plásmidos de expresión se pueden introducir en bacterias, células, órganos u organismos completos, para impulsar la expresión de ese fluoróforo solo o fusionado a una proteína de interés en el contexto de los procesos biológicos estudiados. El uso de xFP requiere de mucho tiempo en su conjugación y técnicas complejas. Además, el tamaño de la proteína fluorescente (> 2nm) puede cambiar la función biológica normal de la proteína celular a la que se fusiona el fluoróforo, asimismo por lo general no proporcionan el nivel de fotoestabilidad y sensibilidad que ofrecen las moléculas orgánicas pequeñas.

Las moléculas orgánicas pequeñas (SOM) fueron los primeros compuestos utilizados en la investigación biológica. Se ha buscado mejorar su fotoestabilidad, sensibilidad, solubilidad, sobre todo se han buscado derivatizar para su uso en bioconjugación. El pequeño tamaño de estos fluoróforos (<2 nm) es un beneficio sobre los otros tipos de fluoróforos, sobre todo para las estrategias de bioconjugación porque pueden ser reticulados a macromoléculas como anticuerpos, proteínas, péptidos, oligómeros, entre otras, esto con una mínima interferencia de la función biológica. Existe una amplia variedad de colorantes fluorescentes con espectros de excitación y emisión característicos, con rendimientos cuánticos y coeficientes de extinción molar (parámetro que definen cuán fuertemente una sustancia absorbe la luz a una longitud de onda dada) óptimos que están disponibles comercialmente para cualquier aplicación en ensayos biológicos. En resumen, las moléculas orgánicas han sido predilectas en la investigación de bioimagen debido principalmente a que su funcionalización es relativamente fácil, mientras que las proteínas requieren regularmente de anticuerpos primarios y secundarios lo que lo hace una técnica más costosa y con

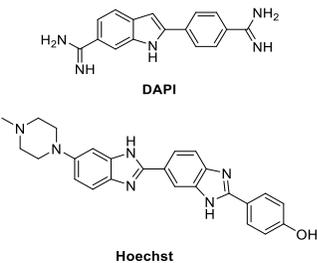
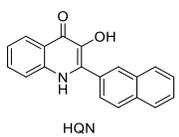
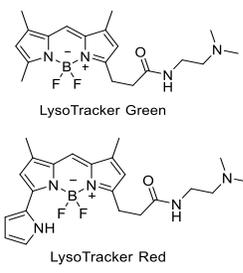
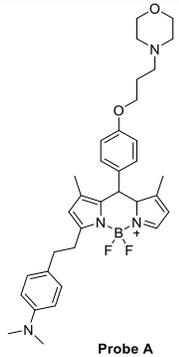
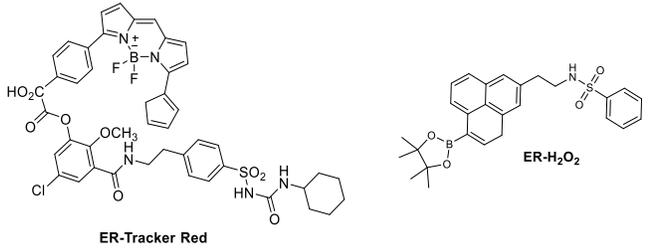
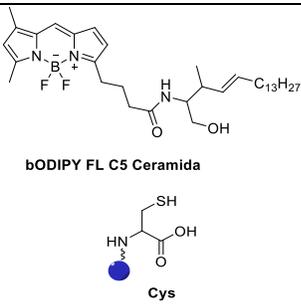
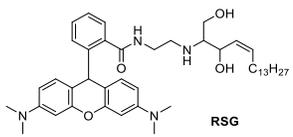
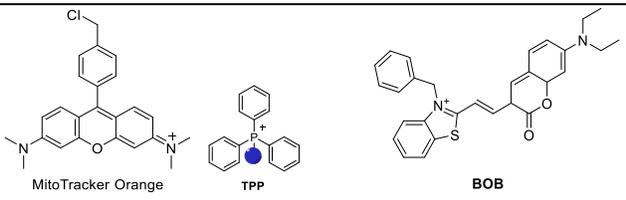
mayores requerimientos técnicos. Por otro lado, funcionalizar nanopartículas también es complicado, además que estas presentan un alto grado de citotoxicidad, por tales razones las moléculas orgánicas pequeñas son elegidas para diversas aplicaciones⁸.

4.2 Moléculas con localización celular-organelar

Al mismo tiempo existe una subclasificación entre fluoróforos de localización celular-organelar específica, hay marcadores y sondas fluorescentes. La principal diferencia entre una sonda y un marcador fluorescente está en su estructura química. Una sonda fluorescente está formada por tres fragmentos distinguibles en su estructura: un fragmento de anclaje, un fragmento responsable de la fluorescencia y un fragmento de reconocimiento⁹. Mientras que el marcador fluorescente solo está constituido por el fragmento de anclaje y el fragmento fluorescente. En la actualidad existen elaborados diseños para obtener fluoróforos con localización organelar específica. Entre los fragmentos de anclaje, que son los responsables de localizarse específicamente en un sitio o región de la célula u organelo, se han utilizado biomoléculas desde anticuerpos, péptidos, oligómeros etc., hasta grupos funcionales químicos más sencillos que pueden tener interacciones covalentes o no covalentes con alguna región o sitio de la célula en específico. El fragmento fluorescente es la región con conjugación y deslocalización de electrones π . En cuanto a los fragmentos de reconocimiento, son los que presentan la sensibilidad analítica calibrable y puede ser de muchos tipos dependiendo de la propiedad de interés que se quiera medir. A groso modo el fragmento de reconocimiento va a generar cambios en la fluorescencia y al poder medir los cambios de fluorescencia en función del cambio de una propiedad específica, se puede calibrar la respuesta. Medir una propiedad en una región particular, en un medio heterogéneo como lo es la célula ayuda a correlacionar la respuesta con el estatus dinámico en el que se encuentra la célula u organelo. Entre los parámetros que se han determinado que pueden influir en la emisión se encuentran la polaridad, la viscosidad, la temperatura, el potencial eléctrico, el pH, entre otras¹. Otra característica que puede diferenciar a un marcador de una sonda fluorescente es que, en general los marcadores fluorescentes tienen mayor rendimiento de fluorescencia, debido a que presentan menos canales de desactivación dado que interactúan en menor medida con su entorno, contrario a una sonda que “sacrifica” rendimiento de fluorescencia por sensibilidad analítica. A continuación, en la **Tabla 4.2.1** se muestran ejemplos de marcadores y sondas fluorescentes del tipo SOM y se resumen las principales estrategias químicas para funcionalizar un fluoróforo. Sin duda entre los organelos más estudiados con sondas fluorescentes debido a su importancia es la mitocondria, ya que es el organelo con la mayor dinámica de movimiento y estructura que se adapta según los procesos metabólicos de la célula. Presenta procesos como la fusión, la fisión, la

reorganización y el crecimiento, los cuales están gobernados por el metabolismo celular en la síntesis del ATP, en la respiración celular y en la apoptosis por mencionar algunos ejemplos.

Tabla 4.2.1 Ejemplos de marcadores y sondas fluorescentes. Estrategias de marcaje químico.

Organelo	Estrategia	Marcador	Sonda
Núcleo Contiene y protege al material genético (ADN) de las células eucariotas.	Moléculas planas, neutras, lipofílicas que se puedan intercalar en el ADN.	 <p>DAPI</p> <p>Hoechst</p>	 <p>HQN</p>
Lisosoma Compartimento digestivo que se encargan de la eliminación de algunas sustancias, microambiente ácido.	Aminas lipofílicas. Las más usadas 4-(2-hidroxiethyl)morfolina y la N,N'-Dimetil-1,2-etandiamina.	 <p>LysoTracker Green</p> <p>LysoTracker Red</p>	 <p>Probe A</p>
Retículo endoplasmático. Controla el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Señalización de calcio.	Moléculas anfifílicas. Fragmentos más empleado la p-toluensulfonamida y la glibenclamida	 <p>ER-Tracker Red</p> <p>ER-H₂O₂</p>	
Aparato de Golgi Compartimento para la modificación, almacenaje y transporte de lípidos, carbohidratos y proteínas.	Se suele recurrir a estrategias proteicas y anticuerpos. Moléculas con fragmento de cisteína	 <p>BODIPY FL C5 Ceramida</p> <p>Cys</p>	 <p>RSG</p>
Mitocondria Regula la energética celular, participa en la respiración celular y en la apoptosis.	Moléculas lipofílicas con carga positiva. Grupos como el TPP, piridinas y quinolinas cargadas.	 <p>MitoTracker Orange</p> <p>TPP</p> <p>BOB</p>	

4.2.1 Mitocondria

Una de las teorías del origen de la mitocondria, es que los antecesores de las células eucariotas entraron en una simbiosis con los antecesores de la hoy conocida bacteria púrpura, hace aproximadamente dos mil millones de años, lo que permitió explotar la energética de la atmosfera de oxígeno emergente, el cual era tóxico para la mayoría de las otras formas de vida. Eso llevó finalmente a una endosimbiosis de la célula y la bacteria para generar las primeras células eucariotas. La mitocondria en las células eucariotas actuales son las encargadas de suministrar la mayor parte de la energía en forma de moléculas de ATP. Participan en la respiración celular con la cadena transportadora de electrones. También regula el proceso de apoptosis liberando agentes que orquestan la muerte celular programada y participa en proceso de autofagia en la célula. Al tener ADN, ribosomas, y proteínas necesarias para la replicación, transcripción y traducción se considera un organismo semiautónomo, ya que tiene cierta dependencia del núcleo. La morfología de la mitocondria suele cambiar dependiendo del metabolismo de la célula, pero se puede describir como estructuras plásticas en forma filamentosa, donde su tamaño oscila entre 0.5 y 1 μm de diámetro y hasta 8 μm de longitud. También existen mitocondrias en forma de “dona” o esféricas, a este tipo de estructuras se les relaciona con los procesos de estrés oxidativo. El número depende de las necesidades energéticas de la célula y éstas suelen formar una red interconectada para estar comunicadas entre ellas y otros organelos¹⁰⁻¹².

Las mitocondrias están formadas por dos membranas diferentes en estructura y sus funciones. La membrana externa es una bicapa lipídica, que separa al citosol del espacio intermembranal, es permeable a iones, metabolitos y muchos polipéptidos, debido a que contiene proteínas que forman poros, que permiten el paso de grandes moléculas de hasta 5,000 Dalton y un diámetro aproximado de 20 Å. Contiene aproximadamente un 60% de proteínas y un 40% de lípidos, principalmente colesterol y fosfolípidos. Posteriormente se encuentra el espacio intermembranal, el cual tiene un contenido similar al hialoplasma, donde hay algunas enzimas adenil quinasa, que transfieren energía del ATP a los nucleótidos. En seguida está presente la membrana interna, replegada hacia el interior formando crestas, está constituida por un 20% de lípidos (no posee colesterol) y un 80% de proteínas, es impermeable a la mayoría de los iones. La membrana interna contiene enzimas del tipo ATP sintetasa y permeasas entre otras. Luego se encuentra la cámara interna o matriz mitocondrial donde se halla el ADN mitocondrial, los ribosomas y proteínas importantes en la replicación, transcripción y traducción de ADN, además de otras proteínas relacionadas a la apoptosis y a la autofagia^{10,13}. En la **Figura 4.2.1** se observa el esquema de la estructura ilustrativa de una mitocondria.

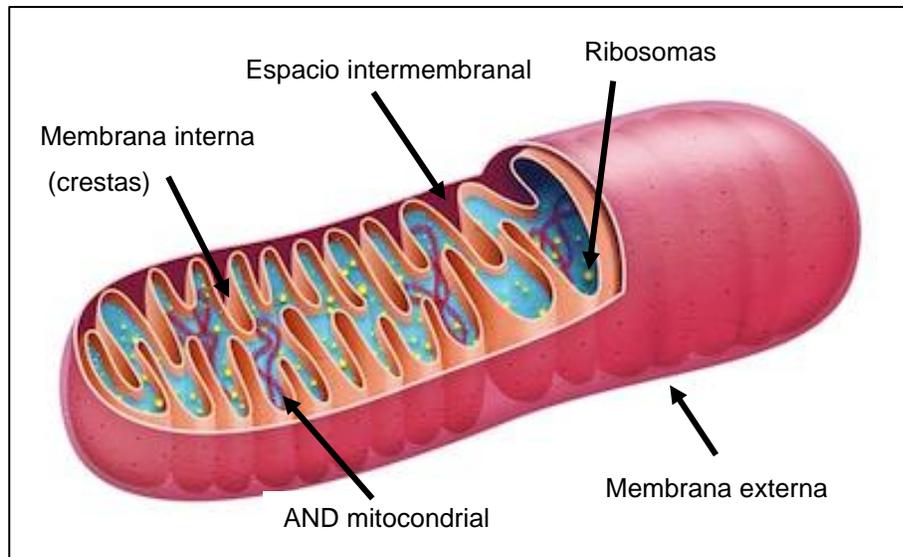


Figura 4.2.1 Esquema de la estructura ilustrativa mitocondrial.

Las fallas en los procesos metabólicos de la mitocondria están relacionadas con muchas enfermedades del tipo neurodegenerativas, inflamatorias, cardíacas y con el cáncer, es por ello del amplio interés de su estudio metabólico y dinámico. En la actualidad se han desarrollado sondas fluorescentes para detección de propiedades químicas y fisicoquímicas en mitocondria. Pero además con las sondas fluorescentes se puede seguir los cambios en la morfología estructural de la mitocondria en procesos como el estrés oxidativo. La mitocondria es la principal generadora de ROS como subproductos de la fosforilación oxidativa. La sobreproducción de las especies reactivas de oxígeno tiene como consecuencia la oxidación de las biomoléculas (lípidos, proteínas y material genético), lo que provocan cambios considerables en el microambiente que en homeostasis se encuentra heterogéneamente estructurado, pero al oxidarse estas biomoléculas generan cambios importantes en la micropolaridad, microviscosidad y cambios en la estructura morfológica. Principalmente se han reportado disminución en la micropolaridad en mitocondria con células bajo estrés oxidativo en comparación de células sanas. De igual forma se han reportado que en células cancerígenas la polaridad en las mitocondrias suele ser menor que en las sanas. Mientras que la viscosidad aumenta debido a que las membranas lipídicas se rompen dejando de estar confinadas y formando estructuras más pequeñas, eso ocurre en células con estrés oxidativo. También se ha observado que las mitocondrias bajo estrés se fisionan hasta formar gránulos pequeños esféricos, esto para facilitar la mitofagia. En la siguiente sección se presentan una serie de sondas moleculares diseñadas para medir diferentes propiedades en mitocondria, donde la localización es lograda principalmente por interacción electrostática de la sonda con el potencial negativo (-180 mV) de la mitocondria^{10,12-16}.

4.3 Método ratiométrico o medida de proporción.

En fluorescencia las moléculas con propiedades ratiométricas presentan dos o más bandas de emisión a diferentes longitudes de onda, sensibles a los cambios de intensidad de fluorescencia inducidos por analitos o cambios en el medio en el que se encuentran. Es decir que el fluoróforo va a presentar dos o más señales de fluorescencia y una de ellas servirá como referencia interna en el cambio de emisión que presente. La principal ventaja de utilizar este método es que aumenta la relación señal/ruido y, por lo tanto, es una cuantificación mucho más confiable^{17,18}. Por lo general hay dos señales de emisión por ello se le conoce como “emisión dual”. La emisión dual puede deberse a uno o múltiples procesos fotofísicos como: transferencia de carga intramolecular (ICT), transferencia de protón (PT), transferencia de energía (ET), supresión a la regla de Kasha (SOKR), formación de excíplejos o de excímeros, entre otros¹⁹. Se han reportado diversas moléculas con la propiedad de emisión dual y a continuación, en la **Figura 4.3.1** se presentan algunos ejemplos de sondas ratiométricas clásicas. Jiang y colaboradores reportaron una sonda (**Probe A**) para medir decrementos en el pH de los lisosomas, la emisión dual que observaron era debida a un mecanismo de transferencia de carga²⁰. Por otro lado, Aprahamian reportó una serie de **BODIHYs** sensibles a la microviscosidad, el mecanismo de emisión dual es por supresión a la regla de Kasha, que establece que la emisión de fotones se produce desde el estado excitado más bajo de una determinado multiplicidad. Mientras que el grupo de Sun²¹ reportó una sonda con estructura tipo **HBO** para la detección de fluoruro la cual denominó PUBO 2. Pang²² con la misma estructura base de **HBO** presentó una sonda llamada Znhbo-1, para detectar iones Zn^{2+} , en ambos casos el mecanismo que da lugar a la emisión dual es la transferencia de protón intramolecular (en los estudios anteriores no reportan experimentos biológicos). En la **Figura 4.3.2** se presenta el esquema de interacción de la sonda PUBO 2 con acetato y con fluoruro, además del proceso ESIP que presenta la molécula.

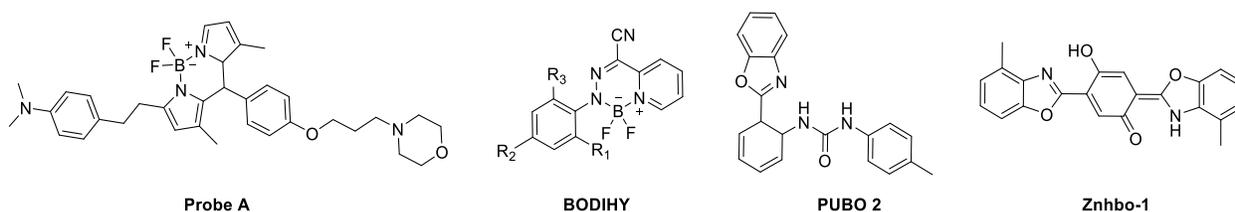


Figura 4.3.1 Moléculas reportadas con propiedades ratiométricas.

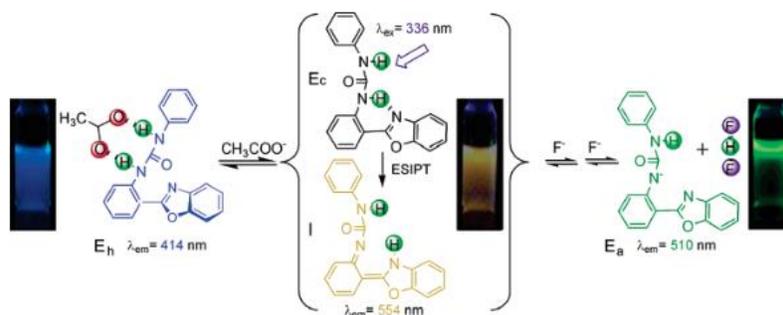


Figura 4.3.2 Esquema de la Sonda PUBO 2, el proceso de transferencia de protón y la interacción con fluoruro y con acetato.

4.4 Sondas para micropolaridad

El solvatocromismo se refiere al fenómeno que involucra muchas fuerzas intermoleculares diferentes que se ven afectadas por procesos dinámicos acoplados tanto de la sonda molecular como del disolvente en el que se encuentra y que tienen como resultado cambios en los espectros de emisión y absorción de una sonda en diferentes disolventes. Generalmente se señala a la polaridad en términos de la constante dieléctrica (ϵ_r) del disolvente como el efecto principal en el cambio solvatocrómico. Sin embargo, este esquema de clasificación solo proporciona una caracterización cualitativa de disolventes y debido a ello la diferenciación no es nítida.

Por ello hubo el interés de tener una escala que proporcione datos cuantitativos, en función de la naturaleza específica del disolvente, en particular, basada en propiedades físicas que se pueden determinar fácilmente de manera experimental, como la permitividad dieléctrica relativa, momento dipolar, punto de ebullición, etc. Se espera que la combinación de estos parámetros físicos proporcione una escala de polaridad del disolvente más refinada. Por ello se han desarrollado escalas paramétricas más elaboradas: la escala de solubilidad de Hansen utiliza tres parámetros, teniendo en cuenta las fuerzas de dispersión (δD), la polaridad de enlace (δP) y los enlaces de hidrógeno (δH). Kamlet y Taft propusieron otra escala multiparamétrica empírica de polaridad, con tres parámetros, la dipolaridad/polarización (π^*) del disolvente, que mide la capacidad del disolvente para estabilizar una carga o un dipolo en virtud de su efecto dieléctrico-eléctrico, la capacidad del disolvente de aceptar un protón (β) o de donar un protón (α) en un enlace de hidrógeno. Otra escala muy socorrida es la de Catalán, con parámetros principales de escala de polarizabilidad (SP), dipolaridad (SdP), aceptora de protón (SB) y donadora de protón (SA) esta escala incluye 300 disolventes, por eso es una de las más utilizadas en la actualidad²³⁻²⁵.

Mientras que para el diseño de fluoróforos con sensibilidad a la polaridad del disolvente un método poderoso para conferir propiedades solvatocrómicas a los fluoróforos aromáticos implica la funcionalización afín de un grupo donador de electrones (D) y un aceptor de electrones (A), unidos por un fragmento conector con conjugación electrónica del fluoróforo, formando un sistema típico de transferencia de carga intramolecular ($D^+ - \pi - A^-$). De tal forma que un grupo aceptor de electrones es aquel que tiene altas afinidades electrónicas, p.j., grupos Nitro (NO_2), carboxilo (COOH), ciano (CN), ester (COOR), entre otros. Mientras que los grupos electrodonadores son grupos funcionales con bajas energías de ionización, p.j., grupos metoxi (MeO), alcoxi (-ROH) y principalmente grupos amino (NH_2 , NHR y NR^1R^2). El gran momento dipolar presente en las estructuras y sus variaciones significativas entre el estado basal y el estado excitado, los hace sensibles a la polaridad del medio. Actualmente hay un auge para determinar los cambios en la polaridad en un medio heterogéneo como lo es la célula, debido a diferentes procesos biológicos. Se han reportado diversas sondas para medir la polaridad, por ejemplo, la primer sonda reportada para polaridad fue **BOB** por el grupo de Xiong²⁶, utilizando el modelo de polaridad de Lippert-Mataga, que relaciona los desplazamientos de Stokes con un parámetro Δf que está en función de la constante dieléctrica y el índice de difracción del disolvente, en ese estudio se determinó la polaridad en la mitocondria y se observó una menor polaridad en células cancerígenas (HeLa, HepG2 y MCF-7) con valores de $\Delta f = 0.278 - 0.290$, que en células no cancerígenas (RAW 265.7 y cos-7) con valores de $\Delta f = 0.295$. Por otro lado, el grupo de S.O. Kelley²⁷ reportaron un péptido de penetración mitocondrial (**MMP**), conjugado a dos fluoróforos, un fragmento con la cumarina 343 para medir micropolaridad y un fragmento de fenilquinoxalina para medir la microviscosidad. En dicho estudio miden la micropolaridad en la mitocondria y reportaron un decremento en la polaridad a las células tratadas con agentes apoptóticos de $\epsilon = 19$ en células sanas, contra a $\epsilon = 14, 9$ y 7 para células tratadas con etopósido, cisplatino y peróxido de hidrógeno, respectivamente. Lo anterior lo hicieron con una metodología ratiométrica y la polaridad la reportaron en términos de la constante dieléctrica con la calibración de su sonda. Otro ejemplo de sonda mitocondrial con sensibilidad a polaridad es la reportada por Tang²⁸ y colaboradores. **MCY-CF2** fue utilizada como sonda fluorescente y con ella determinaron en términos de constante dieléctrica valores de micropolaridad en modelos biológicos como *C. elegans* y ratones. En el caso del nematodo midieron la micropolaridad en diferentes etapas de desarrollo. Mientras que en los ratones determinaron la polaridad en ratones sanos y ratones con células tumorales implantadas (sin reportar valores), encontraron una disminución en la polaridad en las células tumorales, que en su caso se presentó con una mayor intensidad de fluorescencia en el infrarrojo cercano haciendo uso del método ratiométrico.

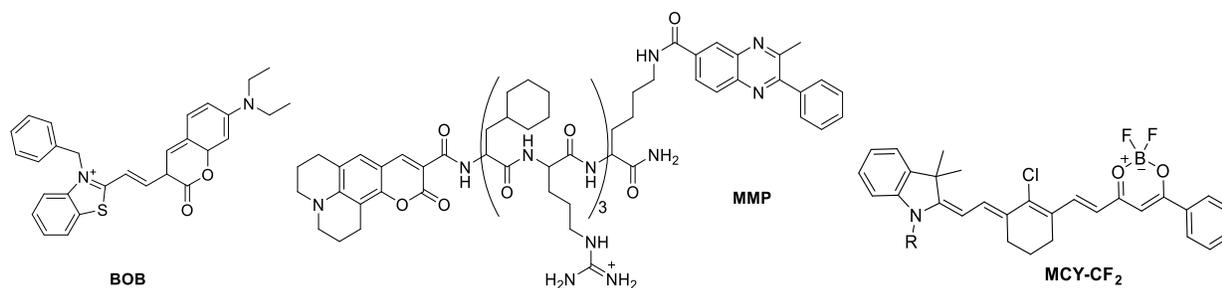


Figura 4.4.1 Sondas para determinación de micropolaridad en mitocondria.

4.5 Sondas para microviscosidad

La viscosidad es una propiedad macromolecular que a nivel de las sondas fluorescentes pierde sentido, dado que es una propiedad macromolecular. Entonces se han incorporado otros términos para hablar de viscosidad a nivel molecular, por ejemplo, la microviscosidad o la “viscosidad local” expresa la resistencia a la fluidez de las moléculas fluorescentes en un medio determinado. La evaluación de la fluidez de un disolvente en términos de una sonda fluorescente, donde la cantidad física subyacente es un coeficiente de difusión que implica tanto a la difusión rotacional como traslacional. Sin embargo, no se pueden dar valores absolutos, y lo mejor que podemos hacer es hablar de una viscosidad equivalente, es decir, la viscosidad de un medio homogéneo en el que la respuesta de la sonda es la misma. Pero debido a que las células y los organelos no son medios homogéneos hablar de una viscosidad como medida cuantitativa única nuevamente pierde sentido, ya que pueden existir regiones específicas dentro de una misma membrana que tenga diferentes composiciones y por tanto diferente microviscosidad. Es allí donde algunas técnicas son importantes para dejar las ambigüedades y hablar en términos de óptica molecular más precisos, por ejemplo, implementando la microscopía FLIM para medir tiempo de vida media, las cuales depende de la viscosidad local del medio. A continuación, en la siguiente **Tabla 4.5.1** se presentan algunas técnicas para determinar la fluidez de un medio implementando sondas fluorescentes^{1,3}. El término excímero está estrictamente limitado a aquellos casos en los cuales se forma un dímero, donde ambos componentes son de la misma molécula y al menos una se encuentra en estado excitado.

Tabla 4.5.1 Principales técnicas para determinar la fluidez con sondas fluorescentes 1.

Técnica	Mediciones características	Fenómeno responsable
Rotadores moleculares	Rendimiento de fluorescencia y/o Tiempo de vida de fluorescencia	Movimiento de torsión interna
Formación de excímeros	Cambios en espectros o relación	Difusión traslacional

Intermoleculares	de bandas	
Formación de exímeros Intramoleculares	Cambios en espectros o relación de bandas	Difusión rotacional interna
<i>Quenching</i>	Rendimiento de fluorescencia y/o Tiempo de vida de fluorescencia	Difusión traslacional
Anisotropía de fluorescencia	Medición de anisotropía	Difusión rotacional de la molécula completa.

En el caso de las sondas fluorescentes de moléculas orgánicas pequeñas la técnica de rotor molecular es la más explotada, dada la relativa facilidad de construcción del fluoróforo. Los rotores moleculares fluorescentes se pueden definir como moléculas para las cuales los procesos en estado excitado dependen de un movimiento de torsión o rotación intramolecular. El diseño consiste en algo similar a la sonda de micropolaridad. Se requiere un grupo donador (D) y aceptor (A) de electrones, unidos a través de un puente con conjugación π , pero en la conjugación debe haber al menos un átomo de carbono cuaternario que pueda tener libre giro. Los rotores moleculares exhiben una fotofísica descrita por Fóster y Hoffmann. En la **Figura 4.5.1** se muestran ejemplos de superficies de energía potencial en el estado basal (S_0) y estado excitado (S_1), que podrían dar como resultado un comportamiento del rotor molecular, en función del ángulo de torsión intramolecular. Tal como se muestra, pueden ocurrir tres procesos de desactivación electrónica, 1) la desactivación radiativa por la emisión desde el estado local excitado, 2) la emisión desde el estado de transferencia de carga intramolecular por torsión (TICT) y 3) la desactivación no radiativa desde el estado de transferencia de carga intramolecular por torsión (TICT). El primer caso ocurre principalmente cuando la rotación intramolecular está bloqueada (es decir en medios viscosos) y entonces la constante de velocidad de emisión es mayor a la constante de velocidad de torsión de la molécula. Mientras que en la desactivación no radiativa ocurre cuando la constante de velocidad de rotación es mayor que la velocidad de emisión. De igual forma el caso de la emisión desde el estado de TICT ocurre cuando la constante de emisión es mayor que la del estado local excitado.

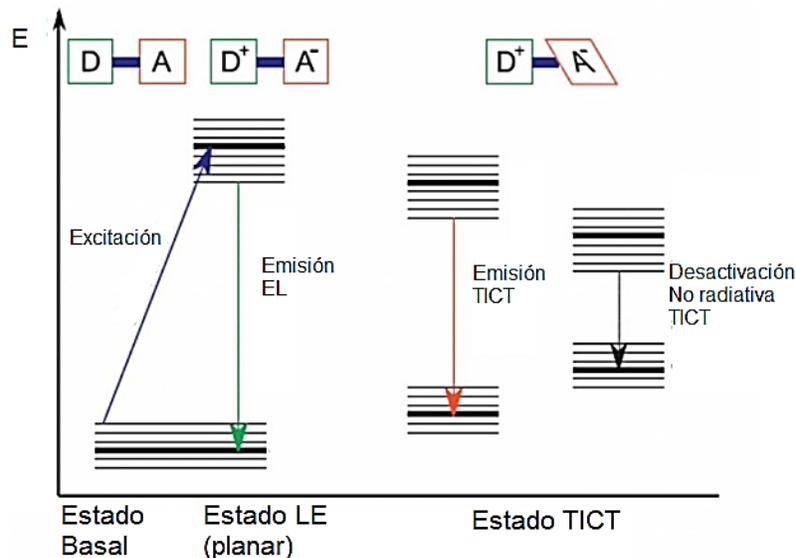


Figura 4.5.1 Diagrama de Jablonski simplificado para rotores moleculares (TICT)

Entre las primeras sondas (**Figura 4.5.2**) sensibles a la viscosidad para mitocondria reportada se encuentra un **BODIPY 1** reportado por el grupo de Kim²⁹. Con la sonda determinaron en células HeLa una viscosidad promedio de 62 cP y después de permear la membrana mitocondrial utilizando algunos ionóforos, observaron un aumento de la viscosidad a 110 cP, eso lo determinaron utilizando el método ratiométrico y lo corroboraron con microscopía FLIM. El aumento lo explican por un cambio en el metabolismo de la mitocondria, causado por el estrés oxidativo provocado por la adición de nistatina y monocina. Por otro lado, Yoon³⁰ y colaboradores reportaron una sonda sensible a viscosidad, **THDC** con localización en mitocondria, estudiaron células HeLa y un cultivo primario de neuronas corticales. A pesar de que lograron obtener una calibración *ex situ* en las células no obtuvieron una buena respuesta por lo que no reportan valores de viscosidad en las células. Otro ejemplo de sonda es el reportado por el grupo de Lin³¹ denominada **RV-1** el cual presenta alta sensibilidad a la viscosidad. Observaron localización mitocondrial, en este estudio solo comparan el cambio en la intensidad de una banda de emisión. Observaron en células y en modelos biológicos de pez cebra y ratones un aumento de la intensidad de fluorescencia al hacer tratamientos con ionóforos, de acuerdo con lo reportado anteriormente por otros grupos. Cabe señalar que el péptido reportado por S.O. Kelley²⁷, denominado **MMP** (ver **Figura 4.4.1**) presentado en la sección anterior de polaridad, también tenía un fragmento de cumarina C343, con el que pudieron medir viscosidad en mitocondria. Determinaron valores de 63 cP en células HeLa control y a células tratadas con Monensina y con Nistatina (ionóforos permeadores de membranas), determinaron valores de 92 cP y 132 cP, respectivamente.

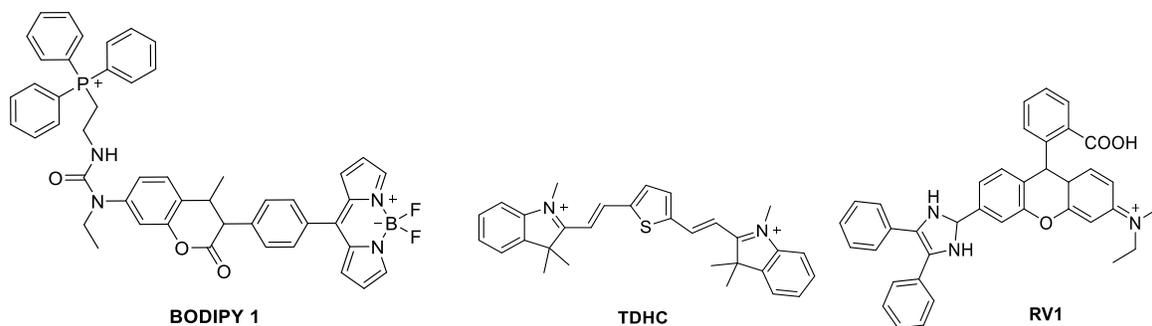


Figura 4.5.2 Sondas para determinación de microviscosidad en mitocondria.

4.6 Sondas para especies reactivas de oxígeno ROS

Las especies reactivas de oxígeno se generan vía endógena en los peroxisomas, el retículo endoplasmático y principalmente en la mitocondria. En la mitocondria las ROS son subproductos de la reacción de fosforilación oxidativa en la síntesis de la molécula de ATP. El último destino de un electrón a lo largo de una cadena de reacciones de óxido-reducción, es una molécula de oxígeno. En condiciones normales, el oxígeno se reduce para producir agua; sin embargo, en aproximadamente 0.1 a 2% de los electrones que pasan a través de la cadena (estudios en mitocondrias aisladas, en organismos vivos aún no se ha acordado por completo), el oxígeno se reduce prematura e incompletamente para producir el radical superóxido (O_2^-). Ese radical puede generar peróxido de hidrógeno a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD). También puede generarse el radical hidroxilo (OH^\cdot) y por diferentes mecanismos subsecuentes o alternos se pueden generar otras especies como hipoclorito (ClO^-), peroxinitrito (ONOO^-) y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). En particular el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) se genera endógenamente en la célula por diferentes mecanismos: 1) la recombinación de radicales peroxilo derivados de biomoléculas, 2) como resultado de la descomposición de tetróxidos transitorios de acuerdo con el mecanismo concertado de Russell y 3) por un mecanismo dependiente de la luz llamado fotosensibilización tipo II que es una reacción que involucra fotosensibilizadores endógenos (particularmente la protoporfirina IX) que, al ser excitados por el componente UV de la radiación solar, genera una especie triplete del fotosensibilizador que posteriormente por una transferencia de energía mediante el mecanismo de Dexter da paso a una aniquilación triplete-triplete.

La sobreproducción de las ROS genera estrés oxidativo que a su vez conduce a la degradación de las biomoléculas, lípidos, proteínas y material genético, produciendo daño a la célula que puede conducir a la muerte celular. La producción de ROS endógena también se puede

generar por agentes externos como agentes químicos, radiación UV, toxicidad por metales, algunos agentes metabólicos como la deficiencia de nutrientes entre otros.

Las moléculas reportadas para detección de ROS en mitocondria han sido diversas (**Figura 4.6.1**), por ejemplo, **RCP** es una sonda reportada por el grupo de Zhao³², utilizando el método ratiométrico determinaron la producción de hipoclorito (ClO^-) en mitocondria utilizando células RAW264.7, que son células de macrófago de ratón. Se estimuló la producción de hipoclorito utilizando lipopolisacárido (LPS), que es una endotoxina en algunas bacterias que permite la adhesión celular, activan el sistema inmune en las células generando ácido hipocloroso en las mitocondrias. Por otra parte, el equipo de Chang³³ reportaron una sonda para detección de peroxinitrito en mitocondria utilizando el modelo de rotor molecular y con ayuda del método ratiométrico, determinaron la concentración de peroxinitrito en células RAW264.7, en HepG2 (células cancerosas de hígado humano) estimuladas con LPS y posteriormente algunos estudios *in vivo* con modelos de ratón. Su límite de detección fue una concentración de 11 nM de peroxinitrito. Después, Lin³⁴ y colaboradores reportaron una sonda para la detección de peróxido de hidrógeno en mitocondria (**BC**), de igual forma implementando el método ratiométrico determinaron la concentración de H_2O_2 en células RAW264.7. La producción de peróxido de hidrógeno se estimuló con la incubación de H_2O_2 exógeno, previamente incubado antes de añadir la sonda. De esta forma en las células detectaron la generación de aproximadamente 100 μM de peróxido de hidrógeno. También hicieron estudios en pez cebra y determinaron una producción promedio de 25 μM de peróxido tras la incubación por 30 min con el agente oxidante.

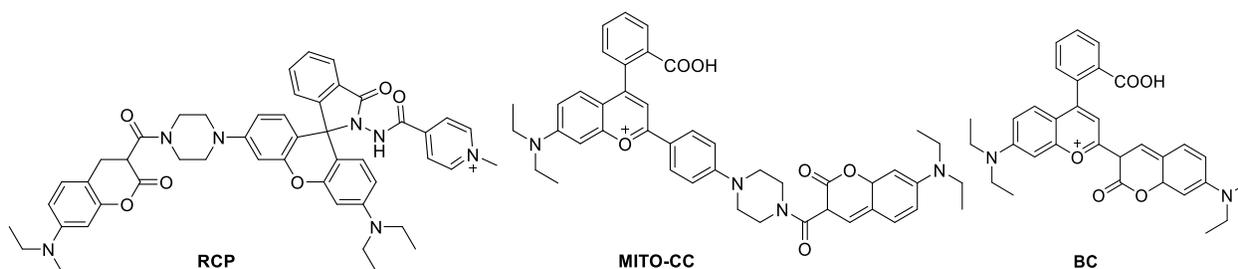


Figura 4.6.1 Sondas para determinación de ROS en mitocondria.

4.7 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una herramienta para el conteo y clasificación de células, basada en las características morfológicas y de fluorescencia al ser tratadas con marcadores y sondas fluorescentes. El conteo de células como eventos únicos la hace una herramienta estadística muy

poderosa. Consiste en un dispositivo que suspende las células o partículas en un fluido que atraviesan un finísimo tubo transparente sobre el que incide un delgado rayo de luz láser, la luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células a través del tubo se recoge por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo hacer inferencias en cuanto a tamaño y complejidad de las células; también tiene detectores de fluorescencia que registran la intensidad de emisión de cada célula individualmente. Es una técnica muy empleada en laboratorios clínicos para la detección de enfermedades como leucemias y SIDA, entre otras. Los resultados se suelen reportar en gráficos de puntos o histogramas³⁵. En la **Figura 4.7.1** se presenta el esquema general de funcionamiento del equipo de citometría de flujo.

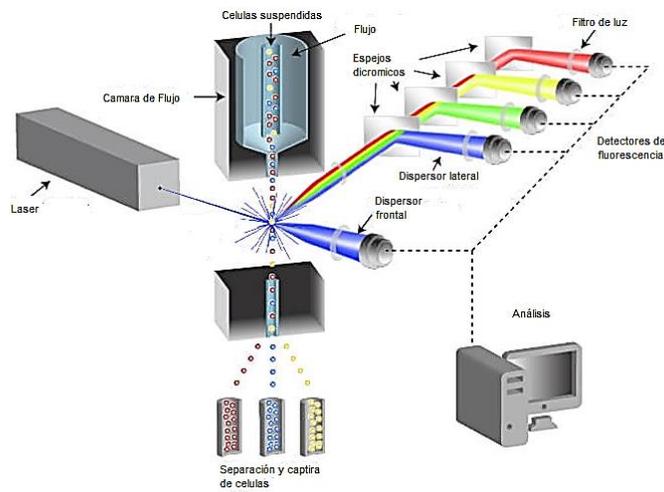


Figura 4.7.1 Esquema general de funcionamiento de un citómetro de flujo³⁵

Los datos de citometría de flujo se visualizan comúnmente en dos formas: el diagrama de dispersión y el histograma. En el diagrama de dispersión, también conocido como diagrama de puntos, permite que se muestren dos parámetros simultáneamente, generalmente el tamaño y la dispersión, uno en cada eje. De esta forma se puede evaluar la correlación de dos lecturas y se usa comúnmente para mostrar las propiedades de dispersión de luz o fluorescencia de la población celular. Por otro lado, también se pueden visualizar los datos en forma de histograma, para mostrar la intensidad de un parámetro a la vez en el eje y muestra la frecuencia de ocurrencia, o cuántas células se detectaron en cada punto a lo largo del eje x. Por lo general, se usa para evaluar las intensidades de fluorescencia en una población de células. En la **Figura 4.7.2** se muestran ejemplos de un diagrama de puntos y un histograma. En el ejemplo de la Figura A) se puede observar el diagrama de puntos con tres secciones diferenciales en tamaño y dispersión, las cuales corresponden a células de linfocitos, monocitos y neutrófilos. Mientras que en el histograma la intensidad de fluorescencia en función del número de eventos en cierto canal, en el ejemplo se

muestran dos poblaciones con diferente intensidad de fluorescencia en cierto canal, y ambas poblaciones presentan diferente número de eventos.

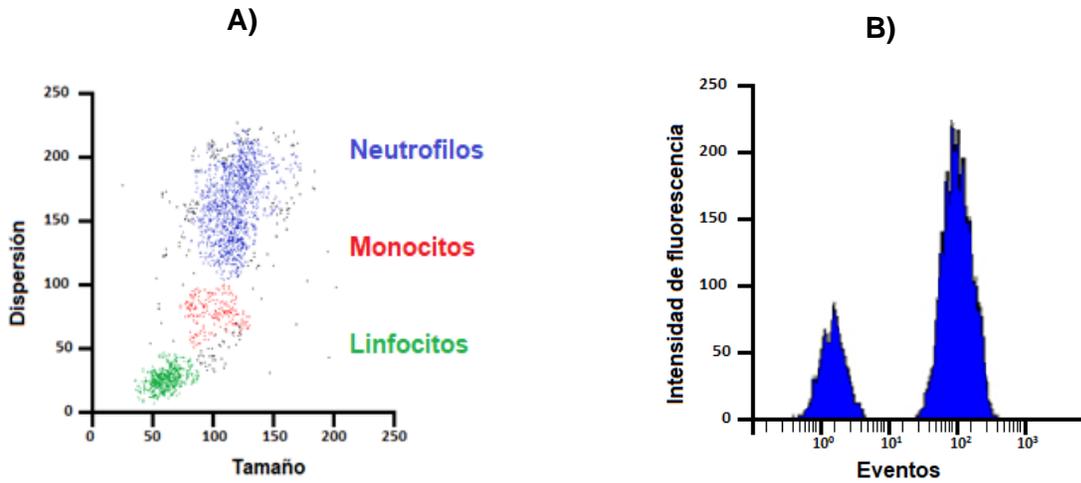


Figura 4.7.2 Ejemplos de A) Diagrama de puntos, B) histograma en citometría de flujo³⁵

4.8 Modelos biológicos

Existe una gran variedad de organismos que se han utilizado para estudiar diversas enfermedades o procesos biológicos específicos, para correlacionarlos con lo que sucede en otras especies, en particular se han utilizado animales para estudiar enfermedades en humanos. Esta estrategia es posible debido a los predecesores en común de todos los organismos vivos y la conservación de las rutas metabólicas, de desarrollo y de material genético a lo largo de la evolución. Los organismos modelo permiten comprender mejor el proceso de la enfermedad sin el riesgo de dañar a un ser humano. Regularmente se buscan ciertas similitudes con los humanos al momento de elegir al modelo biológico, en particular la similitud genética suele ser uno de los factores más importantes al momento de elegir un modelo. Otras características para selección de un modelo biológico son, el tamaño, el tiempo de generación, la accesibilidad, la manipulación, la conservación, los costos y recientemente los códigos éticos³⁶. En la **Figura 4.8.1** se observan la similitud genómica entre algunos animales y los humanos³⁷.

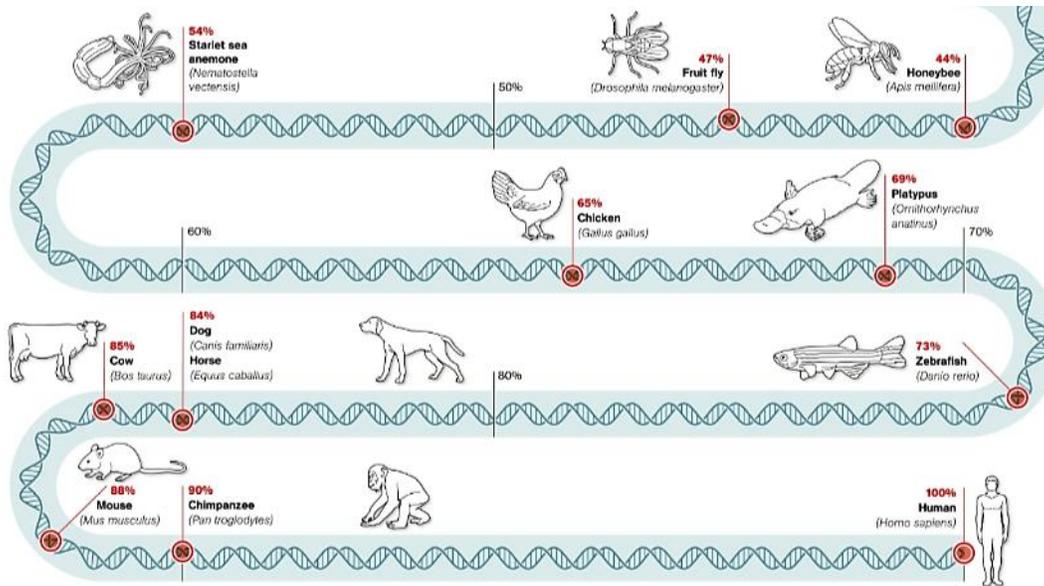


Figura 4.8.1 Infografía, genes en común entre diferentes especies³⁷.

Durante la historia de la investigación se han recurrido a diversas especies para diversos estudios biológicos. Entre los animales más empleados como modelos biológicos se encuentran: la rata de laboratorio, ratones, mosca de fruta, cerdos, gusanos, levaduras y diferentes peces, entre otros. Recientemente el pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en un excelente organismo modelo para los estudios de biología de vertebrados, en particular para el estudio de sondas fluorescentes. El desarrollo externo y la claridad óptica durante la embriogénesis permiten el análisis visual de los procesos de desarrollo temprano, su transparencia óptica permite trabajar bien con los experimentos de fluorescencia, con mínimas interferencias ópticas. Otra ventaja es la alta fecundidad y los tiempos de generación cortos facilitando los análisis genéticos y experimentos relativamente rápidos en comparación con otras especies. También su mantenimiento es relativamente más accesible. Aunque la similitud genética es menor (73% de similitud) en comparación con otras especies como el ratón (89%) o con algunos primates (mayor al 90%) se han encontrado buena relación para estudios en diversas enfermedades: del tipo de desórdenes hematopoyéticos, cardíacos, de riñón, y también ha servido como modelo para estudiar algunos tipos de cáncer e incluso para estudios sobre Alzheimer. En la **Figura 4.8.2** se presenta una imagen del *Danio rerio* con la sonda **NIR-Cys**³⁸ en microscopía confocal tanto en campo claro como en los canales verde y rojo. Con la sonda **NIR-Cys** detectaron SO₂ y al oxidarse la molécula presenta una disminución en el canal rojo y un aumento en la emisión en el canal verde, justo como se pueden observar en la figura.

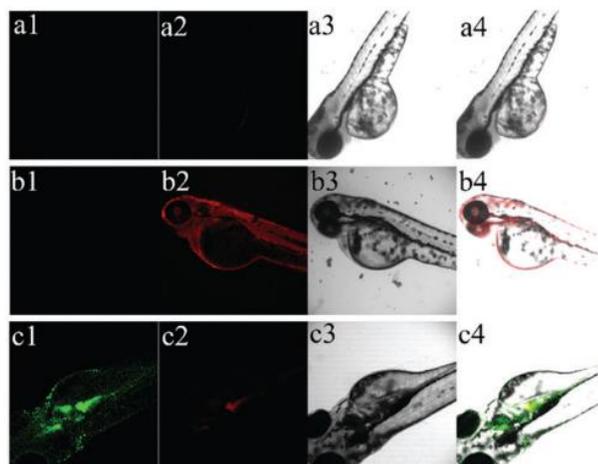


Figura 4.8.2 Sonda NIR-Cys a) pez sin sonda, pez con sonda b) en canal rojo y c) verde antes y después de la oxidación con SO₂. No observaron cambios en la localización. La emisión en ambos canales proviene de las mismas regiones

4.9 Espectroscopía de fluorescencia resuelta en tiempo

Las mediciones de fluorescencia se pueden distinguir en dos tipos: fluorescencia en estado estacionario o estático, y mediciones de fluorescencia resuelta en tiempo. La fluorescencia en estado estacionario es aquella que se realiza con una iluminación constante. La muestra es iluminada con un haz continuo de luz, y se registra la intensidad o espectro de emisión. Dado que el proceso de absorción es mucho más rápido ($k \approx 10^{15} \text{ s}^{-1}$) que los procesos subsecuentes, radiativo o no radiativo ($k \approx 10^{10} - 10^7 \text{ s}^{-1}$), la concentración de la especie permanece constante en estado excitado, bajo iluminación continua, lo que significa que se encuentra en un estado estacionario. Por ello las medidas bajo estas condiciones se conocen como fluorescencia en estado estacionario. Con esta técnica se observa simplemente un promedio del decaimiento de intensidad de fluorescencia que es proporcional al tiempo de vida de fluorescencia^{1,2}. En la **Figura 4.9.1** se muestran ejemplos de los espectros obtenidos por cada tipo de técnica. En la primera fila se observan gráficas de fluorescencia con una excitación continua, en ambos gráficos se presentan la intensidad de fluorescencia en función de onda y en la segunda se presenta el logaritmo de la intensidad de emisión en función del tiempo. En la segunda fila se presentan las gráficas con pulsos, en la primera gráfica se observa la constante de velocidad en función del tiempo, y en la segunda el logaritmo de la intensidad de emisión en función del tiempo, donde la línea vertical representa el pulso de excitación y la línea con pendiente negativa representa el decaimiento de fluorescencia.

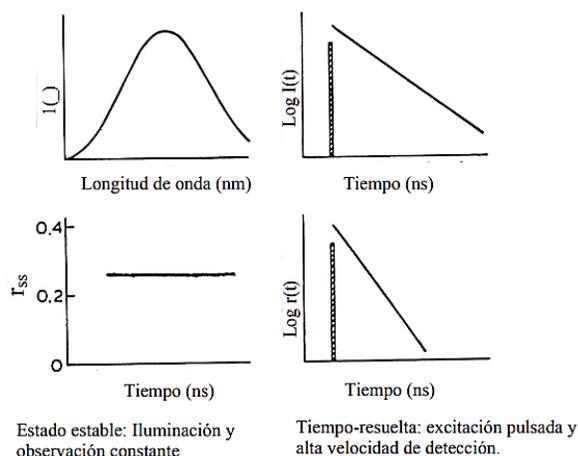


Figura 4.9.1 Espectros de fluorescencia resuelta en tiempo y estacionaria.

El otro tipo de mediciones de fluorescencia son las resueltas en tiempo, que se usan para medir decaimientos de intensidad o decaimiento de anisotropía (r). Para estas mediciones, la muestra es expuesta a un pulso de luz con una anchura que es típicamente más corta que el tiempo de decaimiento de la muestra. Este decaimiento de intensidad es registrado con un sistema de detección de alta velocidad que permite que la intensidad o anisotropía sean medidas en una escala de tiempo de nanosegundos a femtosegundos. Las mediciones resueltas en tiempo típicamente requieren instrumentos más complejos y caros, sin embargo, hay muchas razones para su uso. Mucha información molecular disponible de la fluorescencia se pierde durante los procesos que promedian el tiempo. Por ejemplo, los decaimientos de anisotropía de proteínas fluorescentes o de moléculas orgánicas pequeñas fluorescentes son frecuentemente más complejos que una sola exponencial. El decaimiento de intensidad también contiene información que se pierde durante un proceso promediado. Frecuentemente, las macromoléculas existen en más de una conformación, y el tiempo de decaimiento de una sonda unida puede depender de la conformación. El decaimiento de intensidad puede revelar dos tiempos de decaimiento, y por tanto la presencia de más de una especie^{1,2}.

Existen dos tipos de estudios con fluorescencia de resolución temporal, la primera es para medir el decaimiento de la intensidad de fluorescencia después de un pulso de excitación, esta se utiliza para determinar el tiempo de vida de fluorescencia de un fluoróforo, que refleja el tiempo promedio en el estado excitado de cada molécula. La utilidad de las mediciones del tiempo de vida de fluorescencia surge del hecho de que muchos eventos dinámicos pueden desactivar el estado excitado y, por lo tanto, influir en la vida útil; estos eventos pueden ser la relajación por interacción con el disolvente, fluctuaciones en conformación macromoleculares, rotaciones, interacciones con

residuos vecinos y enfriamiento por agentes exógenos. El otro tipo de experimento de fluorescencia con resolución temporal implica la medición del decaimiento de la anisotropía y se usa para caracterizar movimientos moleculares. El decaimiento de la anisotropía controla la reorientación del dipolo durante el tiempo de vida del estado excitado y puede dar información sobre movimiento local de fluoróforos, movilidad segmentaria o rotación de una macromolécula completa, por lo tanto, las mediciones pueden proporcionar datos hidrodinámicos que describen la difusión rotacional de una sonda y se puede utilizar tiempo real para seguir las dinámicas de las biomoléculas en un medio. Experimentos de este tipo pueden usarse para corroborar las predicciones de simulaciones de dinámica molecular.^{2,39}

A continuación, en las siguientes secciones se describe la preparación, caracterización y estudio de una familia de fluoróforos conocida como cromenilio cianinas (**CCy**), los cuales se diseñaron para tener localización en membrana mitocondrial y con posibles aplicaciones como sondas moleculares para la determinación de parámetros químicos o fisicoquímicos, según las modificaciones estructurales implementadas. El proyecto aborda las limitaciones mencionadas anteriormente con respecto a las interferencias y se proponen algunas formas para intentar cuantificar e identificar a las principales contribuciones que afectan la fluorescencia. Se seleccionó una sonda que fue sensible a la oxidación con oxígeno singlete y se implementó una metodología que involucró la caracterización con fluorescencia ultra-rápida, para elucidar los procesos fotofísicos que rigen a la molécula, y se logró compaginar con estudios *in vivo* utilizando al modelo pez cebra, aunado al modelado molecular computacional que ayudó a describir de mejor forma los cambios estructurales que presentó la sonda. Por lo que éste estudio se presenta como una opción metodológica para generar sondas fluorescentes de manera sencilla y una metodología de caracterización que va desde la fotofísica hasta la aplicación biológica.

5. Hipótesis y objetivos

5.1 Hipótesis

Si se diseñan, sintetizan y caracterizan moléculas cromenilio-cianina (CCy) evaluando los cambios en la fluorescencia producidos por efectos de microviscosidad, ambiente redox, pH, dinámica y variaciones morfológicas mitocondriales, entonces será posible calificar el estatus de salud de este organelo empleando estas sondas fluorescentes.

5.2 Objetivo principal

Desarrollar de nuevos compuestos fluorescentes del tipo *estímulo-respuesta dual* para estudiar su actividad como sondas moleculares de parámetros fisicoquímicos en sistemas vivos.

5.3 Objetivos particulares

- Diseñar, sintetizar y caracterizar las sondas fluorescentes.
- Calibrar los parámetros químicos y fisicoquímicos que afectan la fluorescencia.
- Medir los parámetros de interés *in vitro*.
- Estudiar la colocalización y la interferencia *in vitro*.
- Realizar estudios *in vivo* para estudiar el funcionamiento químico y la respuesta óptica de la sonda.

6. Metodología

6.1 Diseño

El diseño de las sondas sintetizadas en éste trabajo fue inspirado por una molécula reportada previamente por Baoli Dong³⁴, la cual presentó localización mitocondrial y con sensibilidad a la oxidación frente a peróxido de hidrógeno, denominada **BC** (**Figura 6.1.1**). Dicha molécula tuvo características interesantes para su implementación como sonda molecular, por ejemplo, emisión dual para poder utilizar en método de la proporción, emisión en el infrarrojo la cual es menos dañina para los tejidos orgánicos y además fue muy selectiva a H_2O_2 . La localización de **BC** en mitocondria es debida a la presencia el fragmento cromenilio, su emisión dual es debida a la ruptura y formación del fragmento de cumarina, mientras que la emisión en el infrarrojo es por la larga conjugación que presenta la sonda antes del tratamiento oxidativo.

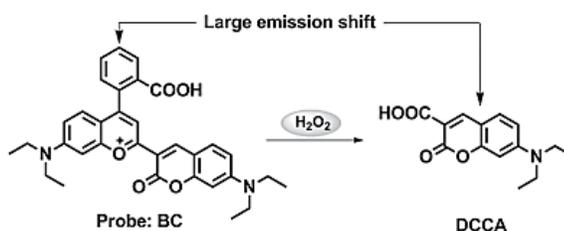


Figura 6.1.1. Sonda BC reportada por Baoli Dong para detección de H_2O_2 en mitocondria.

Para el diseño de las sondas de esta tesis, se consideraron algunas generalidades observadas en la sonda de Baoli Dong. En primer lugar, en todas las estructuras sintetizadas en este trabajo se conservó el fragmento de cromenilio unido a la dimetilamina y al ácido benzoico por dos razones principales: 1) la presencia del ácido carboxílico, el cual puede dar paso a equilibrios ácido base importantes que modificarán la fluorescencia (esto no fue considerado ni estudiado por el grupo de Dong) y 2) el grupo oxonio podía dar sensibilidad a la oxidación en las sondas (según lo reportado). En segundo lugar, se deseaba modificar el fragmento que iría unido al fragmento cromenilio, para intentar modular la región de emisión que incrementaría, ya que se ideó que las sondas iban a reaccionar con algún oxidante de una manera similar a la sonda estudiada por Dong y de esta forma obtener un fragmento fluorescente al irse oxidando la sonda inicial. Y en tercer lugar fue muy importante la disponibilidad de los reactivos con la que se contaban en el momento.

6.2 Síntesis

Para la síntesis de las sondas se implementó una metodología similar a la reportada por Dong³⁴ la cual se presenta en el esquema de reacción de la **Figura 6.2.1**. Los compuestos tipo cromenilio-cianina (**CCy**) obtenidos se encuentran en la **Figura 6.2.2** los cuales fueron sintetizados a partir de reactivos comerciales obtenidos de Sigma-Aldrich sin previa purificación.

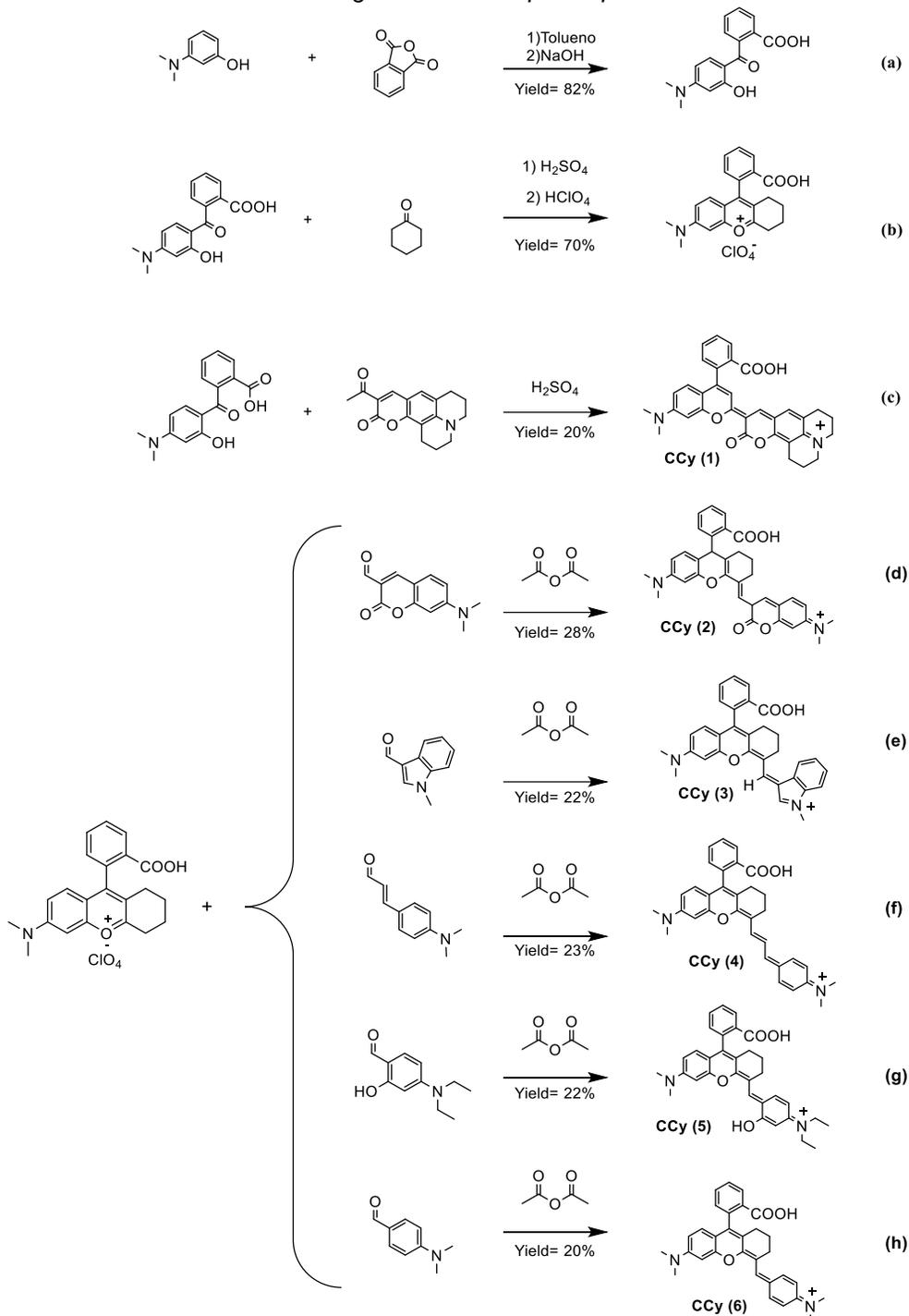


Figura 6.2.1 Esquemas de reacción para la síntesis de los compuestos **CCy** y sus precursores.

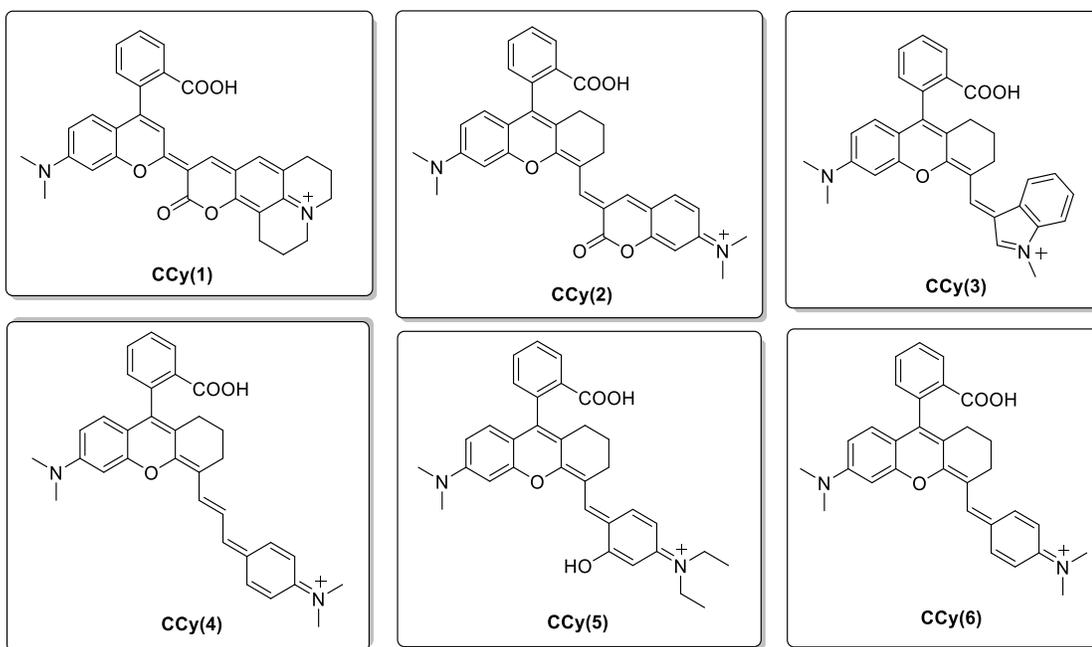


Figura 6.2.2. Familia de fluoróforos cromenilo-cianina sintetizados.

a) Síntesis del ácido 2-(4-(dimetilamino)-2-hidroxibenzoil) benzoico **(a)**.

Se disolvieron en un matraz 3.5 mmol de 3-(dimetilamino)fenol y 7 mmol de anhídrido ftálico en 21 mL de tolueno a reflujo y agitación vigorosa por 6 horas. Posteriormente se quitó el reflujo y al llegar a temperatura ambiente se adicionaron 100 mL de una disolución de NaOH al 35%, se dejó a 90°C con agitación por 12 horas. Finalmente, la mezcla se neutralizó con HCl concentrado, obteniéndose un precipitado púrpura el cual se recristalizó por par de disolventes MeOH:Agua. El producto final **(a)** de color púrpura cristalino tuvo un punto de fusión de 180-182°C con un rendimiento del 82% (1.0 g).

b) Síntesis del 9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo **(b)**.

A una disolución con 1.75 mmol del compuesto **(a)** en 3 mL de H₂SO₄ se le añadió gota a gota 3.5 mmol de ciclohexanona a temperatura ambiente, se agitó y calentó a 90°C por 3 horas. Posteriormente la mezcla se enfrió en baño de hielo y se le adicionó gota a gota HClO₄ lo suficiente para obtener un precipitado color rojo. En seguida la mezcla se filtró al vacío y se purificó por columna de sílice con una mezcla de elusión de DCM:MeOH 98:2 v/v. Se obtuvieron cristales color rojo de **(b)** que tuvieron un punto de fusión de 190-192°C y un rendimiento del 70% (457 mg).

c) Síntesis del (Z)-10-(4-(2-carboxifenil)-7-(dimetilamino)-2H-cromen-2-ilideno)-11-oxo-2,3,6,7,10,11-hexahidro-1H,5H-pirano[2,3-f]pirido[3,2,1-ij]-4-quinolinio, **CCy(1) (c)**.

Una disolución con 1.75 mmol del compuesto **(a)** en 3 mL de H₂SO₄ se añadió gota a gota a una disolución con 1.75 mmol de la cumarina 343 en 3mL a temperatura ambiente, se agitó y calentó a 90°C por 2 horas. Posteriormente a la mezcla se le realizó una extracción con DCM:Agua para remover el exceso de ácido. Se evaporó y se impregnó en sílice para purificar por columna cromatográfica con una mezcla de eluyentes DCM:MeOH 98:2. Por último, se purificó por HPLC para obtener el producto deseado. Se obtuvo a **CCy (1)** un polvo color verde oscuro, con un rendimiento del 20% (186 mg).

d) Síntesis del (*E*)-*N*-(3-((9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-2,3-dihidro-1*H*-xanten-4(9*H*)-ilideno)metil)-2-oxo-2,3-dihidro-7*H*-cromen-7-ilideno)-*N*-metilmetanaminio, **CCy(2) (d)**.

Una disolución con 0.3 mmol del compuesto **(b)** y 0.3 mmol de 7-(dimetilamino)-2-oxo-2*H*-cromenio-3-carbaldehído en 10 mL de anhídrido acético se agitó en atmósfera inerte de N₂ y se calentó a 60°C por 1.5 horas. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el sólido se purificó mediante cromatografía en columna (DCM:MeOH = 9:1). Finalmente se purificó por HPLC para obtener el producto **CCy (2)**, un polvo café con un rendimiento del 28% (41 mg).

e) Síntesis del (*E*)-3-((9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-2,3-dihidro-1*H*-xanten-4-il)metileno)-1-metil-3*H*-indol-1-ilo, **CCy(3) (e)**.

Una disolución con 0.3 mmol del compuesto **(b)** y 0.3 mmol 1-metilindol-3-carboxaldehído en 10 mL de anhídrido acético, se agitó en atmósfera inerte de nitrógeno y se calentó a 60°C por 1.5 horas. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el sólido se purificó mediante cromatografía en columna (DCM:MeOH = 9:1). Se obtuvo a **CCy (3)** un sólido azul dorado, correspondiente al 22% de rendimiento (37 mg).

f) Síntesis del (*E*)-*N*-(4-(3-(9-(2-carboxifenil)-dimetilamino)-2,3-dihidro-1*H*-xanten-4-il)alilideno)ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-*N*-metilmetanamonio, **CCy(4) (f)**.

Una disolución con 0.3 mmol del compuesto **(b)** y 0.3 mmol de cinamaldehído en 10 mL de anhídrido acético se agitó en atmósfera inerte de nitrógeno y se calentó a 60°C por 1.5 horas. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el sólido se purificó mediante cromatografía en columna (DCM:MeOH = 9:1). Finalmente se purificó por HPLC para obtener el producto de interés. Se obtuvo a **CCy (4)** un sólido azul correspondiente al 23% (34 mg) de rendimiento y p.f de 189°C.

g) Síntesis del (*E*)-*N*-(4-((9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-2,3-dihidro-1*H*-xanten-4-il)metileno)-3-hidroxiciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-*N*-etiletanaminio, **CCy(5) (g)**.

Una disolución con 0.3 mmol del compuesto (**b**) y 0.3 mmol de 4-(dietilamino)-2-hidroxibenzaldeido en 10 mL de anhídrido acético se agitó en atmósfera inerte de N₂ y se calentó a 60°C por 1.5 horas. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el sólido se purificó mediante cromatografía en columna (DCM:MeOH = 9:1). Finalmente se purificó por HPLC para obtener el producto de interés, **CCy (5)** un sólido brillante azul con rendimiento del 22% (34 mg).

h) Síntesis del *N*-(4-((9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-2,3-dihidro-1*H*-xanten-4-il)metileno)ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-*N*-metilmetanaminio, **CCy(6) (h)**.

La disolución con 0.3 mmol del compuesto (**b**) y 0.3 mmol de 4-(dimetilamino)benzaldeido en 10 mL de anhídrido acético se agitó en atmósfera inerte de N₂ y se calentó a 60°C por 1.5 horas. El disolvente se evaporó bajo presión reducida y el sólido se purificó mediante cromatografía en columna (DCM:MeOH = 9:1). Finalmente se purificó por HPLC para obtener el producto de interés **CCy (6)** un polvo azul con un rendimiento del 20% (28 mg).

6.3 Caracterización

6.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución

Los productos finales obtenidos fueron purificados por HPLC utilizando un método isocrático con una mezcla de eluyentes de MeOH:Agua (70/30 v/v). La columna utilizada fue una Luna 5u C18 (2) 100 Å, 50 x 21 mm, 5 microns, con un flujo de 10 mL/min e inyectando 500 µL de la disolución del compuesto (50 mg /2 mL de MeOH). La fracción de interés se colectó y se evaporó el disolvente.

6.3.2 RMN de ¹H y ¹³C

Los productos se caracterizaron por las técnicas de resonancia magnética de protón y carbono (RMN ¹H y ¹³C), empleando los quipos Bruker Fourier 300MHz, Joel Eclipse 400 MHz y Bruker AVANCE III HD 700 MHz. Se dispusieron 10 mg del producto de interés en un tubo para resonancia y se disolvió en DMSO-d₆, CD₃OD o CDCl₃, según fue requerido.

6.3.3 Espectrometría de masas

Después de la purificación de cada sonda se hicieron disoluciones con 10 mg de cada una en 1 mL de metanol grado HPLC y se caracterizaron por espectrometría de masas en un equipo Agilent Technologies, modelo 6530 acoplado a Q-TOF LC/MS empleando la técnica ESI-TOF.

6.3.4 Espectroscopía UV-vis y de fluorescencia

Los experimentos de espectroscopía UV-vis fueron realizados en un equipo Thermo Scientific Evolution con arreglo de diodos, empleando disoluciones con diferentes disolventes en una celda de cuarzo de 3 mL manteniendo una absorbancia con valores menores a 0.5 unidades, con excepción para los experimentos de determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia, donde se buscó que el máximo de absorción estuviera por debajo de 0.05 unidades de absorbancia. A la par se iban midiendo los espectros de fluorescencia con las mismas disoluciones en la celda de cuarzo y estas se realizaron en dos equipos en un equipo FluoroMax de HORIBA Scientific o en un equipo Cary Eclipse.

Se implementaron diversas metodologías para observar los principales cambios en las propiedades de emisión de las sondas utilizando la técnica de fluorescencia estacionaria. Al cambiar las propiedades específicas del medio como: la acidez, polaridad, solvatación, viscosidad y sensibilidad a la oxidación con algunas especies reactivas de oxígeno y posteriormente midiendo la absorbancia y fluorescencia de cada sonda en disolución. Esto se hizo utilizando disolventes o mezclas específicas que tienen parámetros de Catalán²⁵ (SA, SB, SdP y SP) conocidos y determinados. A continuación, se enlista de forma general la serie de experimentos de fluorescencia estacionaria realizados *ex situ* con cada sonda **CCy**.

- 1) Acidez-Basicidad (SA-SB). Se utilizaron como disolventes el hexafluoroisopropanol (HFIP) con SA= 1.010 y SB=0.014 y la *N,N*-dimetilformamida (DMF) con SA=0.031 y SB=0.613. Estos disolventes al tener propiedades prácticamente opuestas de SA y SB, pueden dar información de la dependencia entre acidez y basicidad tanto en estado basal como excitado en un medio no acuoso y con permitividad eléctrica cercana ($\xi_{\text{HFIP}} = 15.7$; $\xi_{\text{DMF}} = 36.7$).
- 2) Polaridad en términos de constante dieléctrica (SP). Se utilizaron diferentes fracciones de volumen de agua: dioxano ($\xi_{\text{agua}} = 80.1$; $\xi_{\text{Dioxano}} = 2.25$). La mezcla de agua-dioxano se utiliza comúnmente en la literatura para determinar la polaridad en términos de la constante dieléctrica, ya que tienen índice de refracción, viscosidad, punto de ebullición y densidad similar. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, desde la perspectiva de los parámetros de Catalán, estos dos disolventes tienen una contribución importante de la acidez y basicidad (SA y SB) con valores de SA=1.064 y SB=0.025 en agua, mientras que en SA=0 y SB=0.444 en dioxano. Por ello también se hizo un estudio solvatocrómico con el modelo de Catalán y para ello se seleccionó una sonda como modelo.

- 3) Viscosidad (ϵ). Se utilizaron mezclas de etilenglicol:metanol, $\epsilon_{\text{etilenglicol}} = 16.1$ cP y $\epsilon_{\text{Metanol}} = 0.59$ cP. De tal forma que la mezcla de dichos disolventes podrá darnos valores intermedios de viscosidad sin cambios considerables en otros parámetros (SA, SB, SdP y SP).
- 4) Determinación de constantes de acidez (pK_a). Se determinaron con titulaciones ácido-base con concentraciones conocidas de las diferentes moléculas **CCy**. Para titular se utilizaron disoluciones de HCl al 0.1 mM y de NaOH 0.2 mM, se añadieron volúmenes de la disolución correspondiente para obtener variaciones de 0.1-0.2 en valores de pH y las titulaciones se hicieron por triplicado, se midieron tanto los cambios en la absorbancia como de fluorescencia. Este experimento no solo determina los cambios de las especies en diferentes medios ácidos, sino que también da información de la solvatación por la molécula de agua.
- 5) Sensibilidad a la oxidación con diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS). A una concentración conocida de **CCy** se añadió fracciones molares hasta alcanzar un exceso de diferentes especies reactivas de oxígeno como: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hipoclorito (ClO^-), peroxinitrito ($ONOO^-$), oxígeno singlete (1O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y se determinaron los cambios en los espectros de absorción y emisión.

Preparación de agentes ROS: 1) el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el hipoclorito de sodio ($NaClO$), el cloruro de hierro (III) ($FeCl_3$), el bicarbonato de sodio ($NaCO_3$), el nitrato de sodio ($NaNO_3$) y el nitrito de sodio ($NaNO_2$) se obtuvieron de Sigma-Aldrich y se utilizaron sin mayor purificación. El peroxinitrito de sodio ($NaNOO_2$) se adquirió de Merk Millipore (US1516620-1SET) y se usó según lo previsto. 2) El oxígeno singlete (1O_2) se preparó como sigue: la concentración de oxígeno singlete se determinó mediante la siguiente reacción: $NaClO + H_2O_2 \rightarrow NaCl + ^1O_2 + H_2O$. Se mezcló lo siguiente: $NaClO = [14\%]$ (1 mL) con $H_2O_2 = [30\%]$ (2 mL) donde el reactivo limitante es hipoclorito de sodio. Entonces, 1 mL de $NaClO$ (14%) es equiv. a 0,14 g de $NaClO$ puro, dando 0,6266 M de $NaClO$. Luego, se realizó una dilución de 1 mL en 40 mL para obtener una solución de $NaClO$ 1,6 μM . Después de eso, se realizó un análisis de regresión lineal utilizando el Singlet Oxygen Sensor Green® disponible comercialmente, como se describe en la literatura⁴⁰. 3) Ión superóxido ($\bullet O_2^-$): se preparó por reacción de dióxido de potasio disponible en el mercado (KO_2 , Sigma-Aldrich, 278904) y DMSO usando electrolito de soporte y tetrabutilamonio, como se informó anteriormente⁴¹. El radical hidroxilo ($OH \bullet$) se produjo por reacción de Fenton usando $H_2O_2 + FeCl_2$.

6.3.5 Microscopía confocal

Se utilizaron dos tipos de cultivo celular: de cáncer cervicouterino conocidas como HeLa y de cáncer de pulmón denominadas como SK-LU1, las cuales se sembraron en placas de 8 pocillos (iBidi, Alemania) a una densidad de 20000 células por pocillo. El día del experimento, las células se lavaron una vez en medio MEM alfa sin FBS y se incubaron con la sonda de interés en un rango de concentración de 10 - 100 μM durante 30 minutos. Luego se lavaron las células dos veces en medio MEM alfa sin FBS y se tomaron imágenes usando un microscopio Zeiss LSM 880 invertido que mantenía condiciones de 5% de CO_2 y 37 °C durante los experimentos. El cultivo y tratamiento de las líneas celulares se realizaron siguiendo protocolos previamente reportados para el crecimiento, para estudios de colocalización de medición de parámetros o analitos dentro del sistema⁴². La tinción, así como la aplicación de tratamientos a las células se llevó a cabo en condiciones totales de asepsia. Se utilizaron diversos protocolos para realizar diferentes experimentos, según los requerimientos de las pruebas. Se intentaron utilizar en la medida de lo posible, los mismos canales y filtros, dado que las moléculas presentaron espectros de absorción y emisión muy similares, por lo que en la **Tabla 6.3.1** se presentan los filtros utilizados en la microscopía confocal, (en el texto se hará referencia solo el canal de emisión). Las principales metodologías para los experimentos en microscopía se describen a continuación:

- 1) Localización de la sonda. Después de incubar la sonda se observó al microscopio para intentar reconocer por la morfología de la tinción el tipo de organelo o región en la que se encuentra, esto es posible realizarse mediante una comparación visual con lo reportado en la literatura.
- 2) Colocalización de la sonda con un marcador. Después de elegir en que región se encuentra la sonda, es necesario hacer un estudio de colocalización utilizando algún estándar comercial para localización específica, según sea conveniente. Para el caso de localización mitocondrial existen diversos marcadores como TMRM, MitoTracker, JVL, entre otros. Los estudios de colocalización se realizaron de dos formas: 1) si el estándar emitía en un canal donde la sonda no emitía o tenía un mínimo de intensidad de emisión, se podían incubar ambos al mismo tiempo y se seguían las emisiones en ambos canales, para posteriormente hacer una superposición de imágenes de los diferentes canales o, 2) si el estándar emitía en el mismo canal que la sonda, se incubaba primero la sonda (que tiene menor intensidad de fluorescencia generalmente que el estándar) y se observaba la emisión de la sonda primero y luego se añadía el estándar para observar si el aumento de la intensidad provenía de la misma localización.

- 3) Variación de potencial de membrana mitocondrial. Para el caso de los marcadores de mitocondria, es necesario hacer estudios de cambio en el potencial de membrana con algunos ionóforos, para determinar si las sondas se localizan por interacción con el potencial de membrana o por otro mecanismo, también sirven para ver cómo cambia la fluorescencia al modificar el potencial, para ello se utilizó CCCP y Nigericina.
- 4) Estímulo para detección de cambios en las propiedades químicas o fisicoquímicas. De los estudios *ex situ*, se determinaron los estímulos que se modificarían. *In vivo*, se utilizaron algunos protocolos mencionados en la parte introductoria, con el fin de medir con sondas fluorescentes propiedades como la polaridad, viscosidad y sensibilidad a la oxidación.
- 5) Pruebas de interferencia. Es necesario hacer tantos estímulos como sean posibles para determinar si en la célula hay parámetros que puedan cambiar la fluorescencia, aunque en los estudios *ex situ* no se halla observado eso, ya que puede deberse a un mecanismo secundario, que puede proporcionar más información.

Tabla 6.3.1 Filtros utilizados en microscopía confocal

Emisión	Azul	Verde	Rojo	Infrarrojo cercano
Filtro	DaPi filter	Atto 488 filter	AF 546 filter	AF 647 filter
Longitudes de onda	λ_{ex} 405 - λ_{em} 415	λ_{ex} 488 - λ_{em} 505	λ_{ex} 546 - λ_{em} 570	λ_{ex} 647 - λ_{em} 670

6.3.6 Citometría de flujo

Las mediciones de citometría de flujo se realizaron en un equipo FACSCalibur de BD bioscience con sistema láser de iones de argón refrigerado por aire, 15 milivatios, de 488 nm; y segundo láser de 635 nm. Con detector de dispersión directa y filtro de silicio de alto rendimiento en estado sólido, detector con filtro de paso de banda de 488 nm y diodo rojo de 635 nm con emisión láser. El detector de dispersión lateral es un fotomultiplicador de alto rendimiento con divisor de haz de ángulo Brewster en el tren óptico de emisión. Los detectores y filtros de fluorescencia de rango dinámico con filtros de paso de banda son: 530/30 nm (FITC), 585/42 nm (PE / PI), 661/16 nm (APC) y un filtro de paso largo de 670 nm. El flujo de muestra fue por tres caudales seleccionables de 60 $\mu\text{L} / \text{min}$, 35 $\mu\text{L} / \text{min}$, y 12 $\mu\text{L} / \text{min}$; a una diferencia de presión regulada y monitoreada entre vaina y muestra; la velocidad de partícula en la celda de flujo fue aproximadamente 6 metros por segundo. En la **Figura 6.3.1** se presentan los esquemas de los filtros que utiliza el equipo FACSCalibur. Se hicieron hasta 10 mil cuentas positivas.

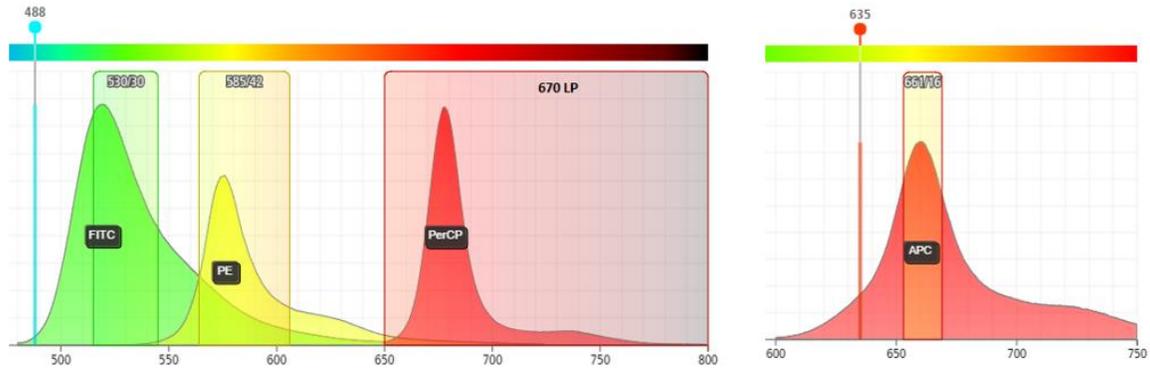


Figura 6.3.1. Espectros y filtros del equipo FACSCalibur utilizado en citometría

6.3.7 Estudios *in vivo* con el modelo pez cebra

Los experimentos y el manejo del pez cebra fueron aprobados por el Comité de Animales de Laboratorio de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo el número de Protocolo CICUAL: FLC40-14. (CICUAL: "Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales" de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México "). El pez cebra de la cepa AB se mantuvo en el sistema de recirculación de hábitats acuáticos a 28 ° C con un período oscuro / claro de 14-10 h, respectivamente. Los embriones se obtuvieron del apareamiento natural, todas las etapas embrionarias se determinaron de acuerdo con los protocolos reportados por Kimmel³⁶ . Todos los embriones fueron tratados con 1-fenil-2-tio-urea 0.2 mM (Sigma Aldrich) para prevenir la pigmentación y permitir la obtención de imágenes posteriores.

Los embriones se tiñeron con **CCy (1)** durante 30 minutos, 4 horas o durante la noche con las concentraciones indicadas del compuesto, los embriones se lavaron en agua de pez cebra 3 veces durante 5-10 minutos. Todos los embriones fueron anestesiados con triclaína 4.2% (Sigma), algunos embriones fueron estimulados con ¹O₂ durante 1 o 2 minutos a las concentraciones indicadas. Inmediatamente los embriones fueron montados en agarosa de bajo punto de fusión al 1% (National Diagnostics) y se obtuvieron imágenes de embriones de pez cebra vivos con microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500 o microscopio confocal Zeiss LSM800.10.

6.3.8 Fluorescencia resuelta en tiempo

Conteo de fotones individuales con correlación de tiempo

El sistema de conteo de fotones individuales correlacionado con el tiempo consiste brevemente en, un láser de picosegundos de 405 nm (LDH-D-C-405, PicoQuant), acoplado a un microscopio confocal personalizado donde, se colocó la celda de cuarzo de 10 mm. La emisión de

fluorescencia recogida se separó de la línea de excitación con un espejo dicróico de paso largo de 510 nm (Chroma T510lpxrxt) y se pasó a través de un filtro Notch (Chroma, ZET405nf) un filtro BG40 (Newport) o un paso largo de 655 nm (Chroma ET655LP), dependiendo de la banda de emisión a detectar. La fluorescencia se centró en un fotodiodo de avalancha (PD-050-CTE, dispositivos de micro fotones) sincronizado con el controlador láser (PDL 800-D) a través de un módulo PicoHarp 300. Los datos se analizaron con el software SymphoTime 64.

Emisión ultrarrápida resuelta en el tiempo

La configuración de la técnica sumas de frecuencias se ha descrito anteriormente⁴³. Un kHz de Ti: láser de zafiro amplificado regenerativamente centrado a 800 nm (1 mJ / pulso) de 80 fs de duración se dividió en dos. El segundo armónico del pulso fundamental (400 nm, modulado a 1/3 de la tasa de repetición del láser y la polarización del ángulo mágico) se generó en un cristal β -BBO (borato de bario) de 0.5 mm y excitó la muestra en una celda de flujo de 1 mm. La fluorescencia se recogió con un par de espejos parabólicos y se reenfocó al cristal β -BBO de conversión ascendente, donde se cruzó con ~ 1 mW controlado de forma retardada del haz fundamental de 800 nm. La señal de frecuencia de suma se enfocó con una lente CaF_2 en un monocromador doble de 10 cm (Oriel) y se detectó con un tubo fotomultiplicador. La señal de conversión ascendente se digitalizó con un amplificador de bloqueo (Stanford Research Systems). Se determinó que la función de respuesta del instrumento para los experimentos de conversión ascendente era gaussiana con un ancho completo a la mitad del máximo de 300 fs.

6.3.9 Estudios computacionales

Las optimizaciones de la geometría molecular se obtuvieron empleando cálculos a nivel de Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) tal como se realiza en el código Gaussian 09.2, sin encontrarse frecuencias imaginarias después de realizar los respectivos análisis de frecuencia para todas las geometrías estudiadas en estado basal, mientras que para las geometrías en el estado excitado S_1 se encontró una frecuencia imaginaria. Las propiedades de transferencia de carga intramolecular (ICT) de **CCy (1)** se analizaron primero usando la versión dependiente del tiempo (TD-DFT) con un modelo continuo polarizable usando el formalismo de ecuaciones integrales (IEF) para agua. Funcionales híbridos como PBE0 han resultado ser muy precisos para los parámetros CT y estados excitados en los sistemas moleculares de transferencia de carga. Luego, utilizamos el PBE0/6-31+G(d)/IEF Nivel de teoría PCM. La excitación electrónica única por análisis de Orbitales Naturales de Transición (NTO) se llevó a cabo al mismo nivel de teoría.^{44,45}

7. Resultados

7.1 Diseño

Entre los resultados del diseño se encontraron algunas generalidades que se van a elucidar y discutir a lo largo de este capítulo, entre las más interesantes se enlistan las siguientes.

1. El ácido carboxílico presente en todas las estructuras dio lugar a equilibrios ácido base importantes que modificaron de manera significativa la estructura de la sonda y la fluorescencia.
2. Se observó la formación de estructuras tipo cianina preferentemente en lugar de las especies tipo cromenilio.
3. Dado que no hubo formación del grupo oxonio no se observó sensibilidad a la oxidación salvo para las sondas con fragmento tipo cumarina.
4. Las sondas exhibieron emisión dual debido a diversos procesos fotofísicos entre ellos a los equilibrios estructurales que presentaron las sondas, entre formaciones ácida denominada forma “abierta” y la formación de un compuesto tipo lactona denominada forma “cerrada”.

7.2 RMN ^1H y ^{13}C

A continuación, se presentan los espectros de resonancia magnética de protón y carbono con su descripción correspondiente, de las sondas sintetizadas y de los intermediarios de reacción.

- Ácido 2-(4-(dimetilamino)-2-hidroxibenzoil) benzoico (**a**).

^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz espectro en **Figura 7.2.1**): δ 12.44 (s, 1H), 8.10 (d, 1H, $J = 8$), 7.63 (t, 1H, $J = 8$), 7.53 (t, 1H, $J = 8$), 7.36 (d, 1H, $J = 8$), 6.90 (d, 1H, $J = 12$), 6.16 (s, 1H), 6.08 (d, 1H, $J = 12$), 3.03 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400MHz espectro en **Figura 7.2.2**): 198.76, 170.08, 165.14, 155.98, 141.18, 134.33, 132.78, 131.08, 129.22, 127.99, 127.74, 110.36, 104.03, 97.78, 39.98. HRMS (ESI+, m/z espectro en **Figura 7.3.1**) calculada de 285.10, encontrada de 286.12.

- 9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-1,2,3,4-tetrahidroxantilo (**b**).

^1H NMR (DMSO, 400MHz espectro en **Figura 7.2.3**): δ 8.26 (d, 1H, $J = 8$), 7.92 (t, 1H, $J = 4$), 7.81 (t, 1H, $J = 4$), 7.40 (d, 1H, $J = 8$), 7.35 (d, 1H, $J = 8$), 7.20 (s, 1H), 7.06 (d, 1H, $J = 8$), 3.29 (s, 6H), 2.27-2.15 (m, 2H), 2.15-2.05 (m, 2H), 1.91 (t, 2H, $J = 8$), 1.71 (t, 2H, $J = 8$). ^{13}C NMR (DMSO, 400 MHz espectro en **Figura 7.2.4**) 170.39, 165.65, 164.37, 158.99, 157.58, 134.12, 131.25, 129.83,

129.35, 128.52, 121.31, 119.39, 117.24, 95.98, 55.38, 53.08, 29.41, 25.23, 21.38, 21.06. HRMS (ESI+, m/z espectro en **Figura 7.3.2**) calculada 348.16, encontrada 348.18.

- (*Z*)-10-(4-(2-carboxifenil)-7-(dimetilamino)-2*H*-cromen-2-ilideno)-11-oxo-2,3,6,7,10,11-hexahidro-1*H*,5*H*-pirano[2,3-*f*]pirido[3,2,1-*ij*]-4-quinolinio, **CCy(1) (c)**.

¹H NMR (700 MHz, Cloroformo-*d* espectro en **Figura 7.2.5**) δ/ppm 8.51 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.61 (dt, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.31 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.88 – 6.73 (m, 3H), 3.42 (m, 4H), 3.05 (s, 6H), 2.67 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 1.93 (m, 4H). ¹³C {¹H} NMR (175 MHz, MeCD₃ espectro en **Figura 7.2.6**) δ/ppm 171.5, 161.6, 161.2, 157.8, 156.8, 155.4, 152.1, 150.4, 144.2, 134.3, 129.1, 128.9, 128.7, 128.5, 128.2, 128.1, 127.9, 120.8, 114.5, 114.4, 111.3, 109.6, 104.7, 102.7, 95.9, 49.8, 49.3, 38.8, 28.7, 26.0, 19.7, 18.7, 18.6. HRMS (ESI+, m/z espectro en la **Figura 7.3.3**) 533.20 encontrado, 533.21 calculado.

- (*E*)-*N*-(3-((9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-2,3-dihidro-1*H*-xanten-4(9*H*)-ilideno)metil)-2-oxo-2,3-dihidro-7*H*-cromen-7-ilideno)-*N*-metilmetanaminio, **CCy(2) (d)**.

¹H NMR (300 MHz, Cloroformo-*d* espectro en **Figura 7.2.7**) δ 7.98 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.64 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.61 – 7.51 (m, 2H), 7.42 (s, 1H), 7.32 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.63 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 6.59 – 6.50 (m, 3H), 6.43 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 3.09 (d, *J* = 2.2 Hz, 6H), 3.00 (d, *J* = 2.1 Hz, 6H), 2.73 (s, 2H), 2.23 – 2.06 (m, 2H), 1.89 (s, 2H). ¹³C NMR (175 MHz, NMR espectro en **Figura 7.2.8**) δ 170.32, 168.44, 160.95, 154.69, 153.72, 149.70, 148.23, 140.99, 135.88, 134.49, 129.54, 128.41, 127.69, 126.33, 125.81, 125.17, 125.11, 123.53, 121.49, 119.84, 118.66, 116.06, 112.98, 112.76, 104.73, 49.05, 46.79, 43.38, 41.31, 28.12, 26.22, 23.16. HRMS (ESI+, m/z espectro en **Figura 7.3.4**) 547.22 encontrado 547. 22. **Nota: para este compuesto los estudios fueron preliminares y de forma comparativa; ya que se observó que el compuesto se descomponía después de algún tiempo.**

- (*E*)-3-((9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-2,3-dihidro-1*H*-xanten-4-il)metileno)-1-metil-3*H*-indol-1-ilo, **CCy(3) (e)**.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆ espectro en **Figura 7.2.9**) δ 8.64 (s, 1H), 8.39 – 8.10 (m, 3H), 7.82 (dt, *J* = 41.8, 7.4 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.56 – 7.30 (m, 4H), 7.18 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.28 (s, 6H), 2.88 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 2.32 (dd, *J* = 25.8, 19.0 Hz, 2H), 2.02 – 1.67 (m, 2H). ¹³C NMR (DMSO, 400MHz espectro en **Figura 7.2.10**) δ 168.44, 157.46, 155.73, 151.18, 150.64, 149.58, 137.53, 137.11, 135.38, 134.44, 131.70, 131.33, 131.00, 129.95, 129.90, 129.54, 127.64, 127.34, 127.28, 126.82, 125.03, 116.04, 113.44, 109.33, 96.80, 40.13, 39.74, 29.35, 26.32, 23.51. HRMS (ESI+, m/z espectro en **Figura 7.3.5**) 489.22 encontrado 489.26.

- (*E*)-*N*-(4-(3-(9-(2-carboxifenil)-dimetilamino)-2,3-dihidro-1*H*-xanten-4-il)alilideno)ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-*N*-metilmetanamonio, **CCy(4) (f)**.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 espectro en **Figura 7.2.11**) δ 8.22 (dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 7.85 (dtd, $J = 45.6, 7.6, 1.3$ Hz, 2H), 7.67 – 7.60 (m, 2H), 7.42 (dd, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H), 7.40 – 7.25 (m, 2H), 7.23 – 7.13 (m, 2H), 6.88 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 6.80 – 6.75 (m, 2H), 3.26 (s, 6H), 3.05 (s, 6H), 2.85 (dq, $J = 19.2, 6.8, 5.8$ Hz, 2H), 2.28 (dddd, $J = 42.3, 16.0, 7.3, 4.8$ Hz, 2H), 1.75 (ddd, $J = 22.7, 10.0, 5.8$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (DMSO, 400MHz espectro en **Figura 7.2.12**) 165.76, 162.98, 159.71, 157.30, 156.39, 152.47, 147.72, 141.97, 135.00, 134.03, 131.23, 130.69, 129.73, 129.01, 128.85, 124.41, 124.00, 122.31, 120.62, 117.14, 116.14, 112.60, 96.37, 53.02, 40.88, 26.35, 24.97, 20.87. (ESI+, m/z espectro en **Figura 7.3.6**) calculada 505.25 encontrado 505. 26.

- (*E*)-*N*-(4-((9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-2,3-dihidro-1*H*-xanten-4-il)metileno)-3-hidrox ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-*N*-etiletanaminio, **CCy(5) (g)**.

^1H NMR (400 MHz, Cloroformo- d espectro en **Figura 7.2.13**) δ 9.73 (s, 1H), 7.96 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.67 – 7.50 (m, 4H), 7.25 – 7.17 (m, 3H), 6.57 – 6.34 (m, 1H), 6.26 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 2.97 (s, 6H), 2.79 – 2.66 (m, 2H), 2.62 – 2.49 (m, 2H), 2.36 (d, $J = 6.7$ Hz, 5H), 2.07 (d, $J = 9.2$ Hz, 4H), 1.65 – 1.61 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz espectro en **Figura 7.2.14**) δ 168.44, 158.52, 155.69, 155.64, 152.61, 150.64, 137.53, 132.71, 131.66, 131.01, 129.97, 129.87, 129.67, 127.60, 127.41, 127.31, 125.77, 122.80, 121.44, 117.47, 116.16, 109.33, 102.27, 96.80, 48.52, 40.13, 28.65, 26.42, 23.63, 11.58. (ESI+, m/z espectro en **Figura 7.3.7**) calculada 523.65 encontrado 523. 28.

- *N*-(4-((9-(2-carboxifenil)-6-(dimetilamino)-2,3-dihidro-1*H*-xanten-4-il)metileno)ciclohexa-2,5-dien-1-ilideno)-*N*-metilmetanaminio, **CCy(6) (h)**.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 espectro en **Figura 7.2.15**) δ 7.95 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.79 (td, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H), 7.71 – 7.64 (m, 1H), 7.31 (dd, $J = 14.9, 8.2$ Hz, 4H), 6.76 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.61 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.43 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.35 (s, 2H), 2.96 (d, $J = 29.9$ Hz, 12H), 2.88 – 2.70 (m, 2H), 2.60 (d, $J = 41.8$ Hz, 1H), 1.93 – 1.80 (m, 2H). ^{13}C NMR (175 MHz espectro en **Figura 7.2.16**) δ 168.93, 155.61, 155.31, 154.36, 150.64, 137.53, 134.98, 134.22, 131.01, 130.34, 130.32, 130.11, 129.95, 129.67, 127.36, 127.28, 127.20, 125.84, 122.68, 116.04, 114.68, 114.64, 109.05, 96.80, 41.31, 40.13, 28.97, 26.41, 23.63. (ESI+, m/z espectro en **Figura 7.3.8**) calculada 501.22 encontrado 501.23.

Dado que las sondas sintetizadas conservaron gran parte de la estructura del compuesto **(a)**, los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C fueron muy similares. Entre las señales y desplazamientos similares se encuentran los protones del fragmento del ácido benzoico y los del fragmento del anillo del aminofenol. De la **Figura 7.2.1** se observa que en particular el protón H13 tiene el mayor desplazamiento químico lo cual adjudica a la desprotección electrónica generada por el carbonilo adyacente a dicho protón, mientras que el protón H10 presenta un mejor apantallamiento siendo el

de menor desplazamiento de dicho anillo aromático. Por otro lado, los protones del fragmento del aminofenol (protones H2, H4 y H6 de la **Figura 7.2.1**) tienen desplazamiento muy similares a los de la materia prima, el 3-dimetilaminofenol y estos también se conservan en todas las estructuras. Por último, los metilos de la amina también se conservaron y se observaron como singulete en valores entre 3.0 y 3.5 ppm. Mientras que en las sondas los metilos unidos al grupo iminio se presentaron a mayor desplazamiento en comparación con los de la amina, salvo para **CCy (5) (Figura 7.2.13)** donde los metilos no están unidos directamente al iminio, sino a metilenos, por lo que se observaron a menor desplazamiento en comparación de los metilos de la amina (puesto que están más protegidos) y también en el caso de **CCy (6) (Figura 7.2.15)** donde todos los metilos aparecen en el mismo desplazamiento. Por otra parte, para las sondas **CCy (2)** hasta la **CCy (6)** también hubo señales características en común provenientes de los metilenos del anillo alifático presente en todas las sondas que corresponden a los protones H16, H15 y H14 del compuesto **(b) (Figura 7.2.3)**.

De manera particular para el caso de la sonda **CCy (1) (Figura 7.2.5)** las señales características que se pueden identificar rápidamente son las correspondientes a los metilenos del fragmento de la cumarina (H30, H31, H32, H34, H35, H36). Por otro lado, para el caso de la sonda **CCy (2) (Figura 7.2.7)** presenta una señal muy característica que corresponde al protón H24 el cual debido a la forma tipo quinona en que se encuentra la molécula se desplaza hasta la zona de aromáticos sin serlo. Para el caso de **CCy (3) (Figura 7.2.9)** la señal característica sería el singulete que integra para tres, del metilo unido al iminio que se encuentra en un valor mayor al desplazamiento de los otros dos metilos. Para el caso de **CCy (4) (Figura 7.2.11)** las señales características serían la de los protones H39 y H40 que se encuentran a desplazamientos muy bajos debido a que se encuentran muy protegidos al formar parte de la conjugación tipo quinona. Para la sonda **CCy (5) (Figura 7.2.13)** la señal característica es el triplete que integra para seis protones correspondiente a los metilos (H34 y H 35) unidos a los metilenos con el grupo iminio. Y para el caso de la sonda **CCy (6) (Figura 7.2.15)** la señal característica puede ser el singulete del que integra para el protón H41 y que se encuentra a campo muy alto (aproximadamente 6 ppm) a pesar de ser alílico y esto es debido a que entra en la conjugación tipo quinona. Algo similar se observaron en las otras sondas en los protones que conectaban ambos fragmentos. Finalmente, para el caso de los espectros de resonancia de carbono se observaron las señales características de los carbonos alifáticos correspondientes a los metilos de la amina y del iminio, además de los del anillo sin aromaticidad.

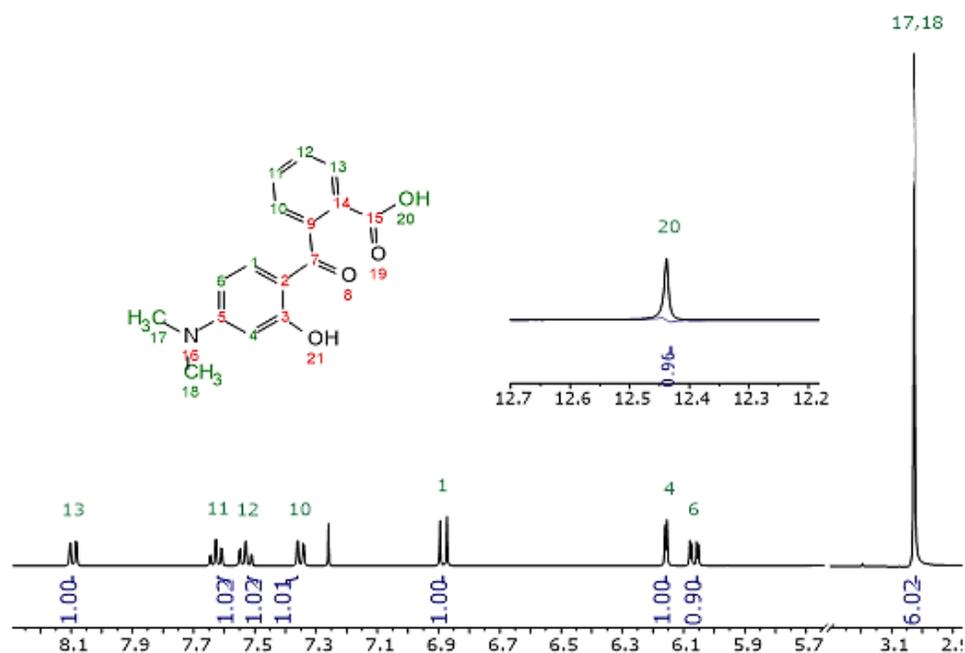


Figura 7.2.1 Espectro de RMN de ^1H del compuesto (a).

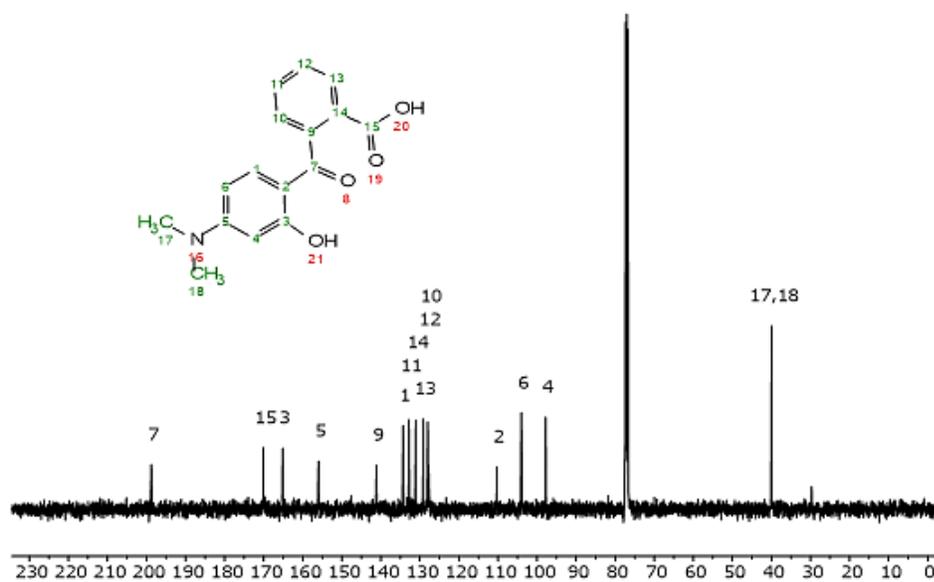


Figura 7.2.2 Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto (a).

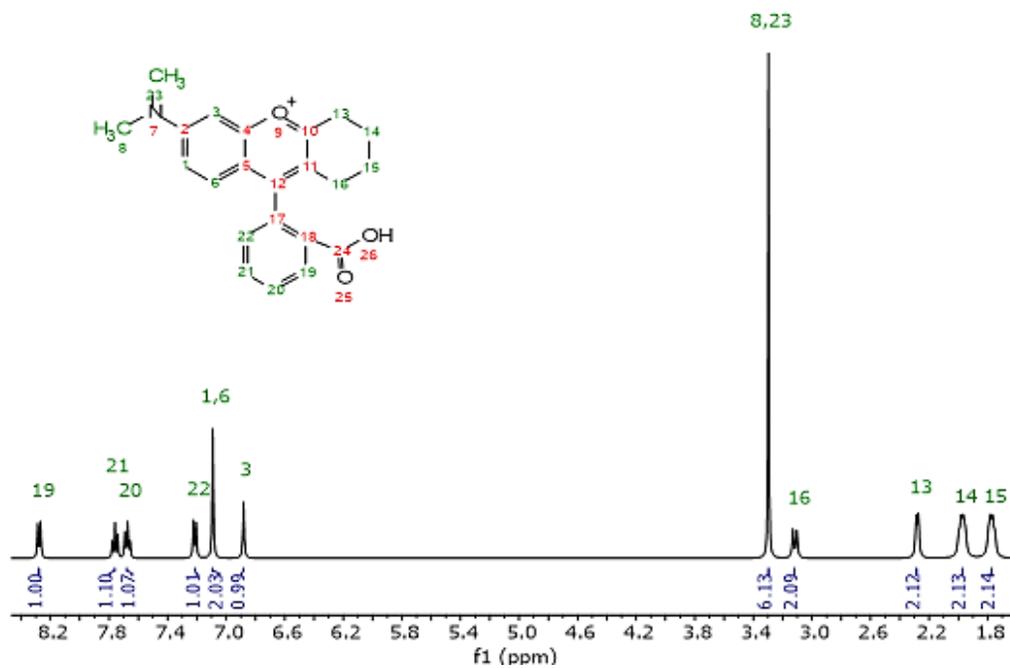


Figura 7.2.3 Espectro de RMN de ¹H del compuesto (b).

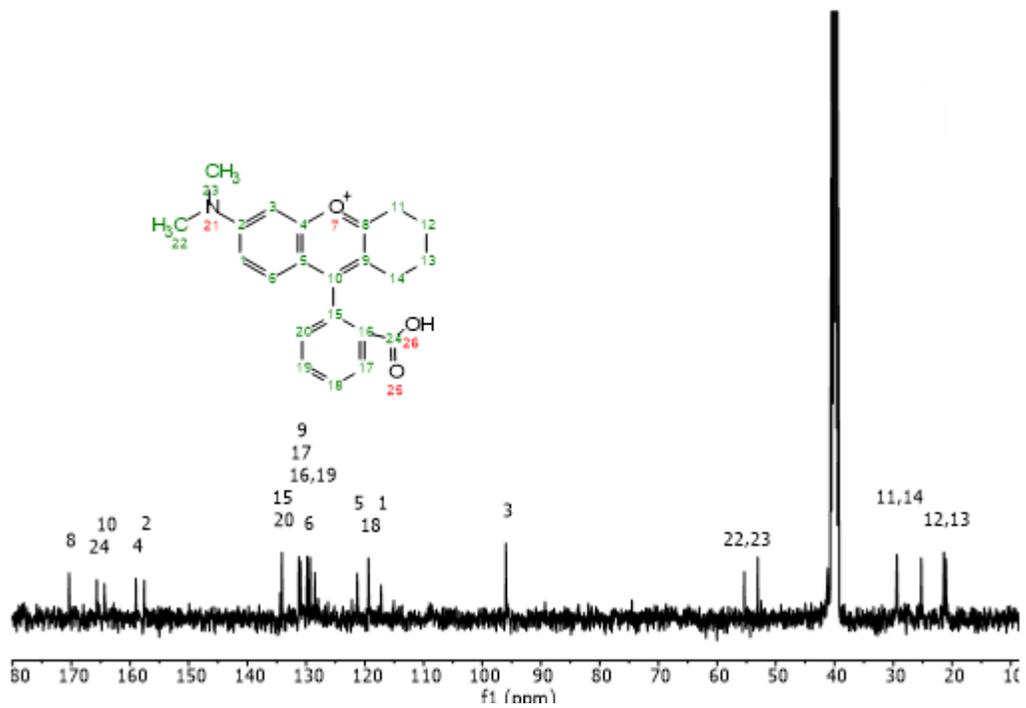


Figura 7.2.4 Espectro de RMN de ¹³C del compuesto (b).

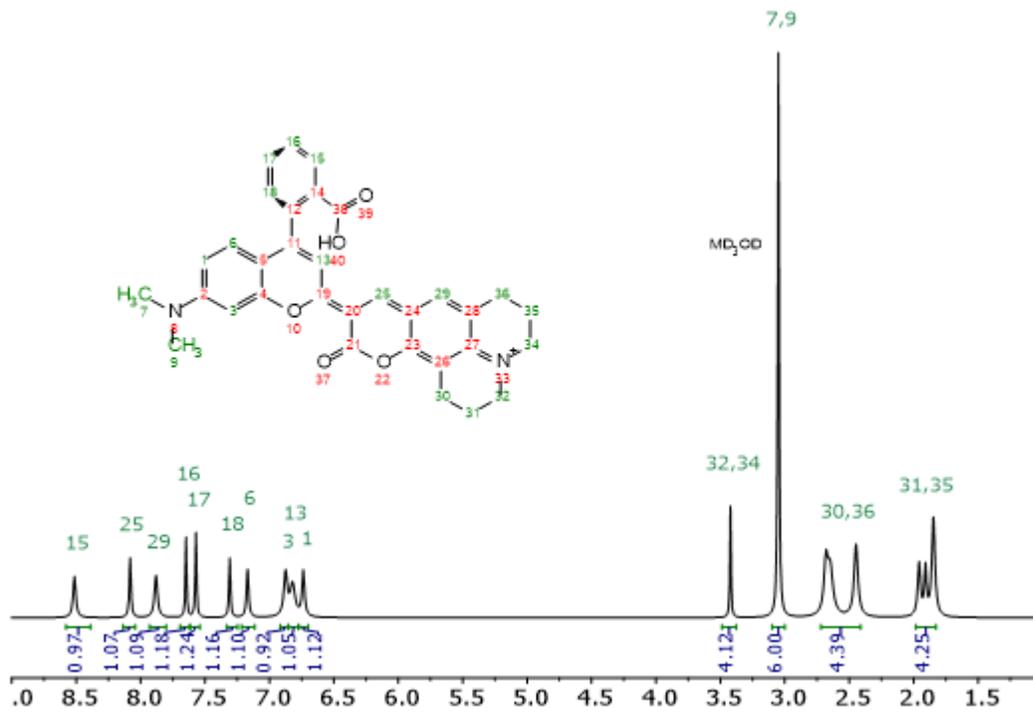


Figura 7.2.5 Espectro de RMN de ^1H del compuesto **CCy (1) (c)**.

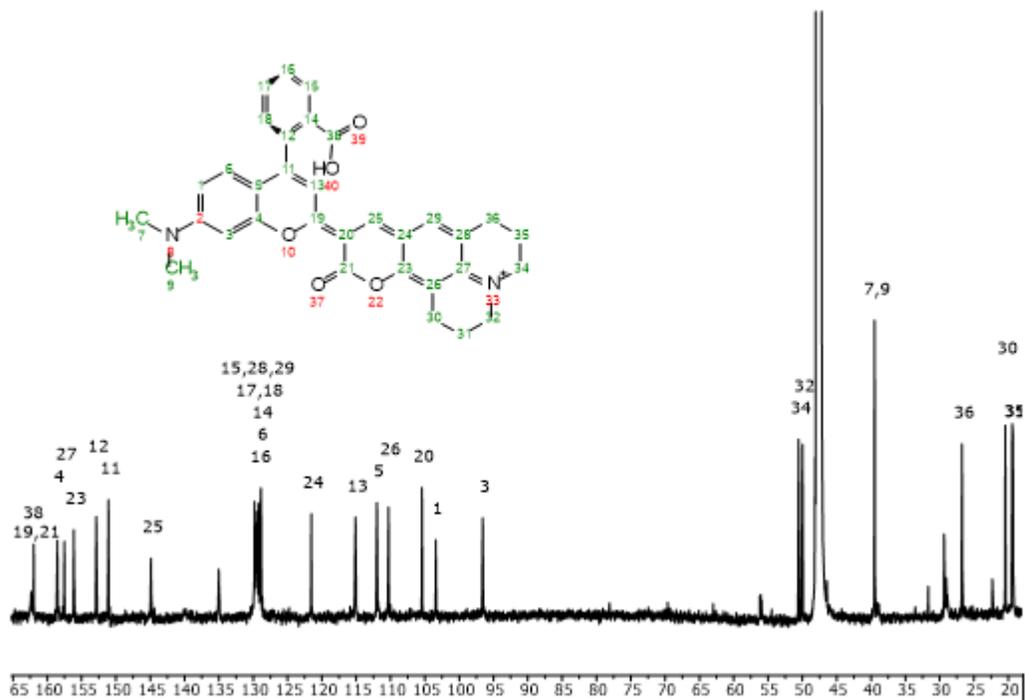


Figura 7.2.6 Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **CCy (1) (c)**.

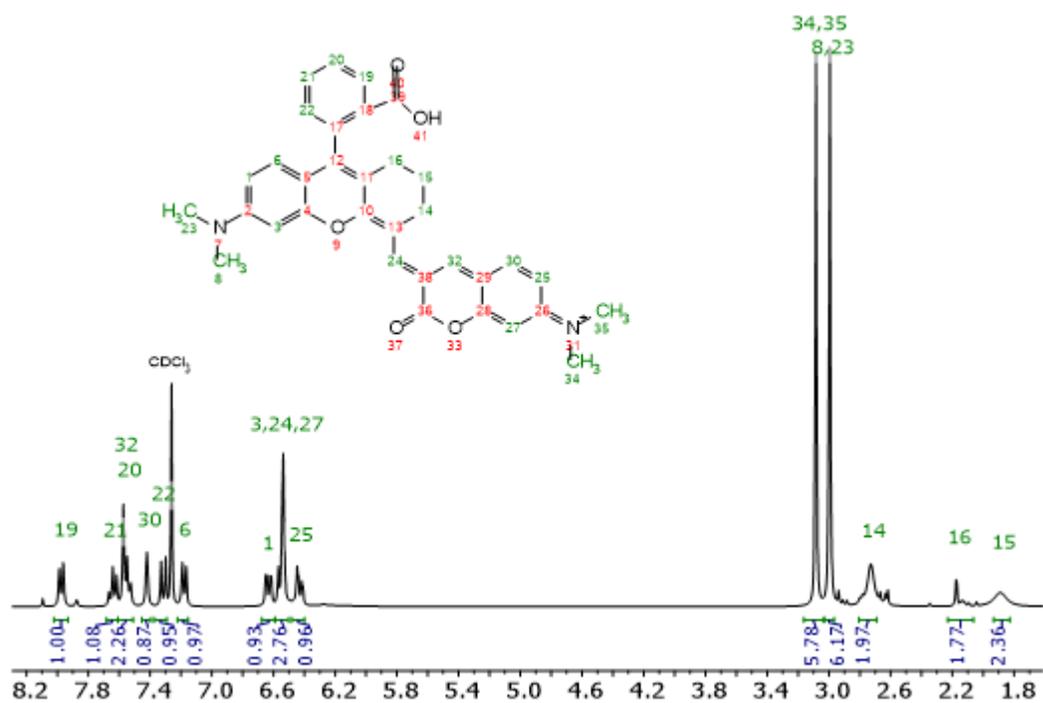


Figura 7.2.7 Espectro de RMN de ¹H del compuesto **CCy (2) (d)**.

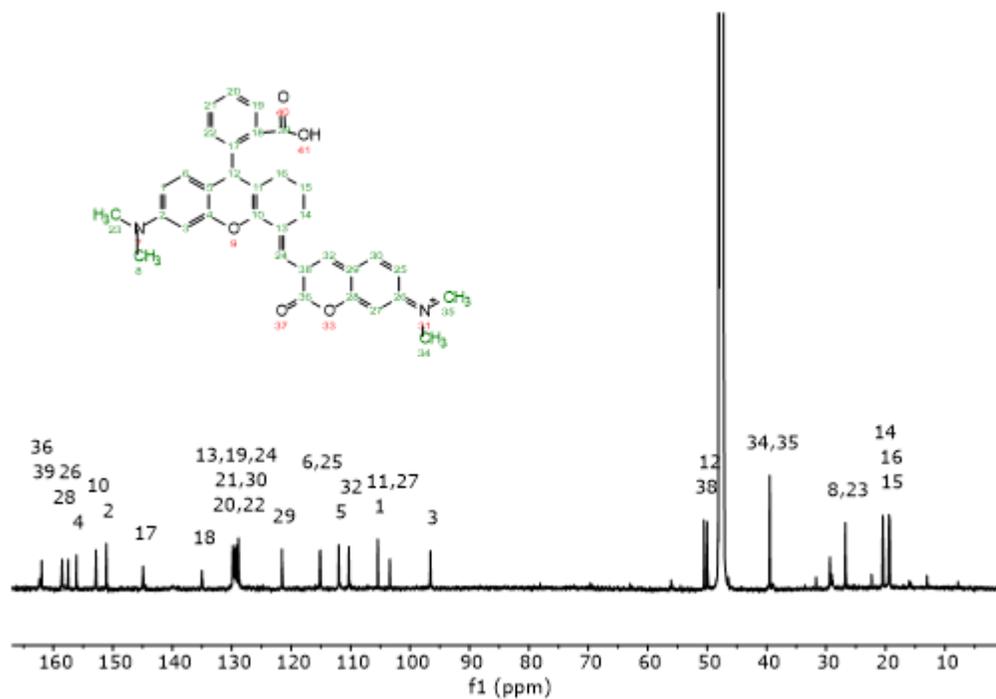


Figura 7.2.8 Espectro de RMN de ¹³C del compuesto **CCy (2) (d)**.

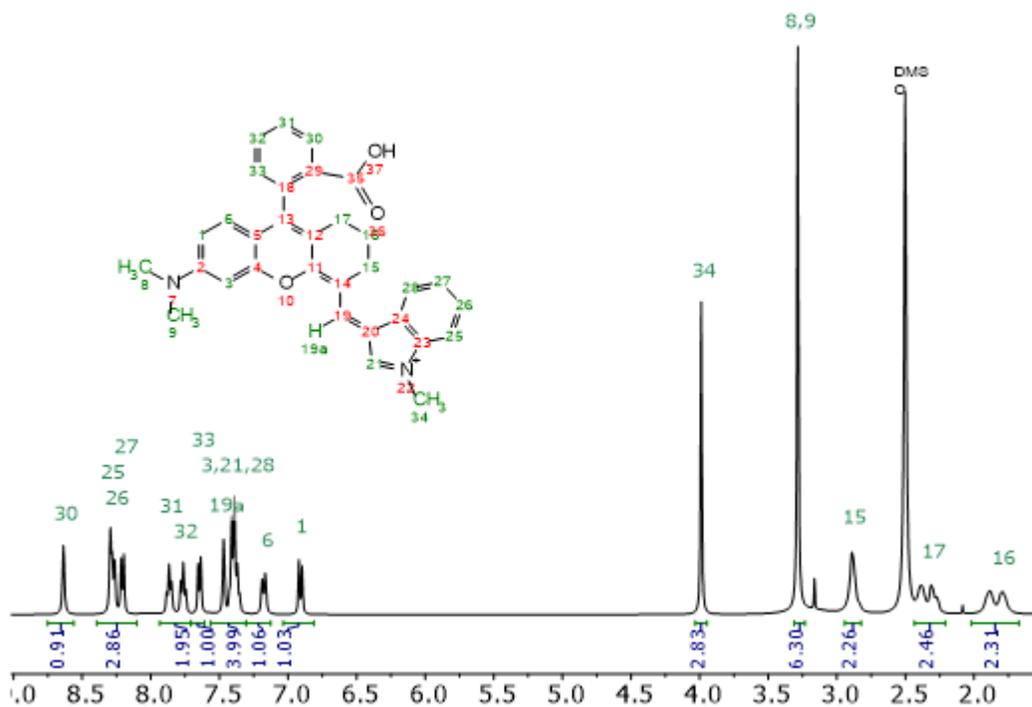


Figura 7.2.9 Espectro de RMN de ^1H del compuesto **CCy(3)** (e).

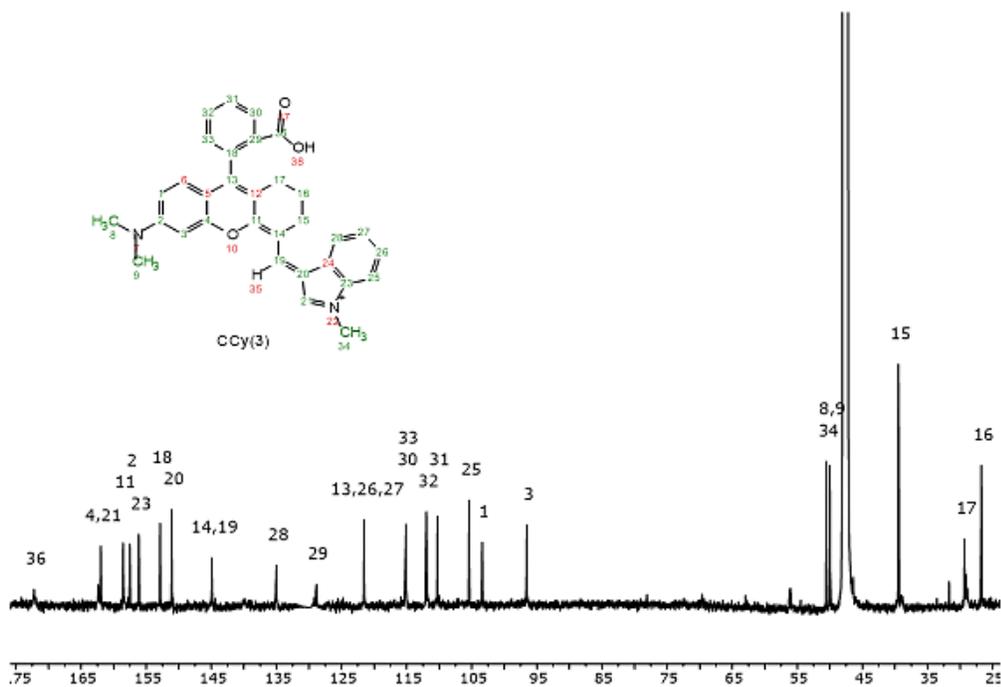


Figura 7.2.10 Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **CCy(3)** (e).

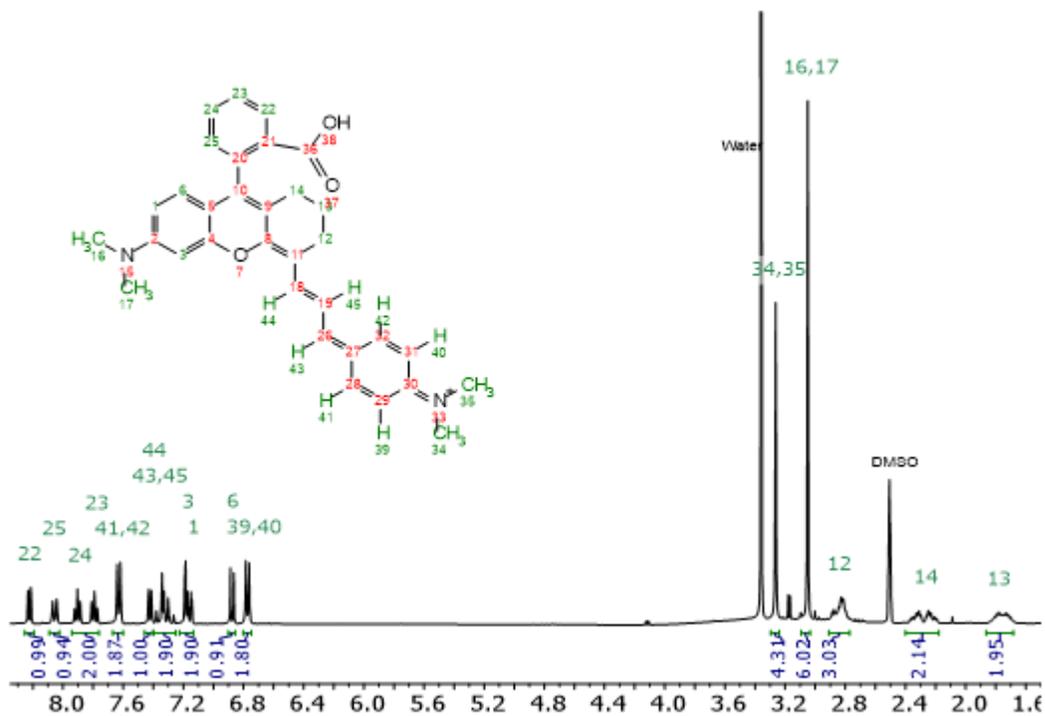


Figura 7.2.11 Espectro de RMN de ^1H del compuesto **CCy (4) (f)**.

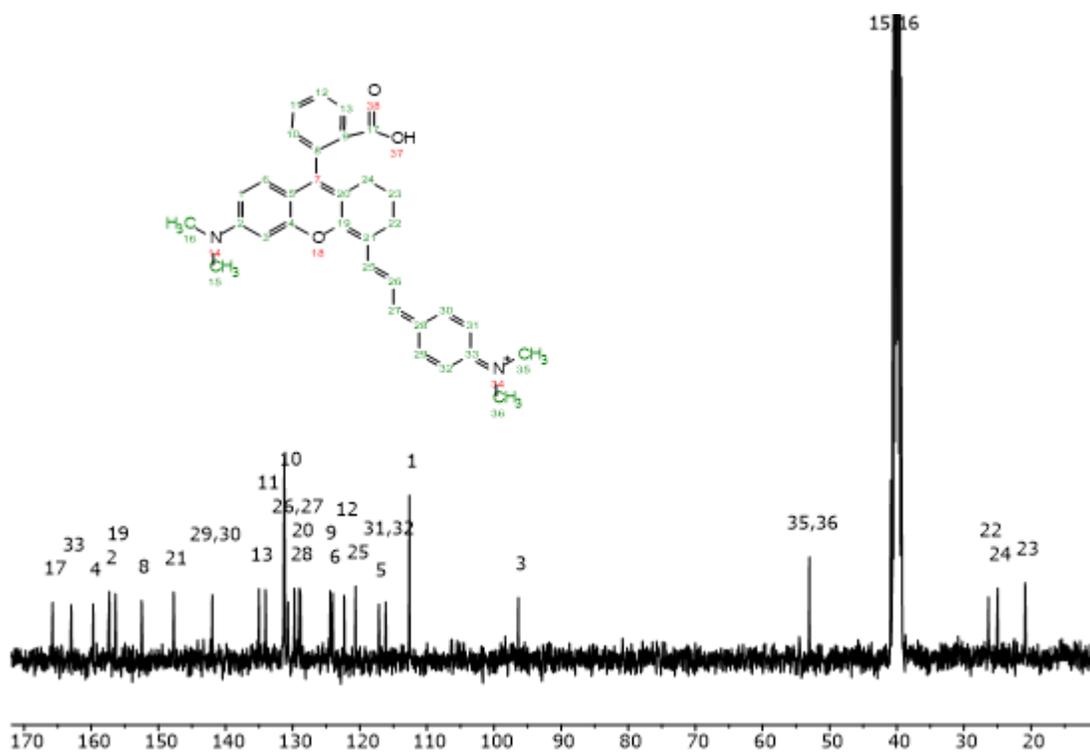


Figura 7.2.12 Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **CCy (4) (f)**.

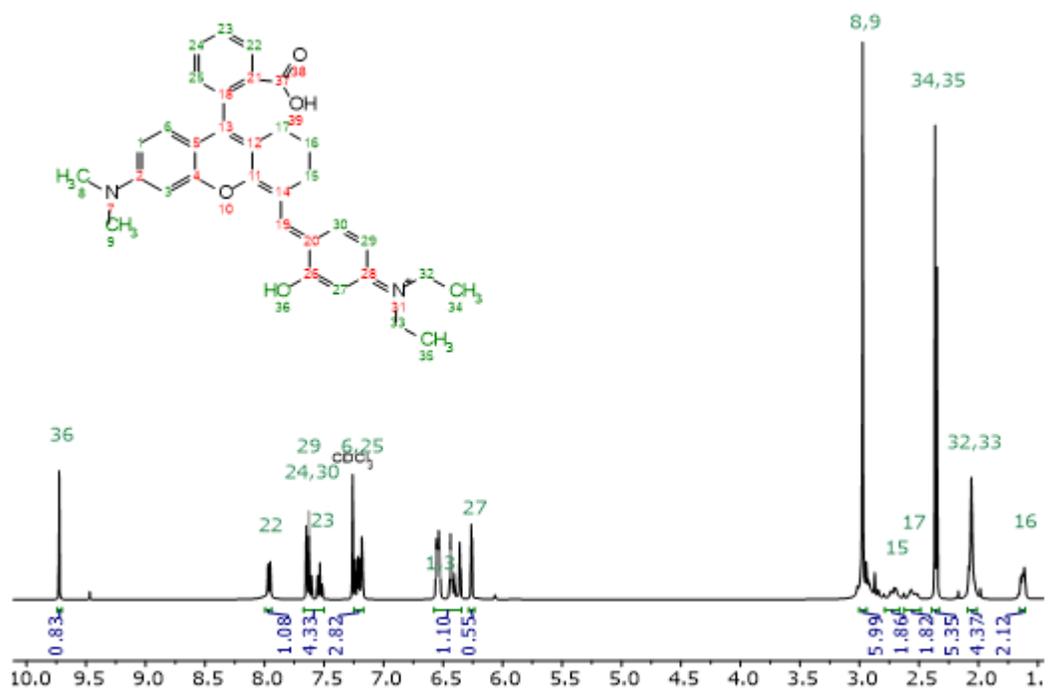


Figura 7.2.13 Espectro de RMN de ^1H del compuesto **CCy (5) (g)**.

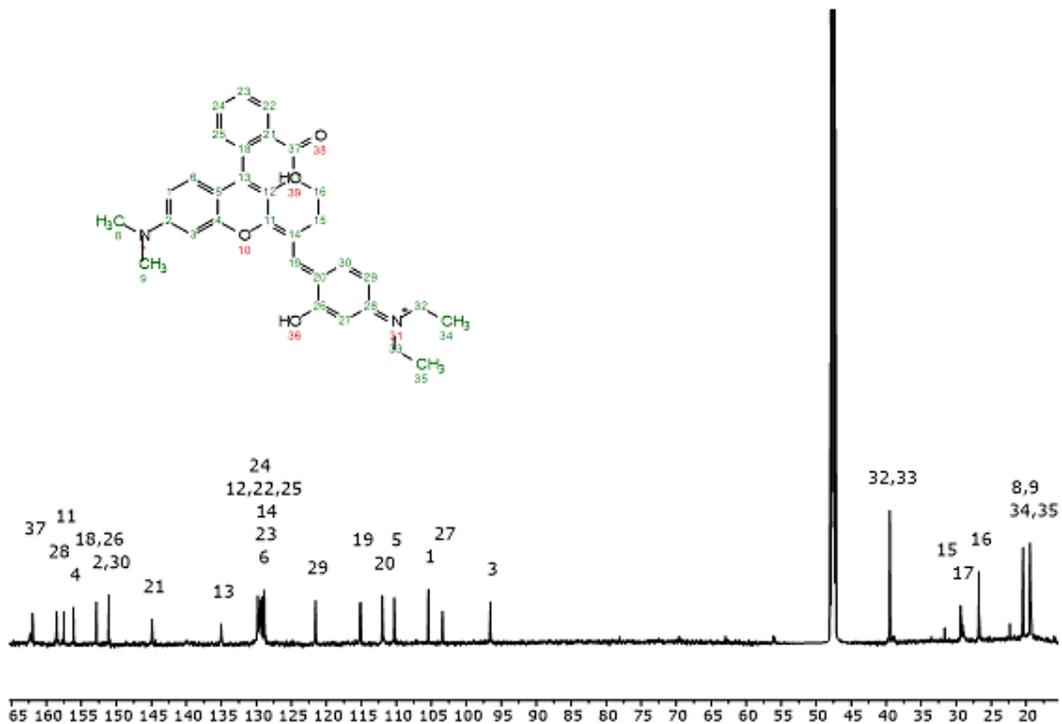


Figura 7.2.14 Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **CCy (5) (g)**.

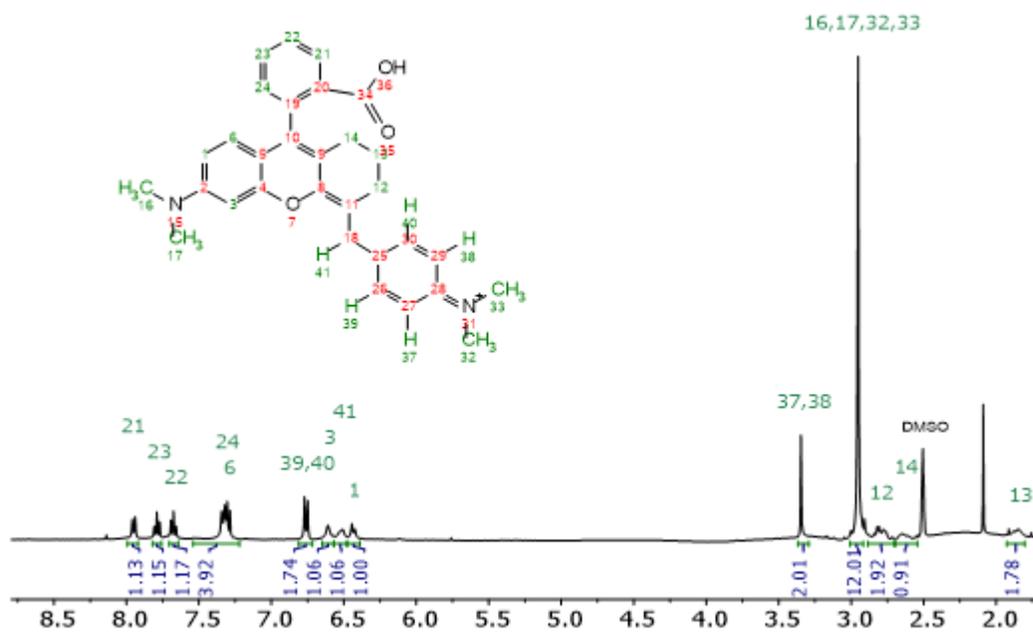


Figura 7.2.15 Espectro de RMN de ^1H del compuesto CCy (6) (h).

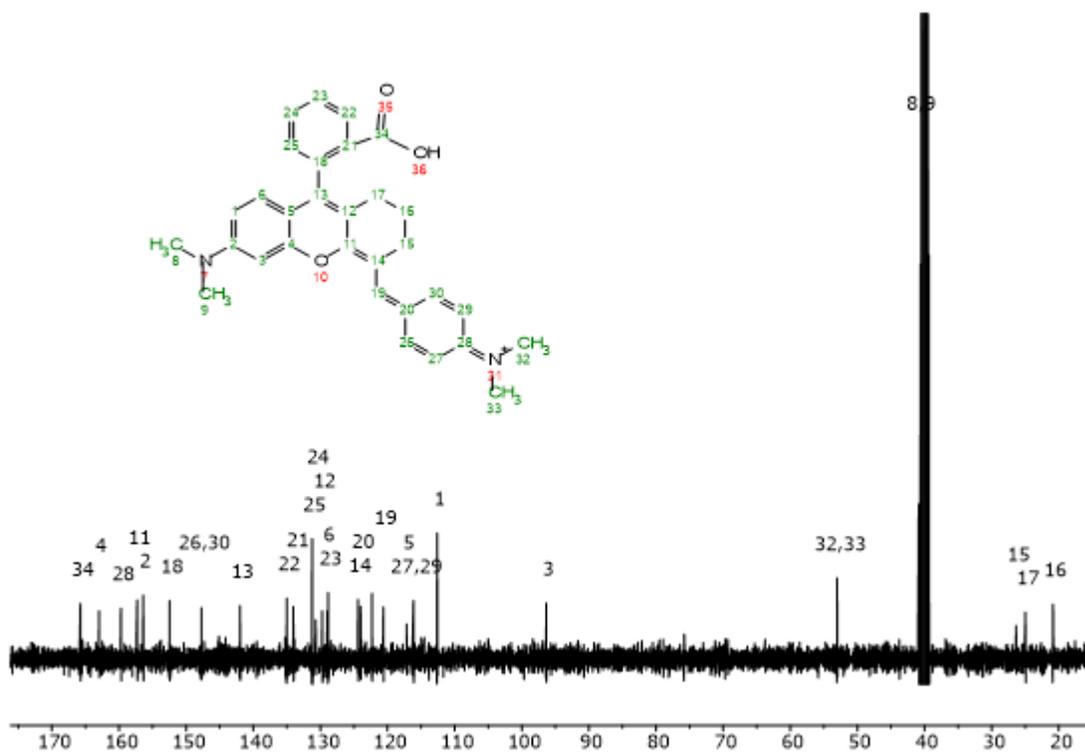


Figura 7.2.16 Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto CCy (6) (h).

7.3. Espectrometría de masas de alta resolución

Para el caso del compuesto **(a)** no se realizó mayor purificación, es por ello que en espectro de masas se pueden observar diferentes señales carga masa (**Figura 7.3.1**), pero el pico base corresponde a la señal masa del producto deseado. Posteriormente, en la **Figura 7.3.2** el espectro del compuesto **(b)** el cual fue purificado, el espectro presenta dos señales principales, el pico base corresponde a el compuesto cromenilio unido a la dimetilamina, al ácido benzoico y al ciclo alifático, pero con la presencia de sodio en lugar del protón en el ácido. La segunda señal a menor relación carga masa, se observa el compuesto de interés en su forma ácida. Para el caso del espectro para **CCy (1)** (**Figura 7.3.3**) se observa el pico base del ion molecular de la sonda y apenas son visibles algunas otras señales que corresponden a la fragmentación de la sonda. Para los casos de las sondas de **CCy (2) - CCy (5)** (**Figuras 7.3.4 – 7.3.7**), se observaron únicamente las señales correspondientes al ion molecular. Finalmente, en la **Figura 7.3.8** para **CCy (6)** se observa un espectro de masas con dos señales que corresponden al ion molecular sustituido con uno y con dos cationes de sodio.

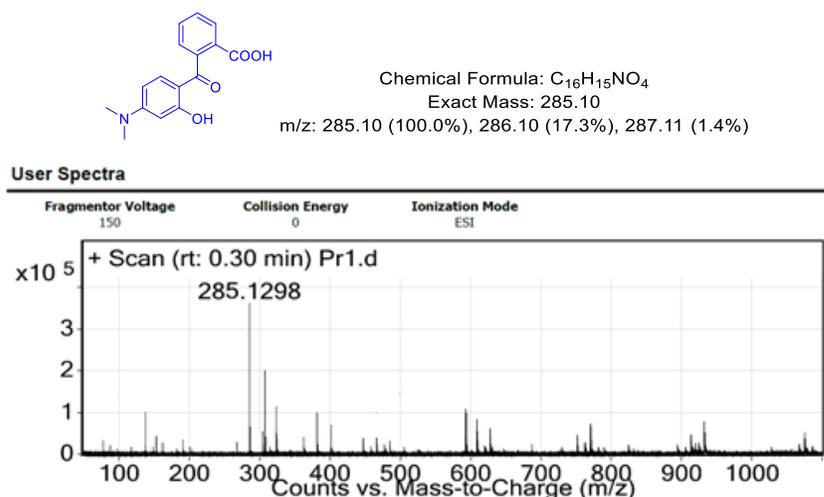


Figura 7.3w3.1 Espectro de masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto **(a)**.



Chemical Formula: $C_{22}H_{22}NO_3^+$
 Exact Mass: 348.16
 m/z: 348.16 (100.0%), 349.16 (23.8%), 350.17 (2.7%)

User Spectra

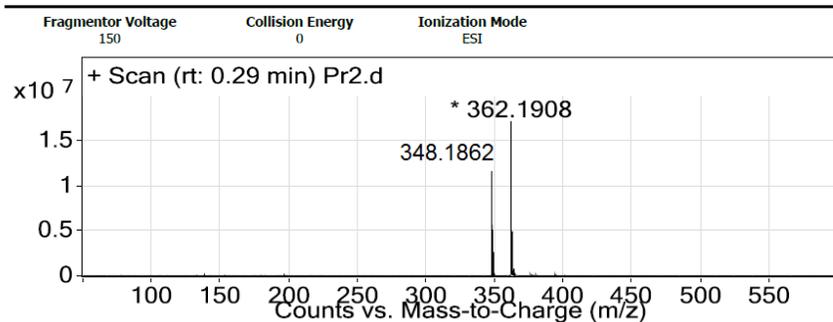
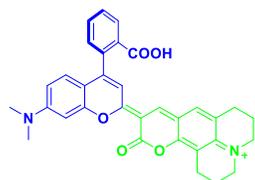


Figura 7.3.2 Espectro de masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto (b).



Chemical Formula: $C_{33}H_{29}N_2O_5^+$
 Exact Mass: 533.21
 m/z: 533.21 (100.0%), 534.21 (36.2%), 535.21 (7.5%),
 536.22 (1.1%)

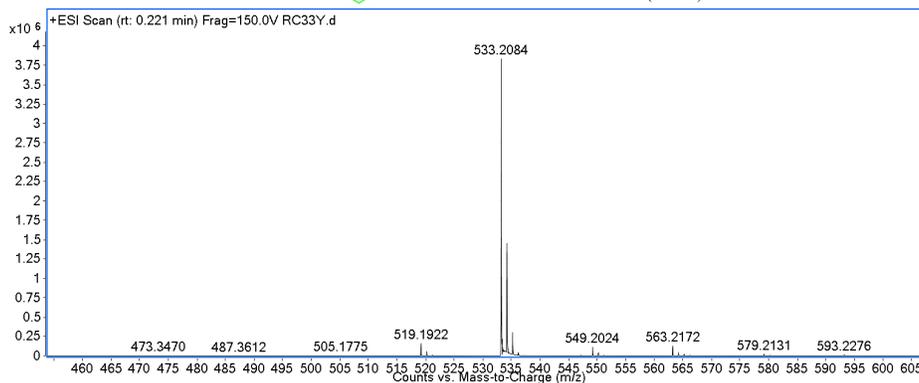
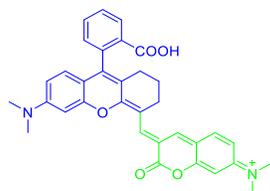


Figura 7.3.3 Espectro de masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto CCy (1) (c).



Chemical Formula: $C_{34}H_{31}N_2O_5^+$

Exact Mass: 547.22

Molecular Weight: 547.63

m/z: 547.22 (100.0%), 548.23 (37.3%), 549.23 (7.8%),

User Spectra

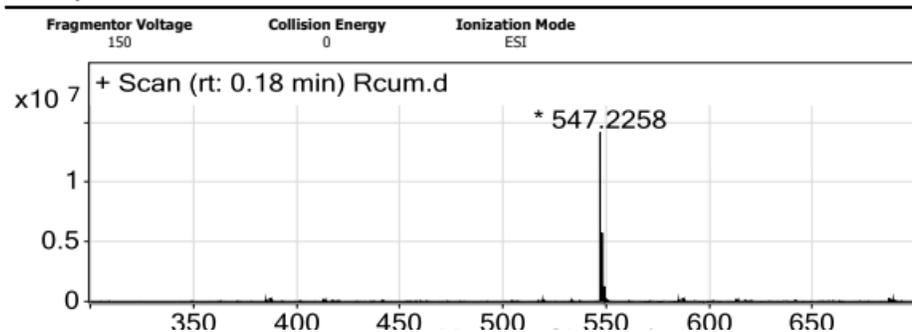
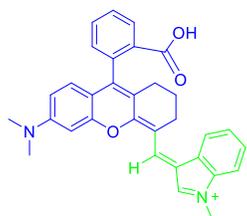


Figura 7.3.4 Espectro de masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto **CCy (2) (d)**.



Chemical Formula: $C_{32}H_{29}N_2O_3^+$

Exact Mass: 489.22

Molecular Weight: 489.59

m/z: 489.22 (100.0%), 490.22 (35.1%), 491.22 (6.7%)

User Spectra

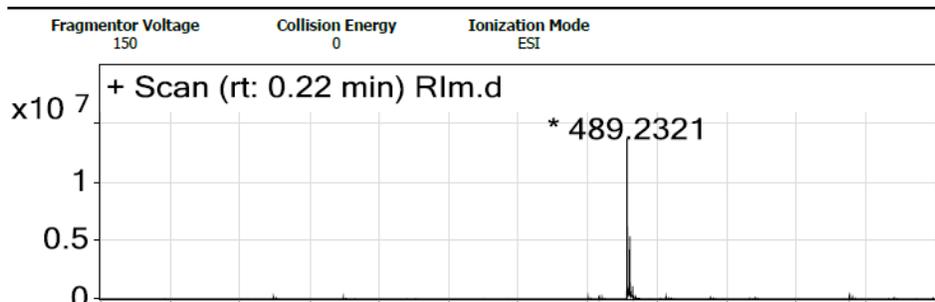
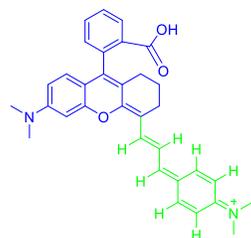


Figura 7.3.5 Espectro de masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto **CCy (3) (e)**.



Chemical Formula: $C_{33}H_{33}N_2O_3^+$
 Exact Mass: 505.25
 Molecular Weight: 505.64
 m/z: 505.25 (100.0%), 506.25 (36.5%), 507.26 (6.4%)

User Spectra

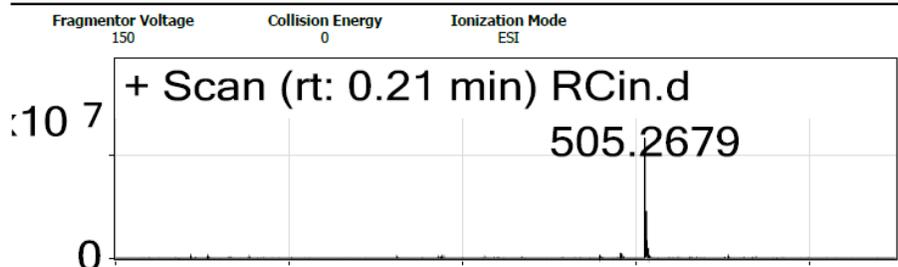
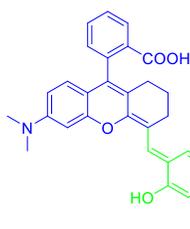


Figura 7.3.6 Espectro de masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto **CCy (4) (f)**.



Chemical Formula: $C_{33}H_{35}N_2O_4^+$
 Exact Mass: 523.26
 Molecular Weight: 523.65
 m/z: 523.26 (100.0%), 524.26 (36.6%), 525.27 (6.4%), 525.26 (1.1%), 526.27 (1.0%)

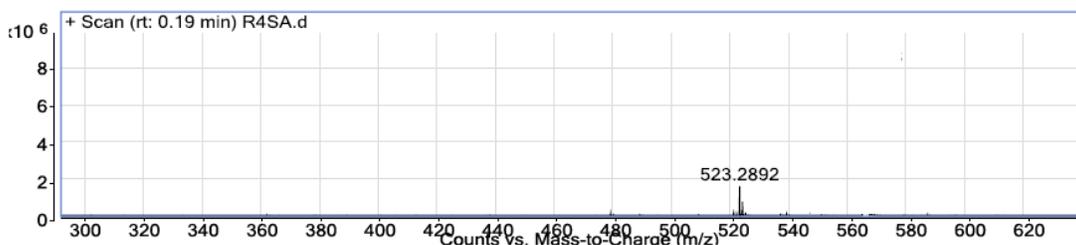
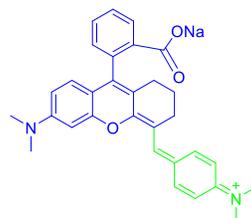


Figura 7.3.7 Espectro de masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto **CCy (5) (g)**.



Chemical Formula: $C_{31}H_{30}N_2NaO_3^+$
 Exact Mass: 501.21
 Molecular Weight: 501.58
 m/z: 501.22 (100.0%), 502.22 (34.0%), 503.22 (6.3%)

User Spectra

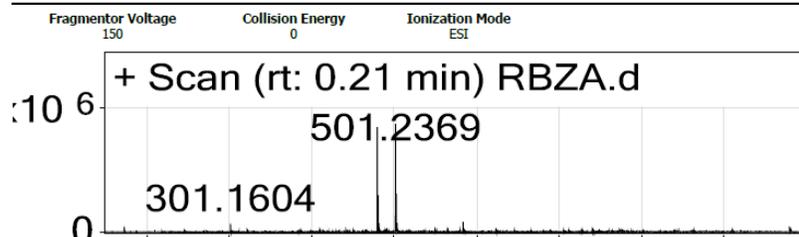


Figura 7.3.8 Espectro de masas de alta resolución ESI-TOF del compuesto **CCy (6) (h)**.

7.4 Caracterización fotofísica

7.4.1 Determinación de constantes de acidez pK_a

Previamente a determinar las constantes de acidez mediante la titulación ácido base, se obtuvieron los espectros de absorción y emisión de las sondas en dos disolventes con parámetros de Catalán SA y SB opuestos, el hexafluoroisopropanol (HFIP) y la *N,N'*-dimetilformamida (DMF), para observar las diferencias en ambientes ácido y básico con solvatación en un medio no acuoso.

Con todas las moléculas se observó un comportamiento similar tanto en los espectros de absorción y emisión justo como puede apreciarse en la **Figura 7.4.1**. De la figura se observan los espectros de absorción A) en DMF y C) en HFIP, mientras que en las figuras B) y D) se observan los espectros de emisión en HFIP y DMF respectivamente. Los espectros de absorción en DMF de las moléculas tienen prácticamente una única banda de absorción que se presenta entre los 300 y 500 nm, dependiendo de la sonda. Mientras que los espectros de emisión de fluorescencia en el mismo disolvente presentan de igual forma una única banda de emisión alrededor de los 500 nm, para cualquier sonda, salvo la única excepción es la molécula **CCy (1)** que tiene emisión dual con una banda alrededor de 500 nm y la otra alrededor de 700 nm. Por otro lado, los espectros de absorción en HFIP presentaron más de una banda de absorción lo que indica que desde el estado basal hay diferentes especies en ambos disolventes. Mientras que para las demás sondas la emisión en HFIP fue similar que en DMF con una única banda de absorción alrededor de los 500 nm, pero es evidente que la intensidad de la emisión disminuyó con respecto a las sondas en DMF. Nuevamente la única sonda que presentó emisión dual en HFIP fue **CCy (1)**, sin embargo, en este caso se observó un aumento en la intensidad de la banda de 700 nm y una ligera disminución de la banda de 500 nm.

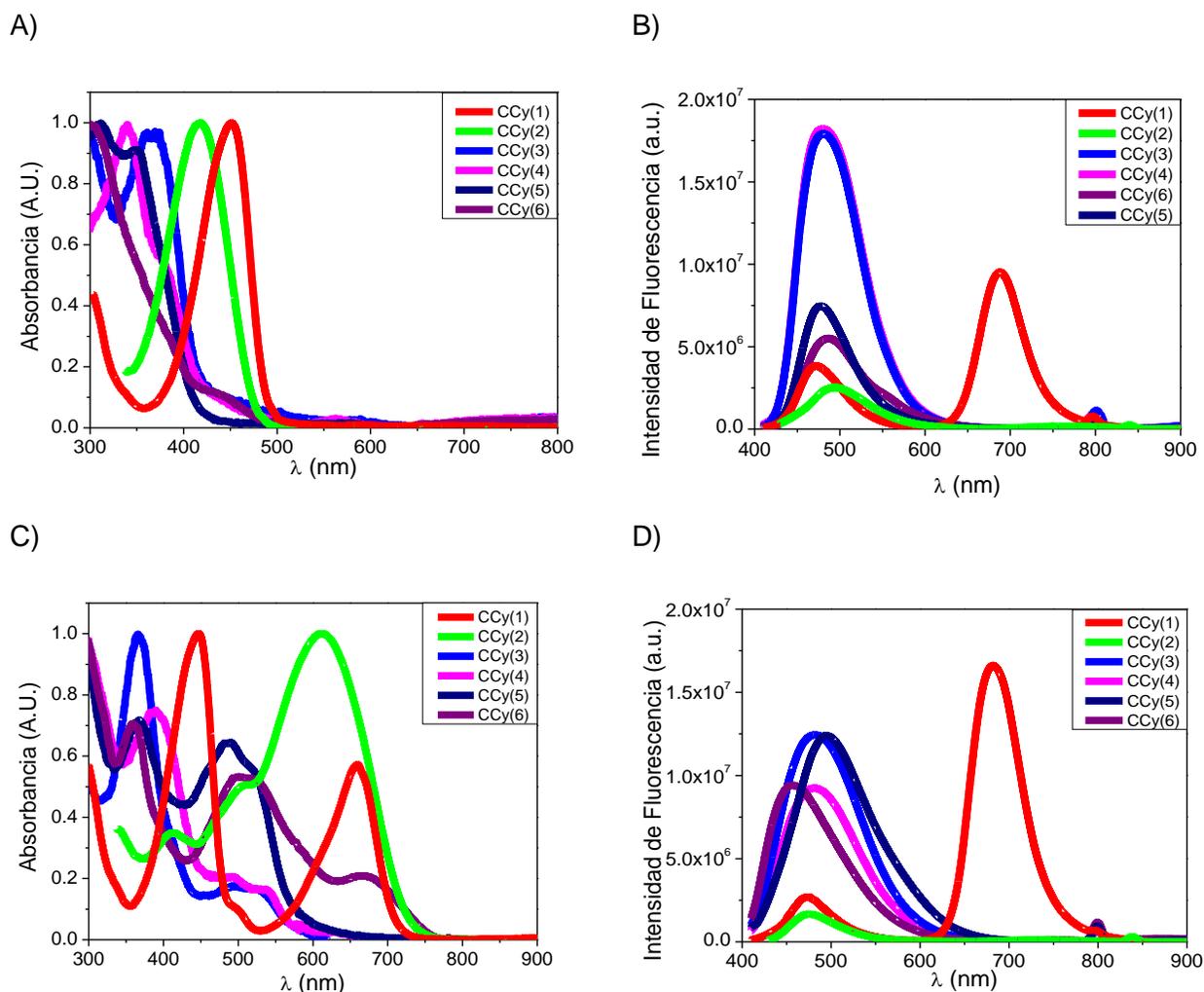


Figura 7.4.1 Espectros de A) absorción y B) emisión de los compuestos **CCy** en DMF. C) Espectros de absorción y D) emisión de los compuestos **CCy** en HFI.

Por otra parte, se hicieron titulaciones ácido-base de las sondas con HCl y NaOH valorados, y se tomaron los espectros de absorción y emisión, para determinar los valores de pK_a de las moléculas, mediante ajustes a las ecuaciones presentadas en el **Apéndice 1** y **Apéndice 2**. Los espectros y ajustes obtenidos se presentan en la **Figura 7.4.2**. Nuevamente las sondas presentaron en general comportamientos similares. Todas las sondas presentaron equilibrios ácido-base que pueden observarse desde el estado basal con los cambios en los espectros de absorción. En absorción se observa que al aumentar el pH las bandas que se encuentran a mayores longitudes de onda decrecen, en algunos casos hasta desaparecer y dejan solo bandas que se encuentran a menor longitud de onda en el espectro, lo cual puede significar una disminución de la deslocalización electrónica en el estado basal. Solo en dos casos se observa algo contrario, con las sondas **CCy (4)** y **CCy (5)** se aprecia que al aumentar el pH la banda de absorción principal se desplaza a mayores longitudes de onda, mientras que la que disminuye es la de menor longitud de onda. Lo

anterior puede indicar el comportamiento contrario, que la conjugación aumenta al aumentar el pH, o que se está estabilizando más la especie con mayor conjugación en pH básico, para dichas sondas **CCy (4)** y **CCy (5)**. Por otra parte, en el caso de los espectros de emisión la consistencia fue la misma en todas las sondas, al aumentar el pH la fluorescencia aumentaba. Además, todas las sondas presentaron una única banda de emisión, lo cual se adjudica a la solvatación en agua, ya que incluso para el compuesto **CCy (1)** que se había observado emisión dual tanto en HFIP como en TFA, en agua no es perceptible la banda de 700 nm. Posteriormente se hicieron ajustes con las gráficas que aparecen insertadas en los espectros de absorción y emisión. Con ello se determinaron las constantes de acidez para las moléculas haciendo ajustes a las ecuaciones anteriormente mencionadas y referidas al apéndice, de los ajustes se obtuvieron valores de pK_a que se reportan en la **Tabla 7.4.1** al final de este capítulo.

Se determinaron en general dos constantes de acidez en todas las moléculas por lo que se propuso el equilibrio de especies presentado en la **Figura 7.4.3**. Los colores de las gráficas representan las especies que estarían formadas principalmente a cierto valor de pH. Basándose en los espectros de absorción se propusieron las especies que se podían formar según los máximos de absorción. Para todos los compuestos se propuso que en medio muy ácido se formaba la especie iminio en ambos grupos amino, de tal forma que la conjugación está deslocalizada de un grupo amino al otro. La segunda especie que se forma a pH menos ácido es resultado de la desprotonación de la amina que proviene desde el **precursor (a)** (**Apéndice 3**, espectros de absorción y emisión), sin que se modifique la conjugación respecto a la especie más ácida. Y la tercera especie que se forma a pH básico, es una *espirolactona* resultado de la desprotonación y ciclación del ácido carboxílico presente, esta especie sí presenta un cambio en la conjugación total de la especie, disminuyéndola. El cambio en los máximos de absorción entre la familia de las sondas es debido a la diferencia en la longitud de la conjugación de cada molécula. Algo destacable que mencionar es que para la molécula **CCy (6)** no fue posible observar el segundo equilibrio, ni determinar la constante de formación de la *espirolactona*, lo que nos indicó que la especie no forma la *espirolactona* y se mantiene como la especie zwitteriónica, lo cual está muy de acuerdo con lo observado posteriormente en la determinación del coeficiente de partición. Dado que las moléculas son altamente lipofílicas debido a su gran conjugación, la mayoría presentó un coeficiente de partición positivo, salvo la molécula **CCy (6)** porque al estabilizarse la especie zwitteriónica, es solvatada por moléculas de agua que la hacen más afín a la fase acuosa y eso se observó puesto que fue la única especie con coeficiente de partición negativo.

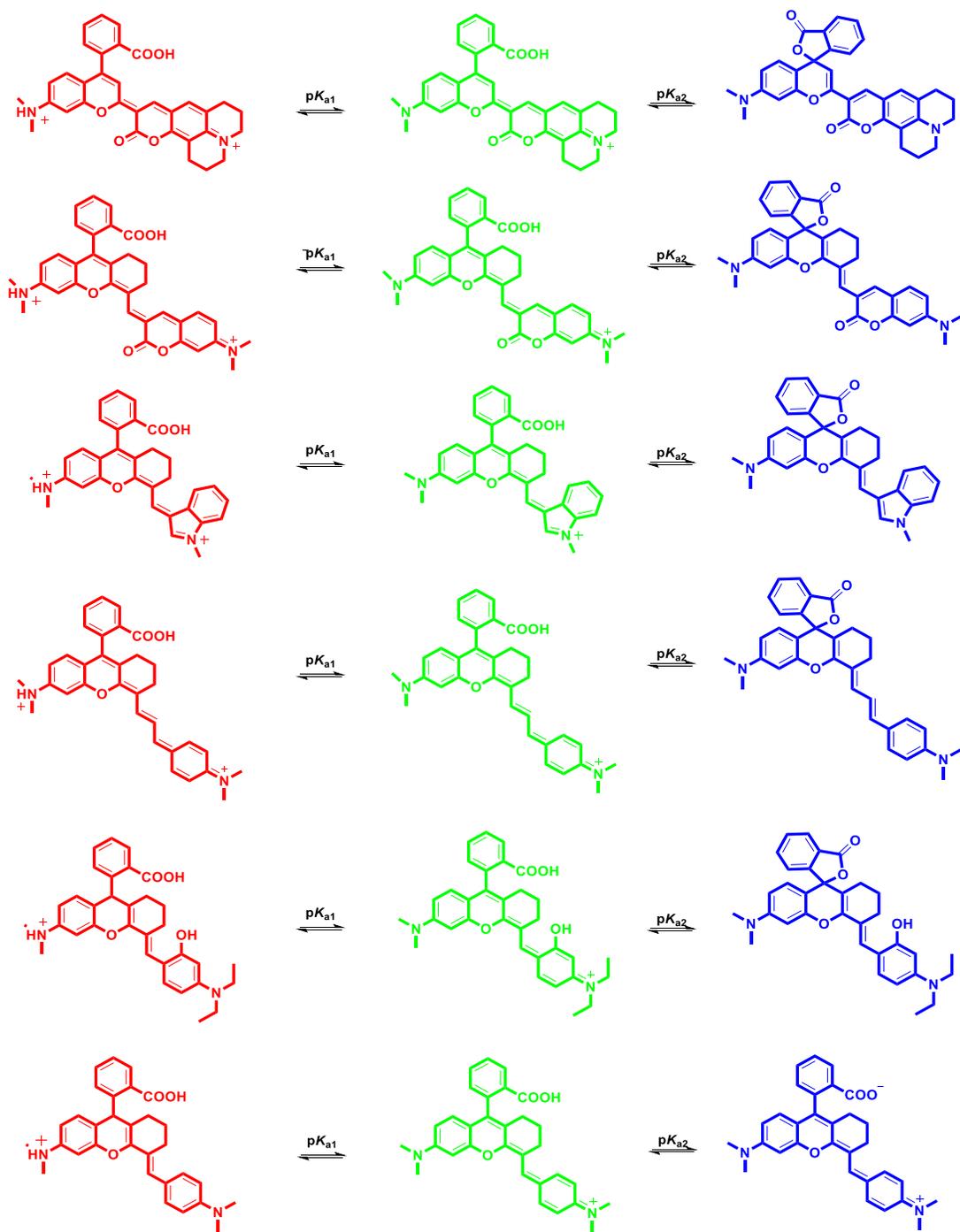
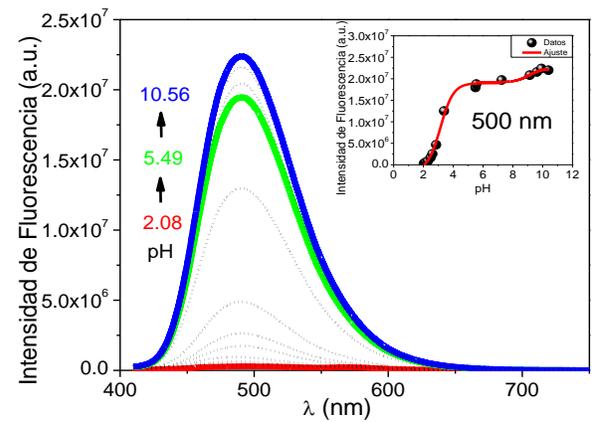
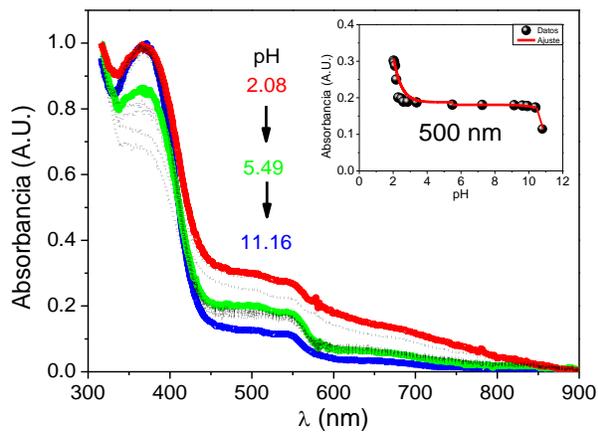
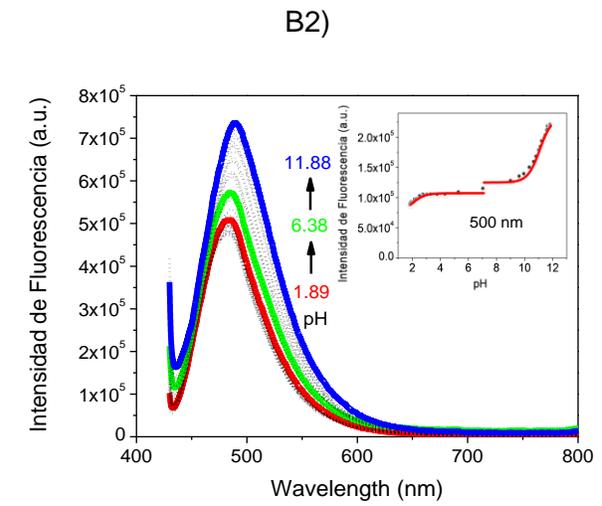
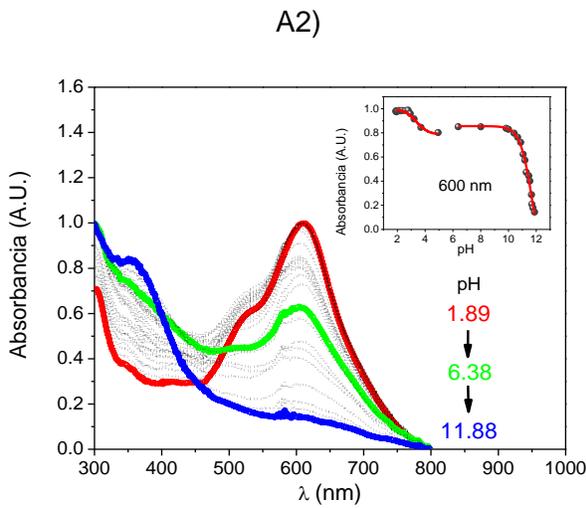
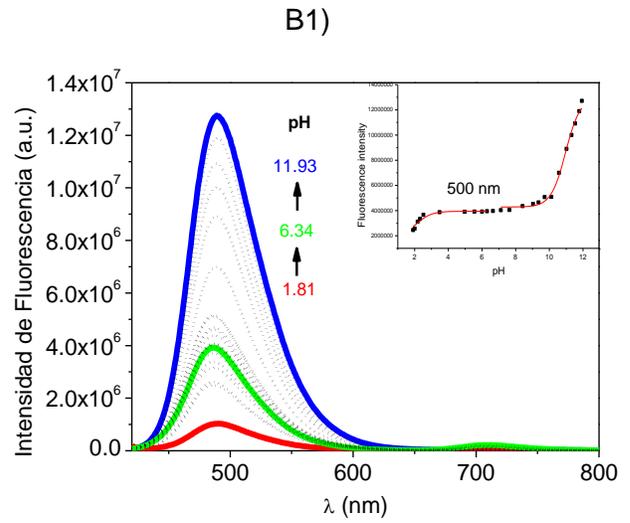
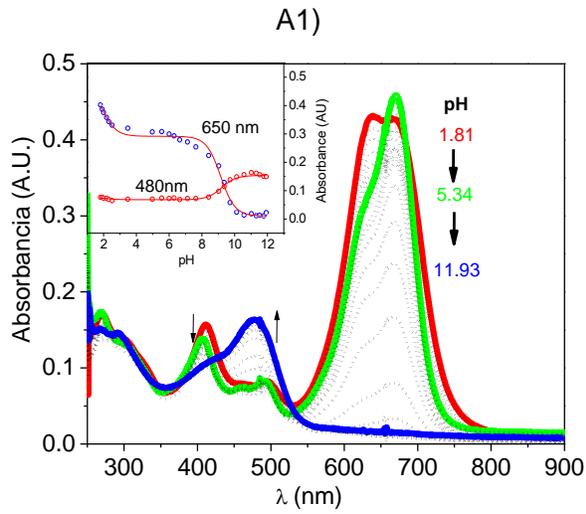


Figura 7.4.2 Esquema del equilibrio de especies general para las sondas **CCy**. Sondas presentadas en orden de arriba hacia abajo CCy (1) a CCy (6), correspondientemente.



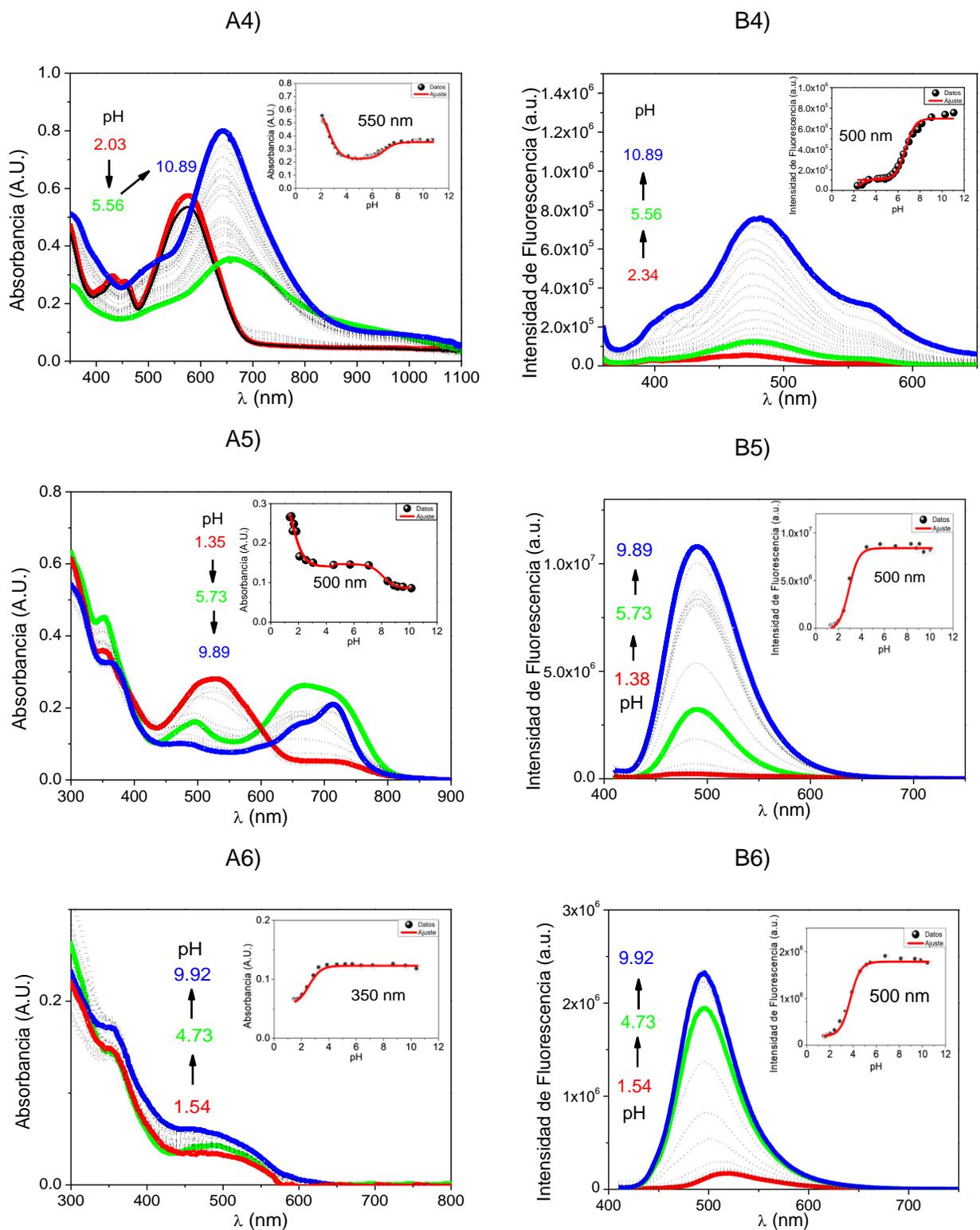


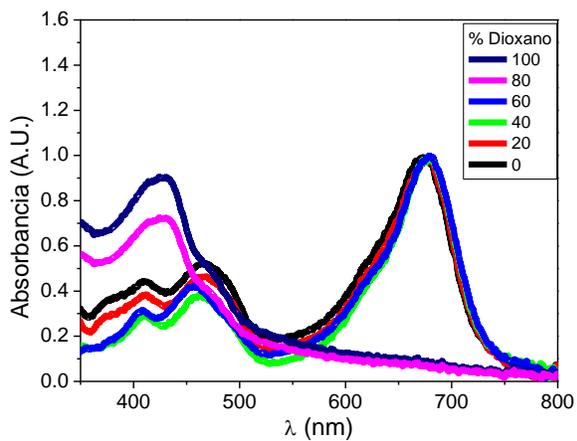
Figura 7.4.3 Titulación ácido base seguida por los espectros de A1-A6) absorción y B1-B6) emisión de los compuestos **CCy** (1)-**CCy** (6) correspondientemente.

7.4.2 Pruebas de polaridad

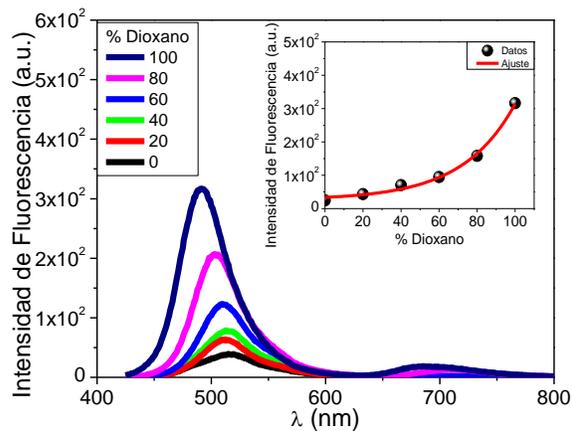
Para realizar las pruebas de sensibilidad a polaridad se hicieron mediciones en mezclas de agua:dioxano y se obtuvieron los espectros de absorción y emisión que se presentan en la **Figura 7.4.4**. El protocolo para determinar la sensibilidad a la polaridad ya ha sido reportado y de esta forma se han obtenido calibraciones en función de la constante dieléctrica. Sin embargo, hay que notar que los parámetros de Catalán de acidez y basicidad para dioxano y agua son muy diferentes ($SA=1.064$ y $SB=0.025$ para el agua mientras que para dioxano son $SA=0$ y $SB=0.444$), por lo que van a afectar en este tipo de calibraciones, porque las sondas presentan un equilibrio ácido-base importante. Además, es necesario señalar que los valores en términos de constante dieléctrica reportados para micropolaridad en términos de la constante dieléctrica para mitocondria se encuentran entre 5-30 unidades (dependiendo del tipo de estudio), esos valores reportados de micropolaridad en células, se obtienen con mezclas por arriba del 60% de dioxano.

De manera general se puede observar de las figuras que las sondas presentan dos perfiles de absorción diferentes, con mayor cantidad de agua se observan máximos de absorción a mayores longitudes de onda lo que puede indicar nuevamente la formación de especie con mayor conjugación, mientras que a mayor proporción de dioxano las bandas a mayor longitud de onda desaparecen y solo se observan bandas a menores longitudes de onda, lo cual puede indicar una disminución en la conjugación total de la molécula. Por su parte en los espectros de emisión se observa que en todas las sondas hay un aumento de la emisión en las bandas de 500 nm, con un ligero desplazamiento hipsocrómico. Con los estudios de las mezclas de agua: dioxano, se puede concluir que el aumento de intensidad de fluorescencia en las sondas es influenciado por el cambio de acidez-basicidad del medio, eso es visible desde el cambio en los espectros de absorción con las mezclas superiores al 50% de dioxano, por esa razón se considera que con esta técnica no es posible decir si las sondas son sensibles a la polaridad. Sin embargo, se seleccionó a la sonda **CCy (1)** para un estudio solvatocrómico más detallado, dado que es una de las sondas que presenta mayor desplazamiento de Stocks (aproximadamente de 400 nm), tal estudio se presenta en el **Apéndice 4**. El estudio detallado consistió en utilizar el modelo de Catalán usando 30 diferentes disolventes y se obtuvieron los coeficientes de correlación v_{abs} , v_{em} , ΔV , a_{SA} , b_{SB} , c_{SP} y d_{SdP} . En el estudio que involucra a todos los disolventes se observó que la acidez y la basicidad fueron las contribuciones más importantes en el efecto solvatocrómico. Y después de considerar la división de disolventes próticos y no próticos, nuevamente se observó algo similar. De tal forma, concluimos que las sondas son sensibles principalmente a la acidez y basicidad, mientras que en mucha menor medida son sensibles a la polaridad y polarizabilidad.

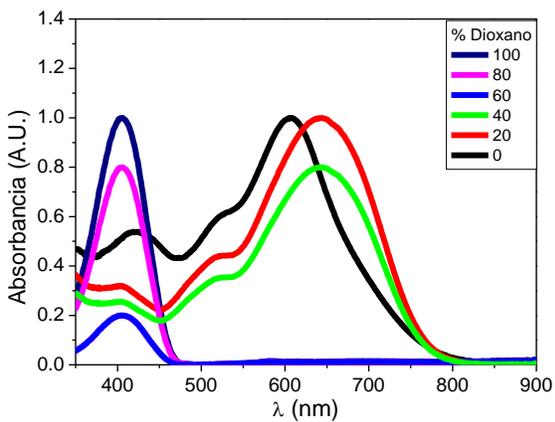
A1)



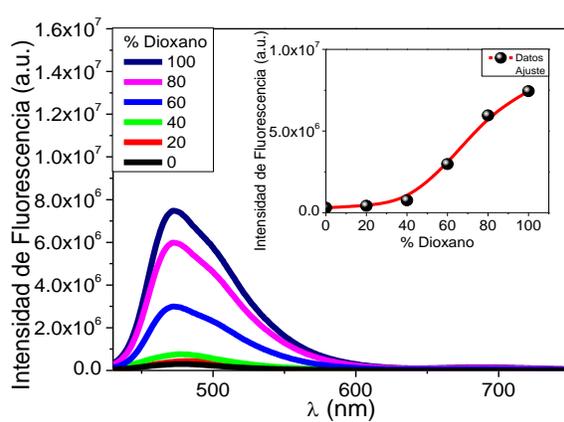
B1)



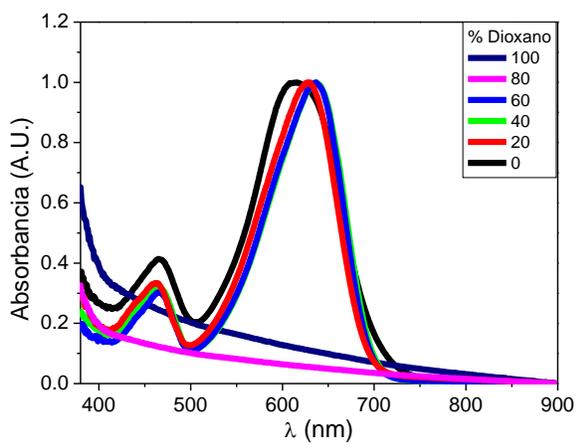
A2)



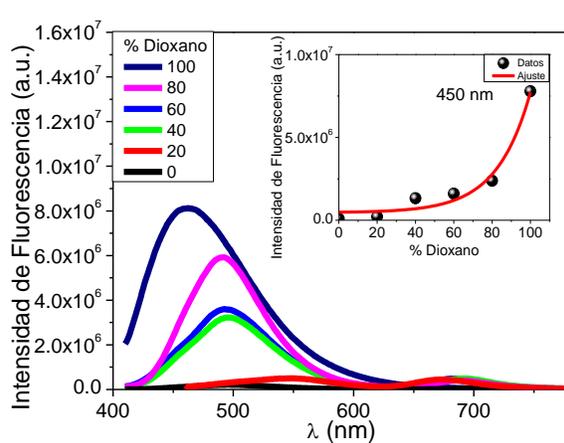
B2)



A3)



B3)



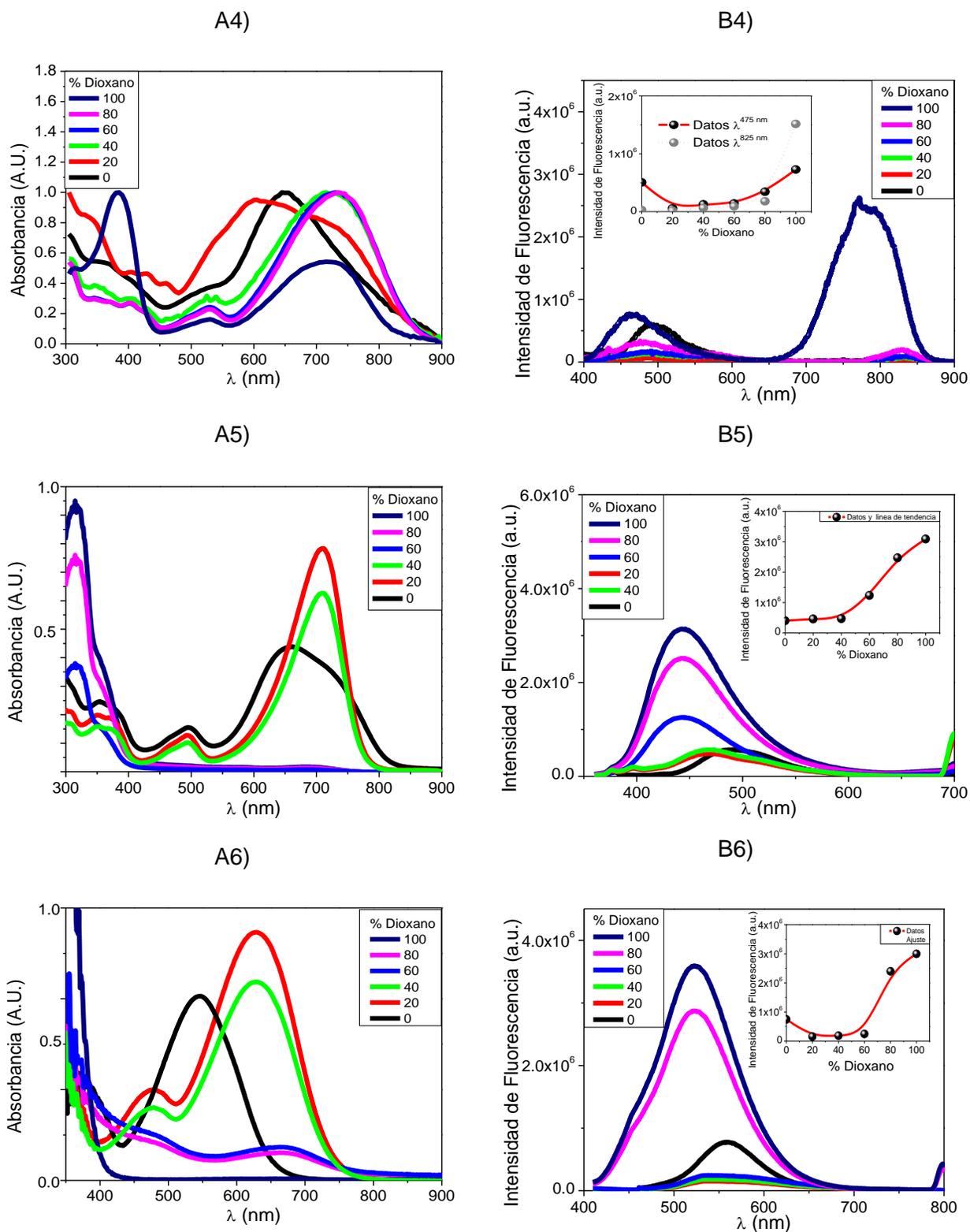
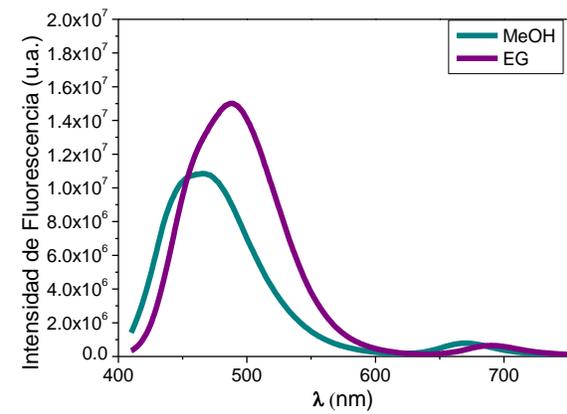
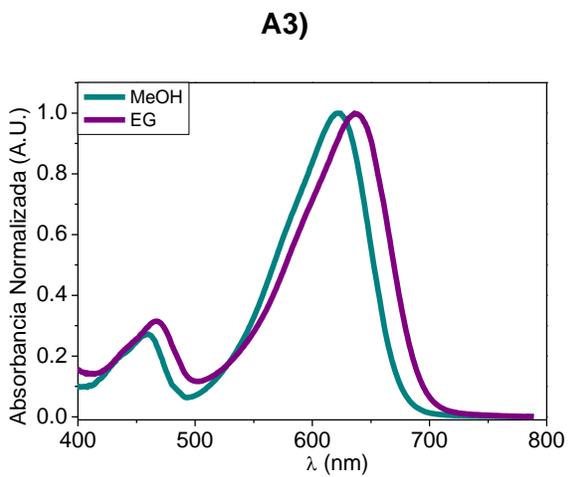
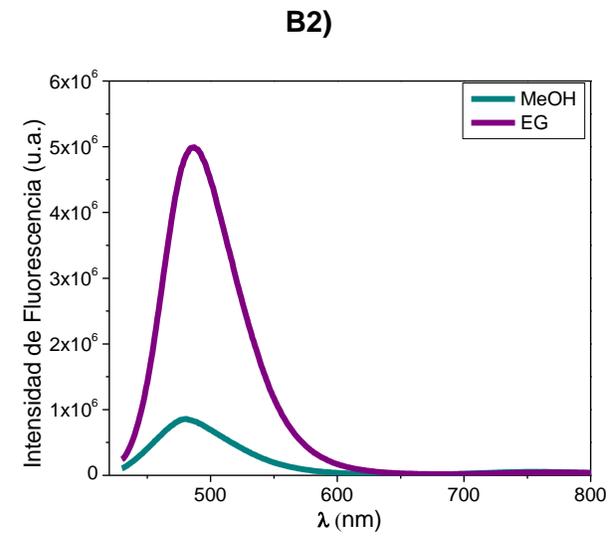
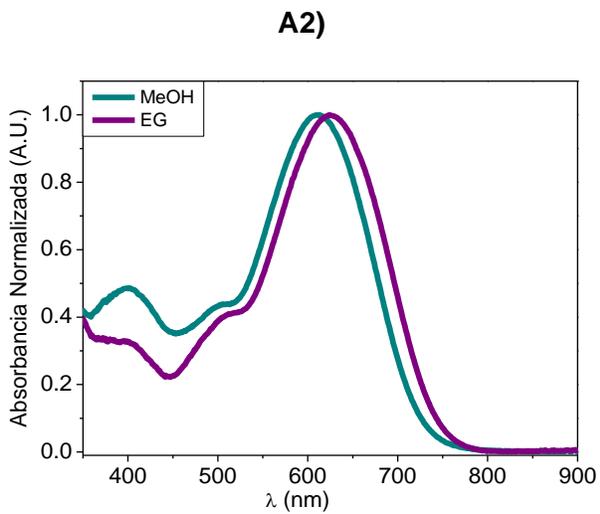
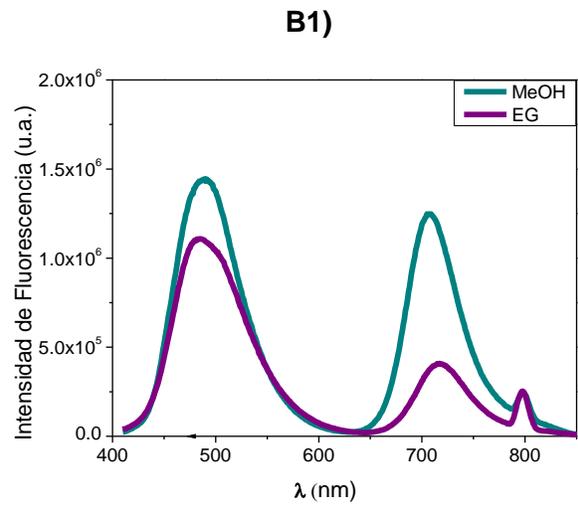
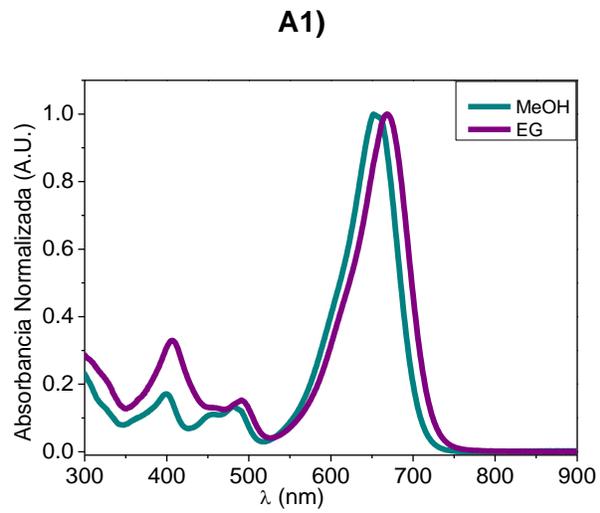


Figura 7.4.4 Espectros de A1-A6) absorción y B1-B6) emisión de los compuestos **CCy (1)-CCy (6)** correspondientemente, en mezclas de dioxano: agua.

7.4.3 Pruebas de viscosidad

Después se realizaron experimentos para determinar la sensibilidad de las sondas a la viscosidad. Una estrategia muy utilizada en la literatura utilizando fluorescencia estacionaria es medir la intensidad de fluorescencia de las sondas en mezclas de disolventes con propiedades similares, pero con diferente viscosidad en diferentes órdenes de magnitud. Los sistemas más utilizados son mezclas de etilenglicol-metanol o etilenglicol-etanol. Usando el sistema etilenglicol – metanol, se determinaron los espectros de absorción y fluorescencia que se muestran en la **Figura 7.4.5**. Es posible observar un comportamiento similar entre la familia de fluoróforos, en absorbancia la mayoría presenta un muy ligero desplazamiento batocrómico en los espectros de las disoluciones en etilenglicol respecto a las de metanol. Sin embargo, los espectros de absorción son muy similares en estructura en ambos disolventes, es decir que no hay un cambio de especies en el estado basal. Por otra parte, para el caso de los espectros de fluorescencia en los compuestos **CCy (1)**, **CCy (3)**, **CCy (4)** y **CCy (6)**, no se observa un cambio significativo en la intensidad de emisión al cambiar de viscosidad, considerando que la viscosidad cambia en dos órdenes de magnitud de 0.59 cP en metanol a 16.1 cP en etilenglicol. Pero, con las moléculas **CCy (2)** y **CCy (5)** se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia. En el caso de la sonda **CCy (2)** presenta una única banda de emisión con máximo en 500 nm en ambos disolventes, en ese caso no sería posible utilizar el método ratiométrico, y por tanto las mediciones de viscosidad serían de poca confiabilidad. En el caso de la sonda **CCy (5)** se puede observar que la emisión aumenta conforme aumenta la viscosidad, la intensidad aumenta en al menos cuatro veces de metanol a etilenglicol en ambas bandas de 450 nm y la de 750 nm. Por tanto, la única sonda que podría ser una buena sonda para determinación de la viscosidad es **CCy (5)**. Aunque hay que mencionar que la sonda **CCy (2)** es sensible a la viscosidad no calibrable. Por tanto, la sonda **CCy (5)** se seleccionó para realizar estudios de viscosidad en células, con un protocolo que involucra la implementación de estímulos exógenos con Nistatina, el cual se comentará más adelante.



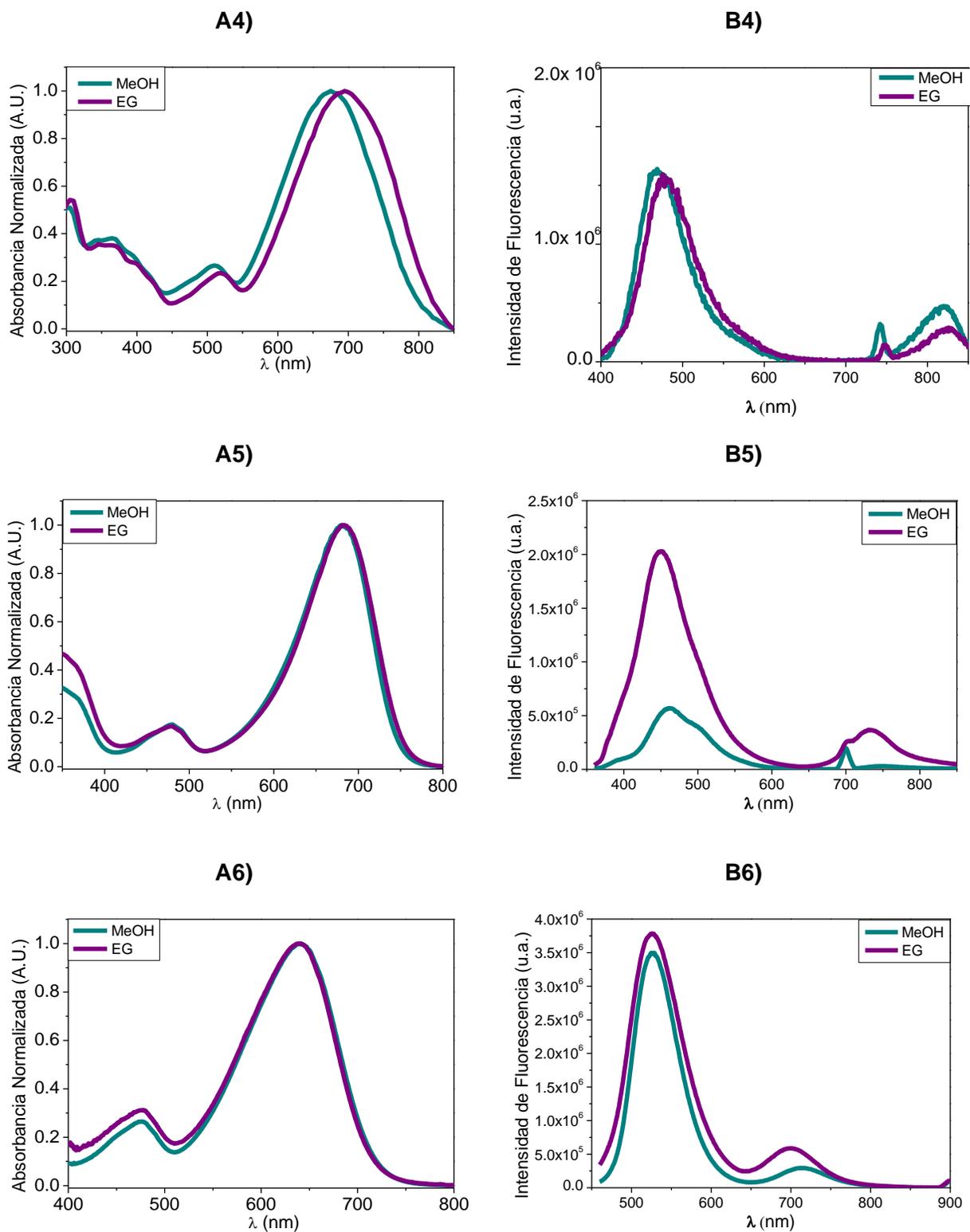


Figura 7.4.5 espectros de A1-A6) absorción y B1-B6) emisión de los compuestos **CCy(1)-CCy(6)** en metanol y etileno glicol.

7.4.4 Sensibilidad a especies reactivas de oxígeno.

En una celda con 100 mM de cada una de las sondas se añadieron fracciones molares de diferentes especies reactivas de oxígeno y bajo vigorosa agitación se dejaron equilibrar, para poder registrar los correspondientes espectros de absorción y emisión. Se observó que la mayoría de las sondas fueron resistentes a la oxidación con las diferentes ROS utilizadas puesto que no se observó cambios en los espectros de absorción ni en los espectros de emisión, salvo con las sondas **CCy (1)** y **CCy (2)**. La sonda **CCy (1)** presentó un aumento en la intensidad de emisión en la longitud de onda de 500 nm y una disminución en la intensidad de la banda de 700 nm, al reaccionar con oxígeno singlete, no se observó ningún cambio en la fluorescencia con ninguna otra especie reactiva de oxígeno; fue muy selectiva a $^1\text{O}_2$. Por otra parte, también se observaron cambios en los espectros de absorción, por lo que se hizo una titulación con $^1\text{O}_2$ y se siguieron los cambios de absorción y emisión, para posteriormente realizar la calibración ratiométrica con oxígeno singlete, y se puede observar en la **Figura 7.4.6**, donde también se presentan los espectros de masas antes y después del tratamiento oxidativo, donde se oxidó por completo la sonda puesto que se adicionó un equivalente de $^1\text{O}_2$. En el espectro de masas después del tratamiento oxidativo, fue posible identificar de entre los fragmentos, la formación de la cumarina 343 y a uno de los precursores de la síntesis, esto debido a la fragmentación de la molécula por la oxidación. La fragmentación y formación de la cumarina 343 se corroboró también por la técnica de resonancia magnética nuclear de protón y el espectro se presenta en el **Apéndice 5**.

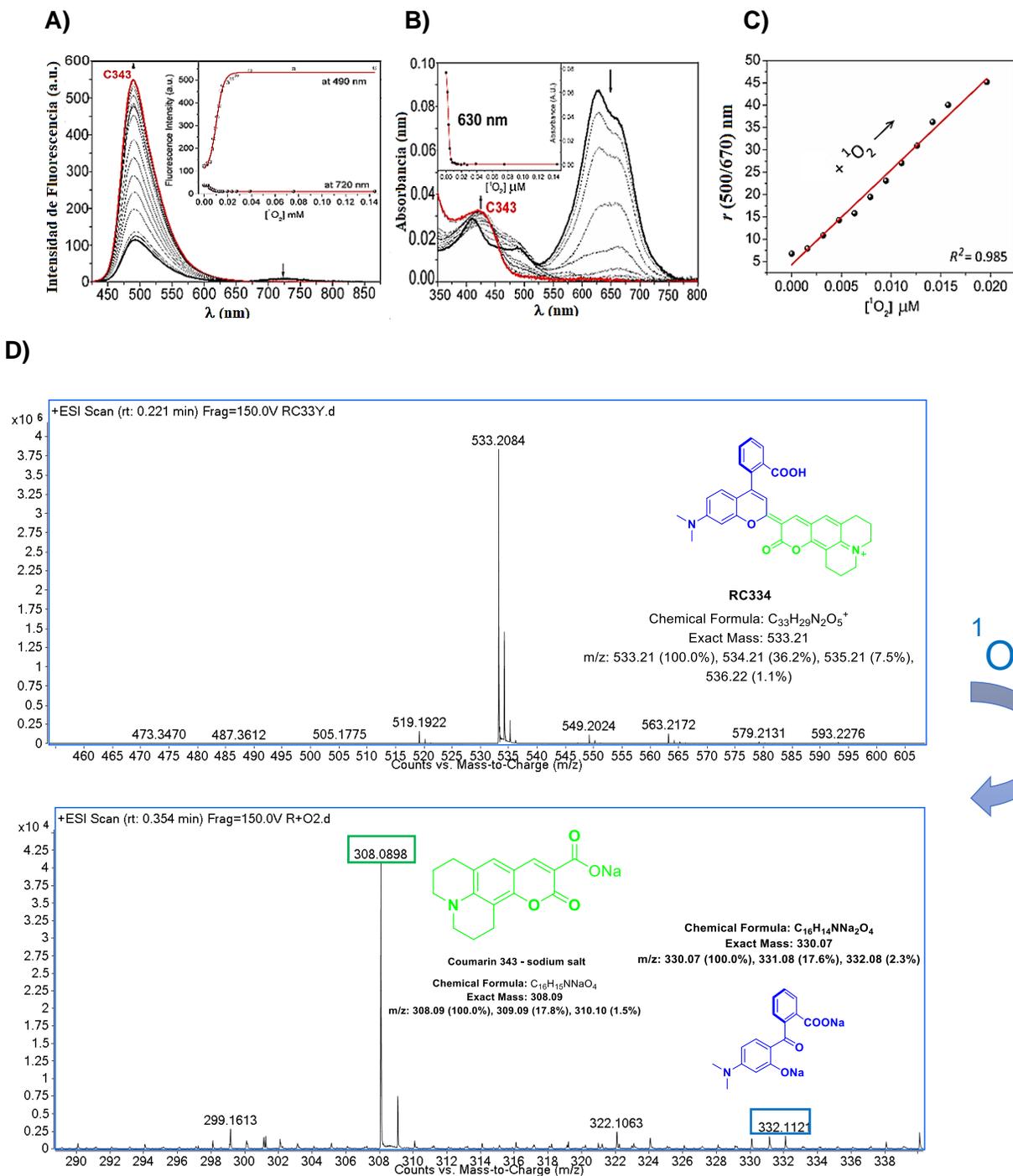
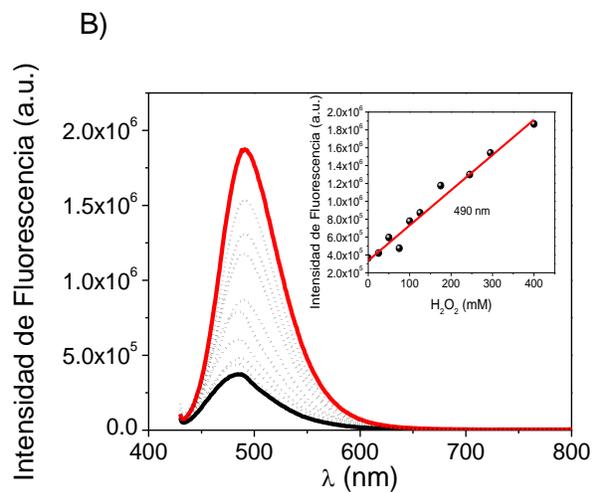
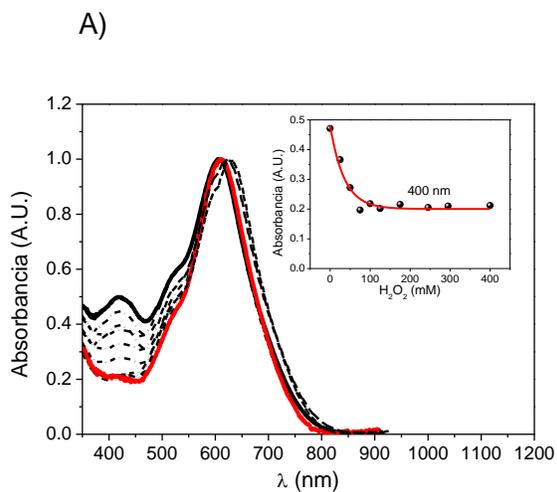


Figura 7.4.6 Espectros de A) emisión, B) absorción, C) calibración ratiométrica de **CCy (1)** utilizando los máximos de emisión (500 nm/670 nm) y D) espectros de masas por ESI-TOF antes y después del tratamiento oxidativo de la sonda **CCy (1)**.

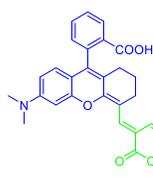
Por otra parte, la sonda **CCy (2)** presentó cambios en la intensidad de fluorescencia en presencia de hipoclorito de sodio, de peróxido de hidrógeno y de oxígeno singlete, para todos los casos se pudo notar un incremento en la intensidad de emisión en la banda de 500 nm. La sonda no presentó buena selectividad hacia ninguna especie reactiva de oxígeno, sin embargo, cabe señalar que en la oxidación con peróxido se contaron hasta cuatro equivalentes para que la fluorescencia se mantuviera constante; mientras que para hipoclorito de sodio y oxígeno singlete solo se requirió de un equivalente para alcanzar el máximo de emisión de la sonda. Debido a la poca selectividad sería difícil poder utilizarla para la detección de un analito en específico, pero si ayudaría a hacer un análisis cualitativo. Posteriormente se determinaron los espectros de masas para observar los posibles fragmentos que se pudieran estar formando y en la **Figura 7.4.7** se presentan los espectros de absorción, emisión y de espectrometría de masas para la sonda tratada con peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio. Las diferencias encontradas entre la oxidación con peróxido de hidrógeno y con hipoclorito de sodio se enlistan a continuación:

- En el caso de peróxido de hidrógeno se requieren de cuatro equivalentes para alcanzar el máximo de emisión (500 nm) pero se requiere solo de un equivalente para alcanzar el mínimo de absorción (en 400 nm) en los correspondientes espectros.
- Las especies que se forman con la oxidación de peróxido de hidrógeno son epóxidos estables, por lo que no se genera fragmentación de la molécula de manera instantánea, requiere de una segunda reacción de hidrólisis para fragmentarse, lo que implica otra cinética de reacción.
- La oxidación tanto con hipoclorito de sodio como con oxígeno singlete solo requiere de un equivalente, para alcanzar el máximo de emisión (en 500 nm) y el mínimo de absorción en (600 nm), en los correspondientes espectros.
- El tipo de oxidación con hipoclorito de sodio genera una fragmentación que se puede observar desde los espectros de absorción y que se confirma en espectrometría de masas logrando identificar dos picos de los principales fragmentos. El fragmento tipo cumarina y un fragmento de los precursores, el **compuesto b**.

Dado que en la célula la principal especie reactiva de oxígeno que se genera es el peróxido de hidrógeno en comparación con todas las otras especies, se esperaría que está fuera la que dirigiera principalmente la reactividad de la sonda **CCy (2)** dentro de la célula, por lo que se hicieron estudios en las líneas celulares mencionadas anteriormente con ambas sondas que presentan el fragmento de cumarina.



C)



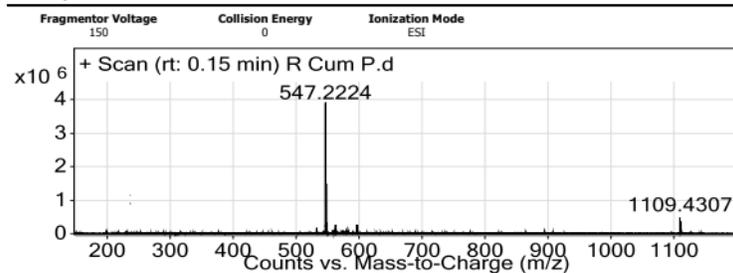
Chemical Formula: $C_{34}H_{31}N_2O_5^+$

Exact Mass: 547.22

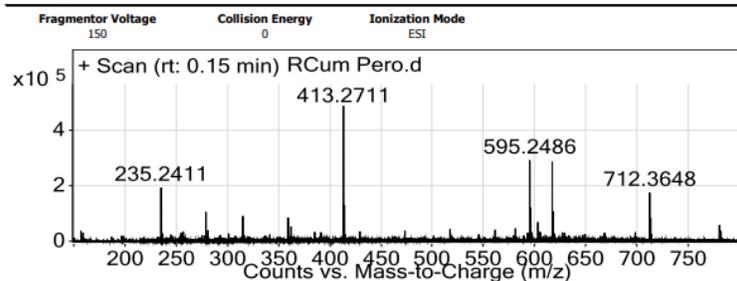
Molecular Weight: 547.63

m/z : 547.22 (100.0%), 548.23 (37.3%), 549.23 (7.8%),

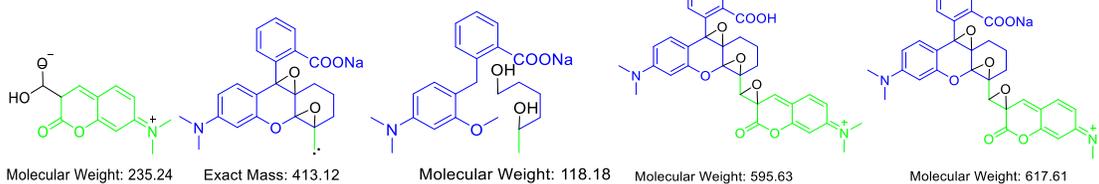
User Spectra

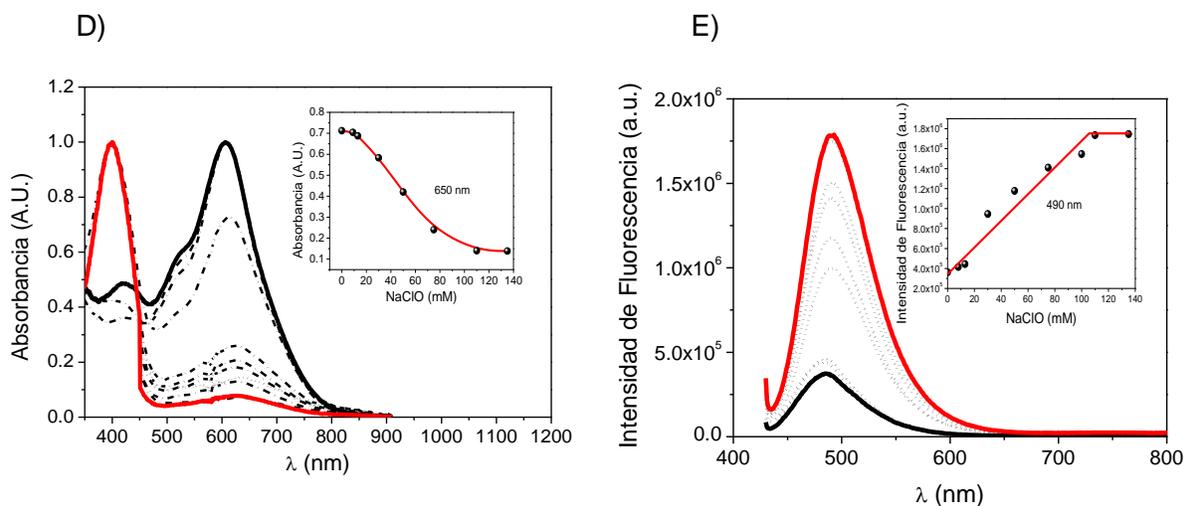


User Spectra

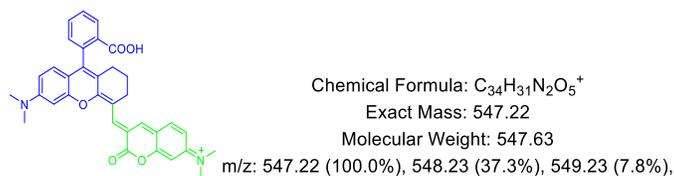


Molecular Weight: 307.32

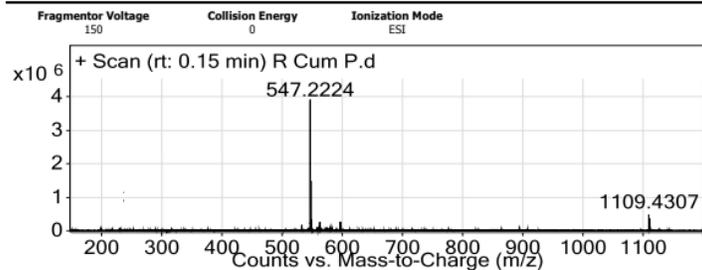




F)

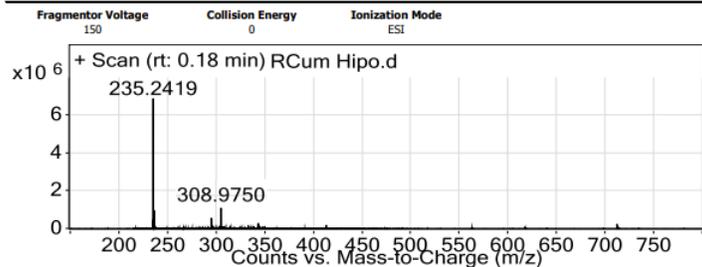


User Spectra



NaClO

User Spectra



Molecular Weight: 307.32

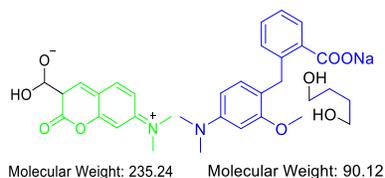


Figura 7.4.7 Espectros de A) absorción, B) emisión y C) masas de **CCy (2)** con tratamiento de H_2O_2 y espectros de D) absorción, E) emisión y F) masas de **CCy (2)** con tratamiento de 1O_2 .

Los compuestos con el fragmento de cumarina presentaron sensibilidad a la oxidación. En el trabajo descrito por Lin³⁴ la sensibilidad a la oxidación se adjudicó a que se formaba la especie oxonio de una molécula muy similar a la sonda **CCy (1)**, sin embargo, debido a la similitud estructural todas las sondas **CCy** sintetizadas en este trabajo deberían presentar ese equilibrio de formación de la especie oxonio y entonces todas deberían ser sensibles a la oxidación con peróxido de hidrógeno, pero, eso no fue lo que se observó. Lo que se observó fue que las únicas especies que fueron sensibles a la oxidación fueron las que contienen un fragmento de cumarina, y por eso, proponemos que se debe al fragmento “enona”, ya que el grupo carbonilo alfa-beta insaturado es muy lábil a la oxidación con diferentes compuestos. La diferencia en la reactividad entre el compuesto **CCy (1)** y **CCy (2)** es interesante, ya que una especie fue muy selectiva a oxígeno singlete y la otra fue sensible a varias especies oxidantes. Otra cuestión interesante es que la sonda **CCy (1)** presentó emisión dual y por esa razón es una excelente sonda para determinar la concentración de ¹O₂ mediante un análisis ratiométrico. Pero la sonda **CCy (2)** presentó una única banda de emisión y fue sensible a diferentes ROS lo que la hace una sonda con poco potencial para aplicaciones analíticas. Para explicar la diferencia en la reactividad oxidativa de las sondas **CCy (1)** y **CCy (2)** proponemos en los **Apéndices 6 y 7** los mecanismos de reacción para ambas moléculas con cada especie ROS a la que fue sensible y que se debe tanto a la diferencia en geometría de las moléculas, como a la propia cinética de reacción de cada especie oxidante. Por último, otro fenómeno que se observó fue que la sonda **CCy (5)** presentó cambios en los espectros de absorción con la adición de peróxido de hidrógeno, pero no se observaron cambios en las intensidades de emisión, lo que nos sugiere que la especie podría estarse oxidando sin cambios en la conjugación electrónica de la molécula, formando el equilibrio ceto-enol, pero sin cambios en la fluorescencia, por lo que no podría ser utilizada como sonda fluorescente para detección de ROS.

Finalmente se presenta en sensibilidad a la oxidación de las sondas **CCy** con diferentes especies reactivas de oxígeno en el histograma de la **Figura 7.4.8**. Se utilizó un equivalente de cada ROS para oxidar una concentración conocida de cada una de las sondas y se registró el cambio en la intensidad de fluorescencia de la banda de 500 nm, dado que fue la de mayor intensidad (o la única visible en agua). Del histograma se observa que las sondas no presentaron sensibilidad a la oxidación salvo **CCy (1)** y **CCy (2)**, como se había mencionado. Sin embargo, se puede observar que todas fueron sensibles a la degradación con el radical hidroxilo, lo cual es bastante conocido en la literatura de degradación de colorantes⁴⁶.

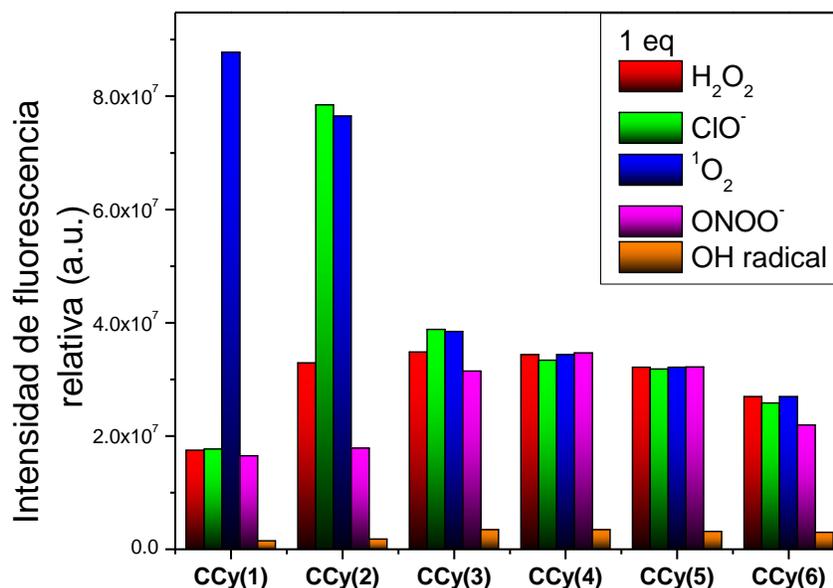


Figura 7.4.8 Histograma del cambio en la intensidad de emisión de fluorescencia (en la longitud de onda de mayor intensidad según el caso) de las sondas con un equivalente de una ROS.

7.4.5 Rendimientos cuánticos de fluorescencia

Los espectros de absorción y emisión se determinaron en celdas de cuarzo de 1.0 cm y 3.5 mL de capacidad. Para llevar a cabo dichas mediciones, con cada una de las moléculas, se preparó una disolución stock de <10 mg de compuesto en 700 μ L de DMSO, de la cual se añadió 1 μ L a 2000 μ L de etanol en la celda. A continuación, se presentan la determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia relativo, para los compuestos obtenidos siguiendo el protocolo previamente reportado⁴⁷. En la **Figura 7.4.9** se presentan los espectros de absorción y emisión de la familia de compuestos **CCy** y de la molécula estándar C343 (la cual se seleccionó debido a que tiene espectros de emisión y absorción cercanos en longitud de onda, a los espectros de las sondas sintetizadas) determinados para el cálculo del rendimiento cuántico de fluorescencia relativo, la determinación del rendimiento se realizó utilizando la **Ecuación (1)**. Donde I es integral del área bajo la curva, A es la absorción en la longitud de onda de excitación y η el índice de refracción del disolvente empleado en la disolución y Φ el rendimiento cuántico de fluorescencia.

$$\Phi_C = \Phi_E \left(\frac{I_A A_E \eta^2}{I_E A \eta_E^2} \right) \quad \text{Ecuación (1)}$$

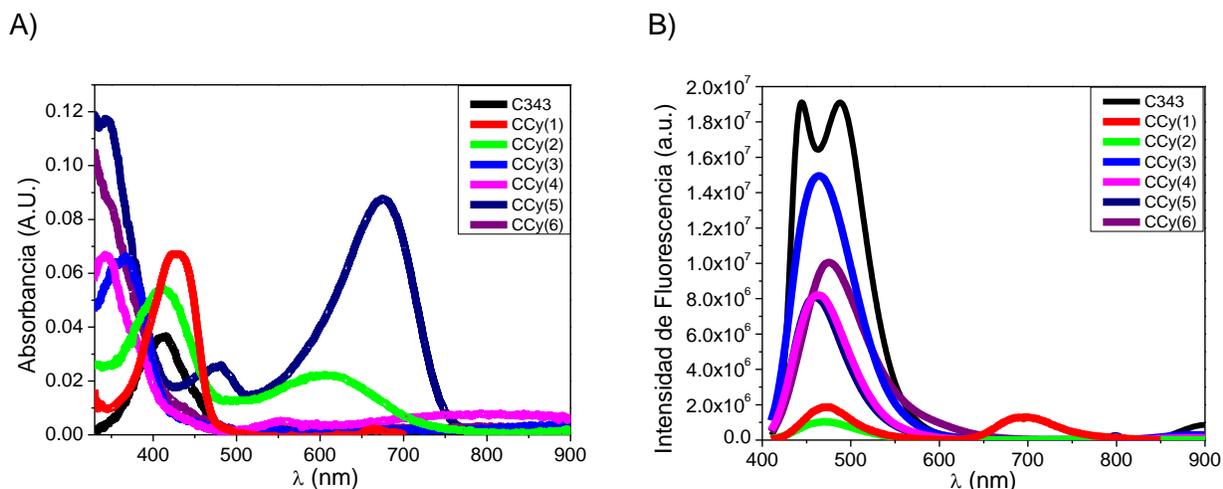


Figura 7.4.9 A) Espectros de absorción y B) espectros de emisión de las sondas **CCy** en etanol.

En la **Tabla 7.4.1** se presenta un resumen de las principales características de las sondas sintetizadas. Se presentan valores de constantes de acidez, rendimiento cuántico de fluorescencia, coeficiente de partición, el coeficiente de Pearson y el IC50. Se observan constantes de acidez con valores cercanos, salvo para la especie **CCy (6)** que no se observó la formación de la *espirolactona*. Presentaron rendimientos cuánticos de fluorescencia de medios a bajos. La mayoría de las sondas fueron lipofílicas, salvo **CCy (6)** que fue hidrofílica (por esta razón y debido a que no se observa el pK_a de formación de la *espirolactona*, se propuso que la especie prefería mantenerse en una especie zwitteriónica). Tuvieron buenos valores de Pearson, que indican buena localización en mitocondria y además tuvieron muy baja citotoxicidad con valores de IC50 mayores a 100 mM.

Tabla 7.4.1 Valores de constantes de acidez, rendimiento de fluorescencia, coeficiente de partición, coeficiente de Pearson y de la concentración inhibitoria media máxima.

CCy	pK_{a1}	pK_{a2}	ϕ^1	Log P^2	CP mitocondria	IC50
CCy (1)	$2.21 \pm 0.08^*$	$9.87 \pm 0.09^*$	0.09	0.39 ^c	0.96	>100 mM
CCy (2)	$2.73 \pm 0.23^*$	$11.08 \pm 0.03^*$	0.03	0.56	0.90	>100 mM
CCy (3)	$2.65 \pm 0.05^*$	$10.06 \pm 0.16^*$	0.49	0.42	0.93	>100 mM
CCy (4)	$2.78 \pm 0.18^*$	$6.78 \pm 0.05^*$	0.54	0.31	0.95	>100 mM
CCy (5)	$2.41 \pm 0.23^*$	8.08 ± 0.07^a	0.24	0.33	0.88	>100 mM
CCy (6)	2.87 ± 0.32^b	-----	0.38	-0.19	0.94	>100 mM

*Promedio de valores obtenido por ambas técnicas (abs y UV)

^a Valor obtenido por Fluorescencia

^b Valor obtenido por Uv-vis

^c Valor recalculado y corregido.

¹ Utilizando a la cumarina 343 como estándar con $QY = 0.63$ ⁴⁸

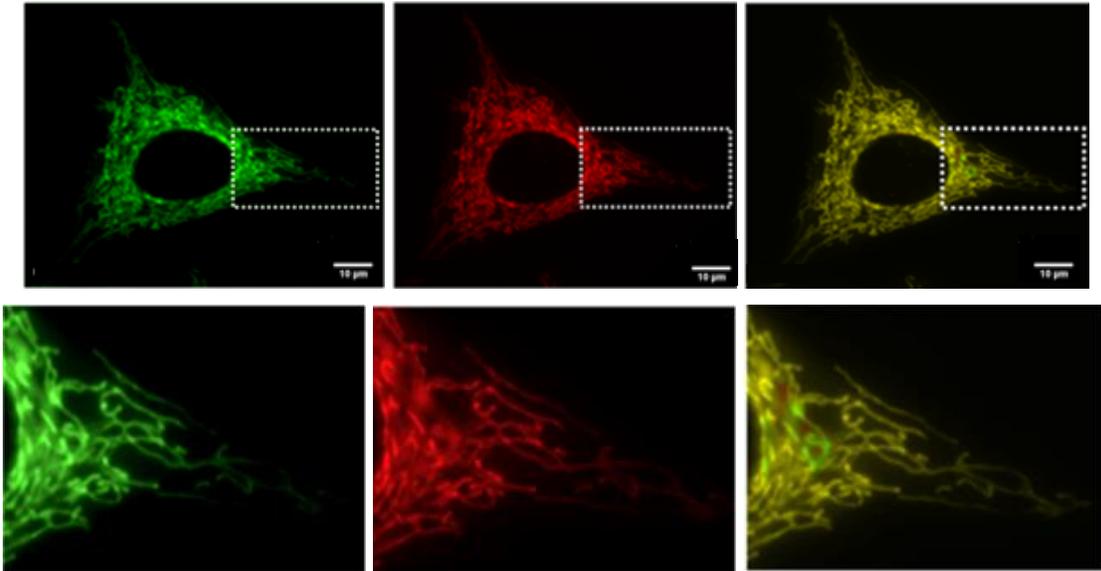
² Obtenido por metodología reportada por O. Kelly ⁴⁹

7.5 Microscopía confocal

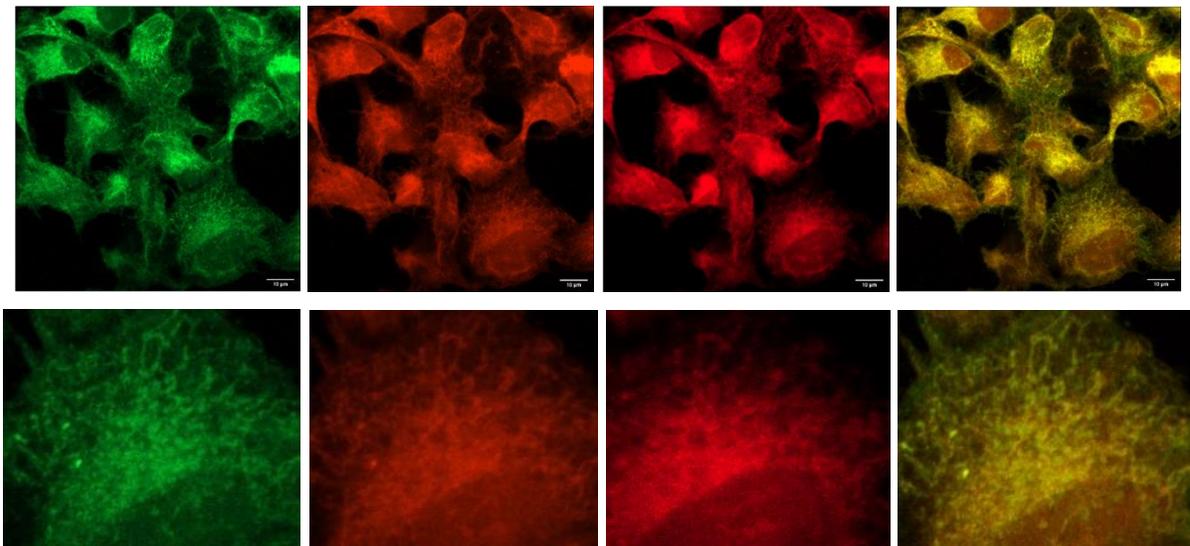
En la **Figura 7.5.1** se presentan las imágenes de localización de cada sonda **CCy** tras ser incubadas por 30 min en una caja Petri con fondo de vidrio de 2 mL a una concentración de 100 μM . En la mayoría de las sondas se puede observar que la fluorescencia proviene de la periferia del núcleo, es evidente el arreglo de la red mitocondrial en la emisión de cualquier sonda, solo en el caso de **CCy (2)** se observó emisión desde el núcleo y con **CCy (3)** se observó emisión desde otras regiones puntuales que parecen peroxisomas (es necesario confirmarlo con un estudio de colocalización). La sonda **CCy (2)** fue la única que presentó emisión en tres canales, verde, rojo e infrarrojo cercano, mientras que las otras sondas solo presentaron emisión en el verde y rojo (en algunos casos se observó la emisión en azul con poca intensidad, pero se evitó trabajar en ese canal para evadir la fototoxicidad). Para el caso particular de **CCy (3)** se observó emisión en el canal verde desde otras regiones puntuales de forma esférica, que se encontraron principalmente fuera de la célula, las cuales por su tamaño parecen ser aglomeraciones de la propia sonda y que se intentaron evitar trabajando a concentraciones más bajas, pero siempre fueron visibles. También de forma muy tenue en el canal verde se observa emisión desde las mitocondrias.

En cuanto a los experimentos de colocalización con los marcadores fluorescentes comerciales utilizados como estándares (TMRM y MitoTracker) se presentan los valores obtenidos de los coeficientes de Pearson para cada sonda en la **Tabla 7.4.1** y se presenta un ejemplo para el cálculo del coeficiente en el **Apéndice 8**. Mientras tanto, los experimentos para corroborar que las sondas tienen localización en mitocondria debido a la interacción con el potencial de membrana, se presenta un ejemplo de las imágenes de microscopía en el **Apéndice 9**. De las sondas solo se seleccionaron a los fluoróforos **CCy (1)** y **CCy (2)** para realizar estudios de oxidación en células, aunque con **CCy (2)** no es posible realizar un estudio ratiométrico cuantitativo, se hizo de manera cualitativa.

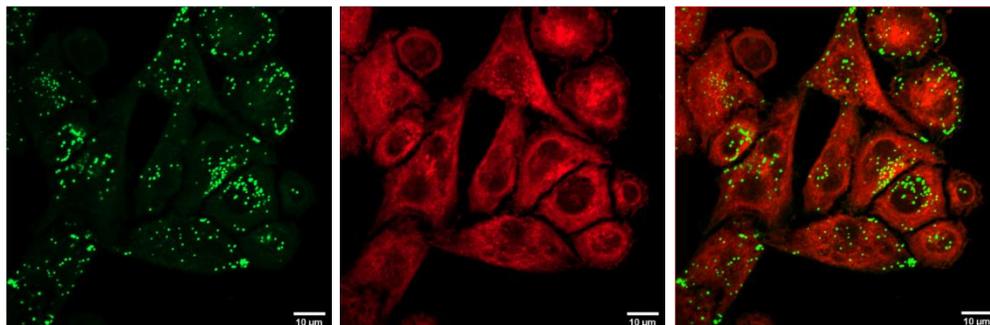
A)



B)



C)



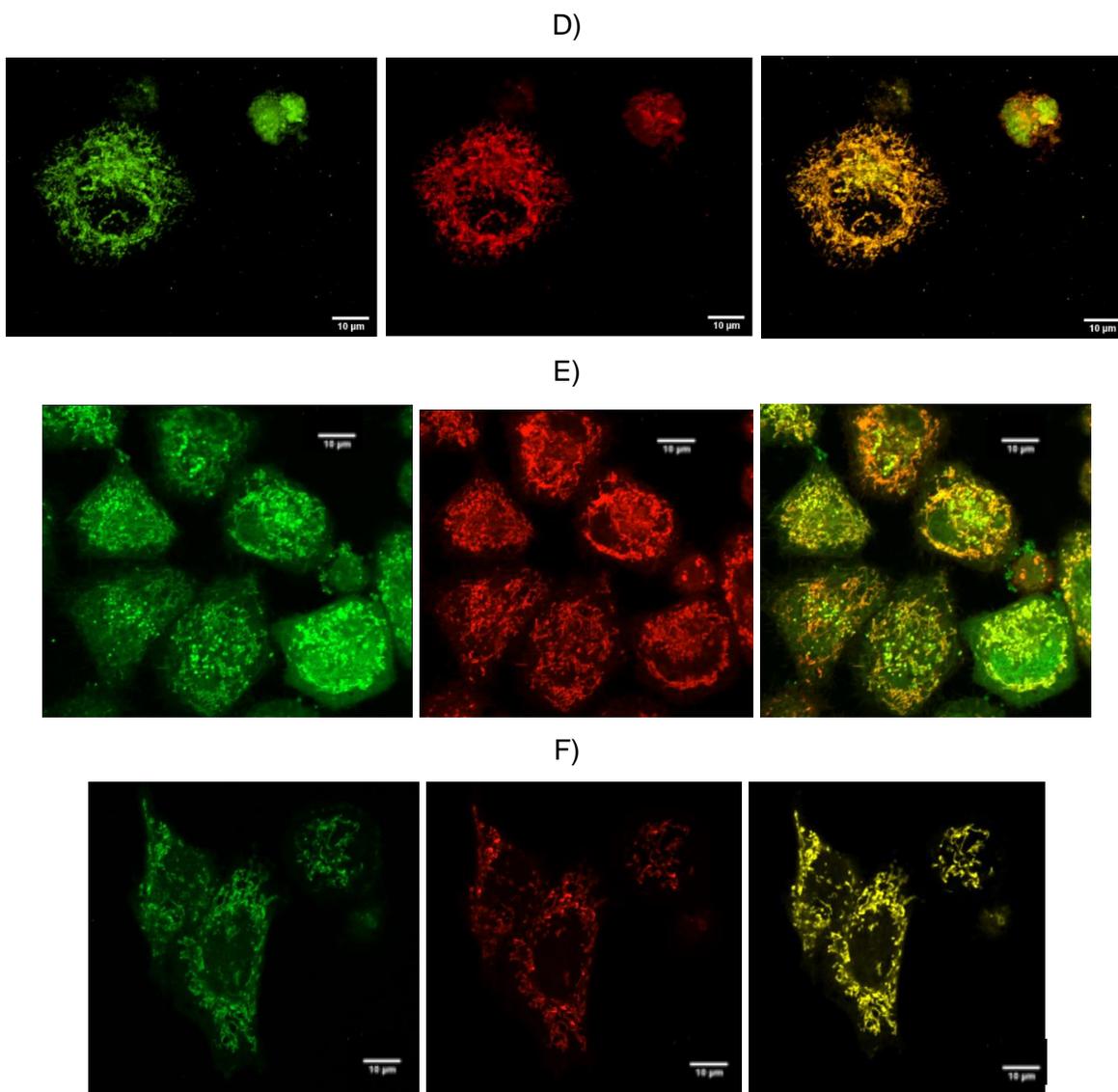


Figura 7.5.1 Imágenes de microscopía confocal de A1-A6) CCy (1) – CCy (6) en diferentes canales del microscopio. Barra de escala de 10 µm.

En la **Figura 7.5.2** se presentan en A) células HeLa incubadas con 100 µM de **CCy (1)** antes del tratamiento con oxígeno singlete y en B) después del tratamiento oxidativo; mientras que en C) se presentan espectros de emisión en tiempo real de ambas imágenes de microscopía, antes y después del tratamiento con $^1\text{O}_2$. El protocolo implementado para la generación de oxígeno singlete en las células fue el reportado por Zhang⁵⁰. Se observó que antes del tratamiento oxidativo la emisión proviene principalmente de la red mitocondrial conformada en la periferia del núcleo, tanto en el canal verde como en el canal rojo. Por otra parte, las células tratadas con oxígeno singlete tienen la emisión difusa en el canal verde, puesto que se pierde contraste debido a la salida del fragmento de la molécula por la oxidación y ahora es posible observar emisión desde adentro del núcleo en regiones específicas. También se observa que la emisión en el canal rojo desaparece

tras la adición de $^1\text{O}_2$. Tal como se mencionó en el capítulo anterior, la fragmentación de **CCy (1)**, conlleva a la formación de la cumarina CC334 la cual tiene mayor intensidad de fluorescencia en el canal verde y que se ha reportado tiene localización en nucleolo debido a la intercalación en los *zurcos* del ADN^{51,52}. De los espectros de emisión en tiempo real se puede ver cualitativamente que hay un aumento en la intensidad de fluorescencia en el canal verde y una disminución de la intensidad en el canal rojo.

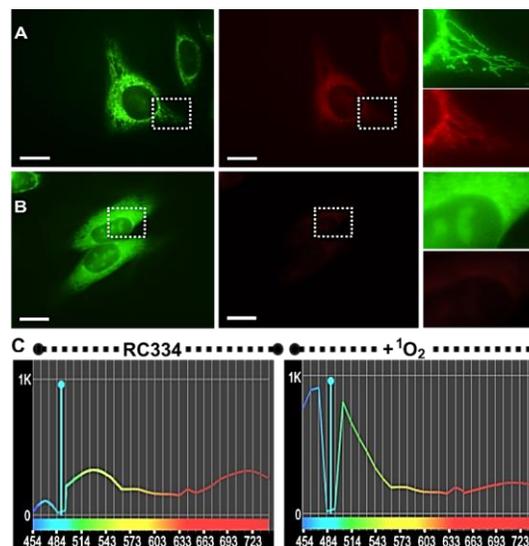


Figura 7.5.2. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa con **CCy (1)** A) antes y B) después del tratamiento con $^1\text{O}_2$. C) espectros de emisión en tiempo real, antes y después del tratamiento oxidativo. Barra de escala de 20 μm .

Por otra parte, en el caso de la sonda **CCy (2)** también se hizo un estudio cualitativo estimulando la generación de ROS de forma exógena con la adición de H_2O_2 , de tal forma que esta estimulación externa provoca la producción de ROS de forma no específica, tal cual sucedería bajo el estrés oxidativo. En la **Figura 7.5.3** se pueden observar las imágenes de microscopía en A) antes del tratamiento oxidativo hay emisión en tres canales del microscopio, infrarrojo cercano, rojo, y verde y en amarillo la superposición de los tres canales. En cuanto a la localización se puede observar emisión principalmente alrededor del núcleo y se pueden ver filamentos en una red que se dispersan por todas las células, aunque también es posible observar emisión muy ligera desde el núcleo. En la figura B) se observa nuevamente los tres canales y la superposición de los canales, se puede notar que hay una disminución de la intensidad en ambos canales rojo y un aumento en la intensidad de emisión en el verde, tanto que en la superposición de imágenes se observa más el color verde y no se ve amarillo como antes de la oxidación. Se puede notar que la emisión se ve más difusa, aunque aún es posible observar los organelos filamentosos. Para el caso de esta sonda **CCy (2)** en comparación con **CCy (1)** en ambos aumenta la intensidad de emisión en el verde y disminuye en el rojo, la diferencia es que **CCy (1)** se fragmenta, y por tanto cambia de localización

(se genera C334 que se va a intercalar al ADN nuclear) pero **CCy (2)** no se fragmenta, generando epóxidos, perdiendo la conjugación inicial, dejando la conjugación del fragmento de cumarina, sin que cambie su localización y por ende se mantiene en las mitocondrias principalmente.

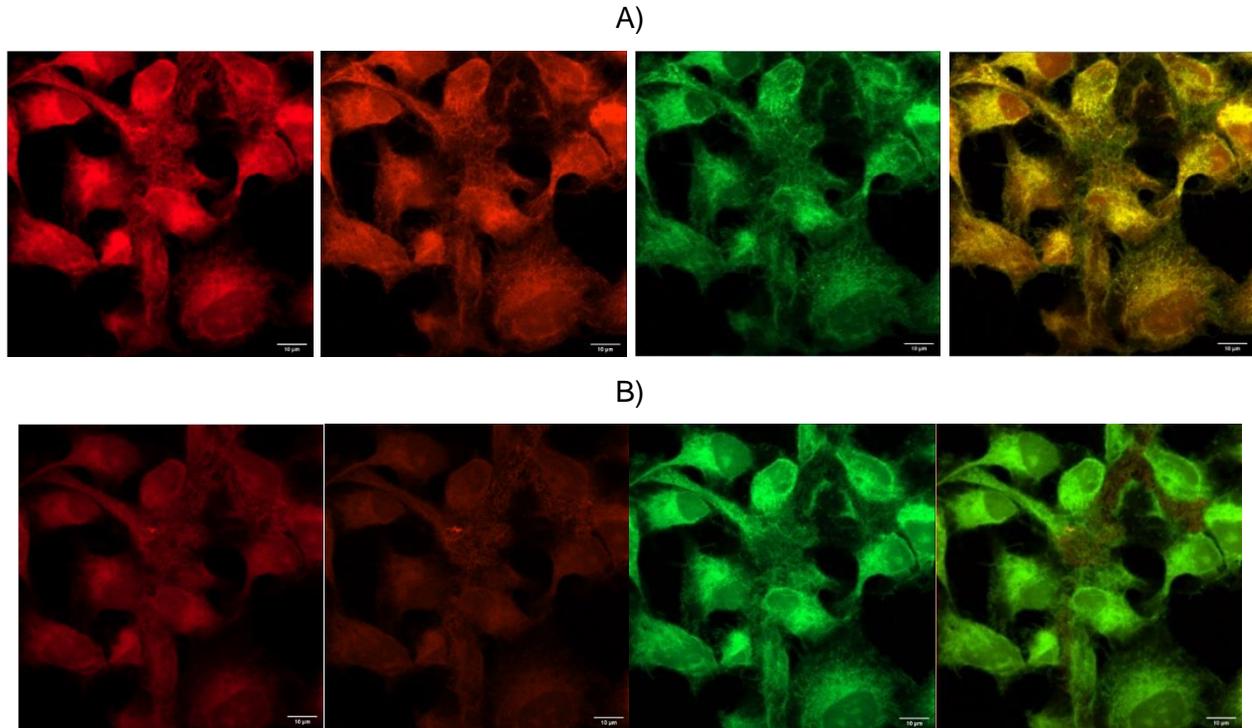


Figura 7.5.3 Imágenes de microscopía confocal de células HeLa con **CCy (2)** A) antes y B) después del tratamiento con H_2O_2 . Barra de escala de $10 \mu m$.

7.6 Citometría de Flujo

En la **Figura 7.6.1** se presentan los correspondientes diagramas de puntos (A-D) e histogramas (E-H) de las células SK-LU1 sin la adición de ninguna sonda y que fueron utilizadas como blanco, de esta forma se seleccionan las señales positivas de emisión y se excluye la fluorescencia endógena. Utilizando condiciones de análisis similares a los experimentos en microscopía se realizaron los experimentos de citometría, la incubación de la sonda fue a una concentración de $100 \mu M$ y se midieron hasta 10 mil cuentas positivas. Se puede observar en la figura A) el tamaño de las células obtenido, que concuerda a lo reportado con la literatura, alrededor de 400 nm . Mientras que en los diagramas de puntos de B-D) se observan las señales para los filtros mencionados anteriormente, FITC en función de PE, PE en función de PerCP y PerCP en función de APC; y E) FITC, F) PE, G) PerCP y H) APC. De tal forma que permite ver cuando una señal correlaciona con la otra. Y finalmente en los diagramas se muestra las regiones que han sido marcados como negativos.

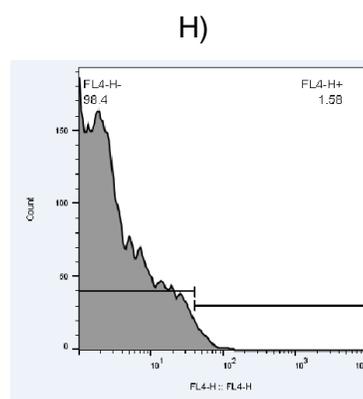
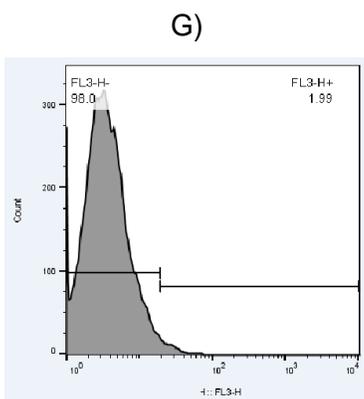
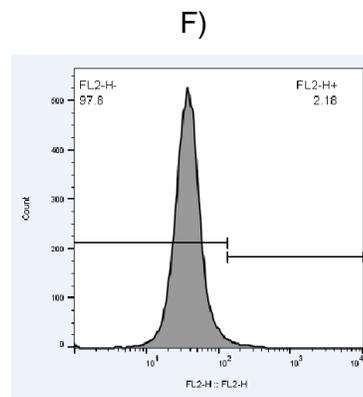
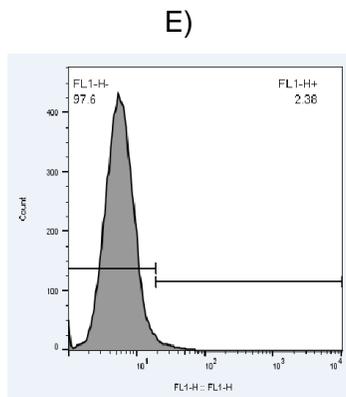
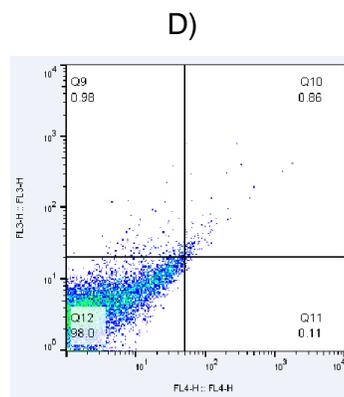
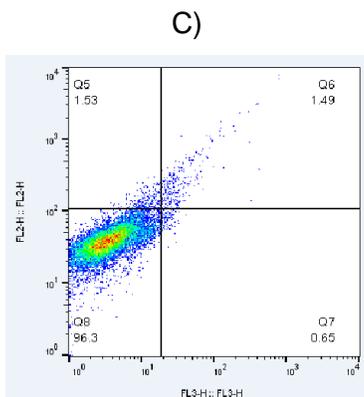
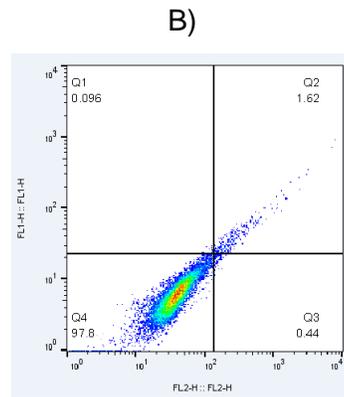
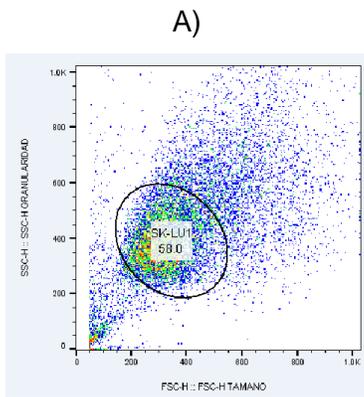
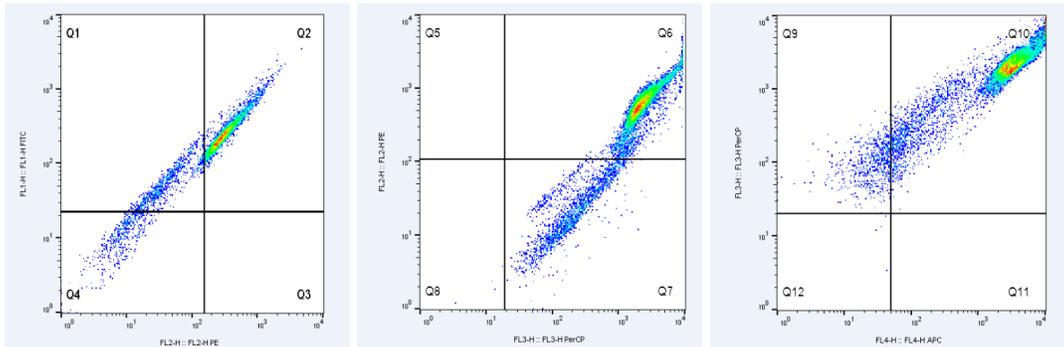


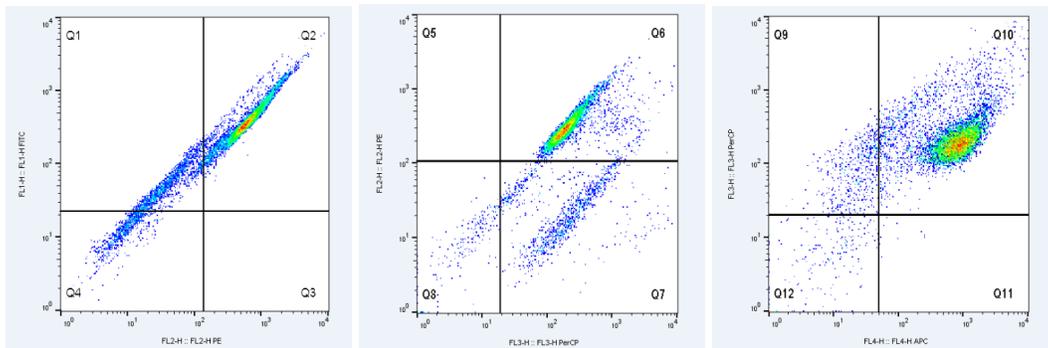
Figura 7.6.1 A-D) Diagrama de puntos e E-H) histogramas para células SK-LU1 sin teñir.

En las imágenes de citometría de la **Figura 7.6.2** se presentan los diagramas de puntos, los cuales presentan graficas de izquierda a derecha con el siguiente orden: FITC en función de PE, PE en función de PerCP y PerCP en función de APC. En A1-F1 se observan los diagramas de puntos de cada sonda antes de la adición de peróxido de hidrógeno y en las figuras A2-F2 se observan los diagramas de puntos después del tratamiento oxidativo de las sondas **CCy (1)- CCy (6)**, correspondientemente. De manera que se puede comparar A1 contra A2, es decir antes y después del tratamiento para las diferentes sondas. Por ejemplo, para **CCy (1)** es posible observar en los diagramas de puntos un muy ligero incremento en los canales FITC y PE y una disminución muy significativa en las intensidades de fluorescencia tanto en los canales PerCP como en APC después de la adición de H₂O₂. Ese mismo comportamiento se observó con la sonda **CCy (2)**, disminución de los canales PerCP y APC y un incremento muy ligero en FITC y PE. Con la sonda **CCy (5)**, también fue posible observar una disminución en la fluorescencia considerable, tras la adición de peróxido de hidrógeno la cual no se había observado anteriormente en los equipos de fluorescencia, pero para este caso todos los canales presentaron disminución de la intensidad. Mientras que todas las demás sondas presentaron cambios mínimos en la intensidad de fluorescencia, principalmente disminución en la emisión en todos los canales y esto quizás sea posible de explicar debido a un *quenching* por la continua irradiación laser o por el tiempo transcurrido durante una medición y otra. De tal forma que con este experimento se comprueba que las sondas son resistentes a la oxidación, salvo las sondas **CCy (1) y CC (2)**, la cuales presentaron los cambios más grandes en las intensidades de emisión. En particular, peróxido de hidrógeno es de las primeras especies en generarse bajo el estrés oxidativo junto con el ion superóxido, también es una de las que se genera en mayor proporción y de las más estables⁴¹.

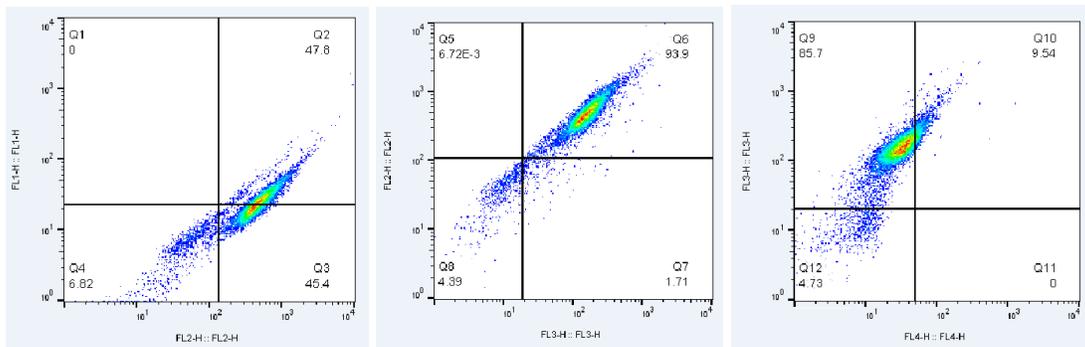
A1)



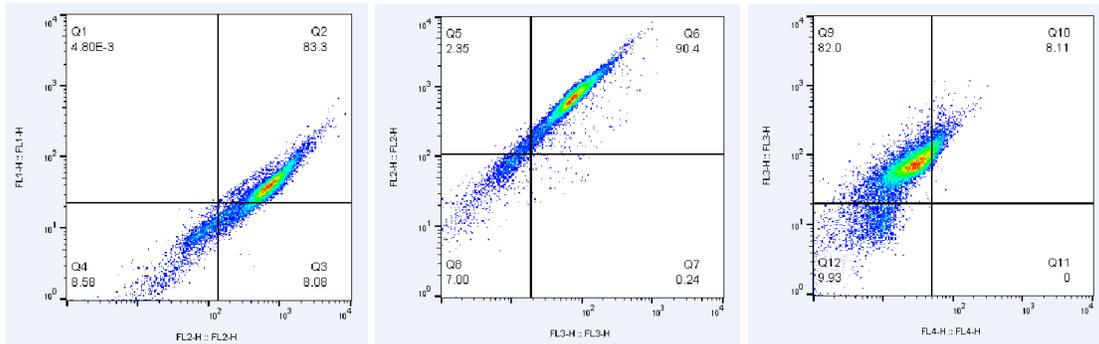
A2)



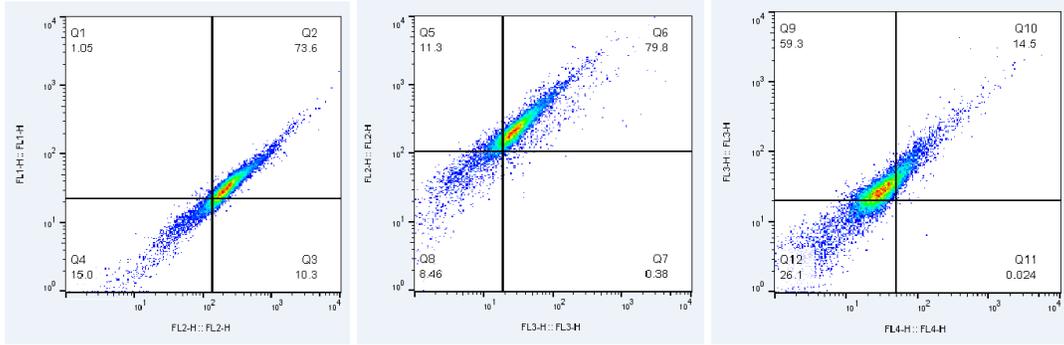
B1)



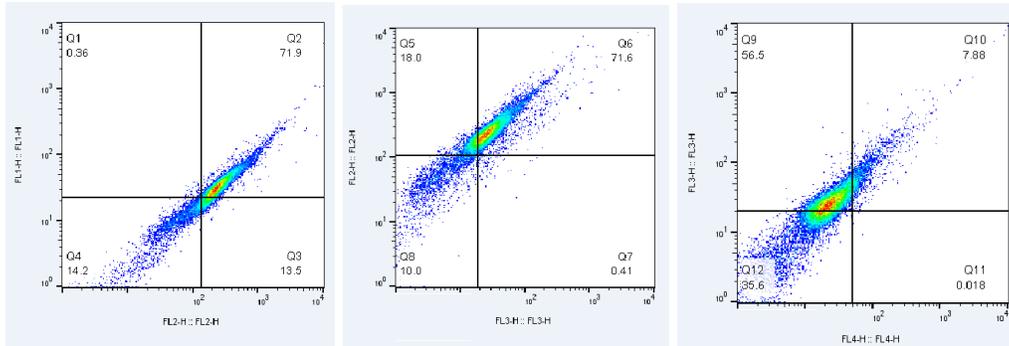
B2)



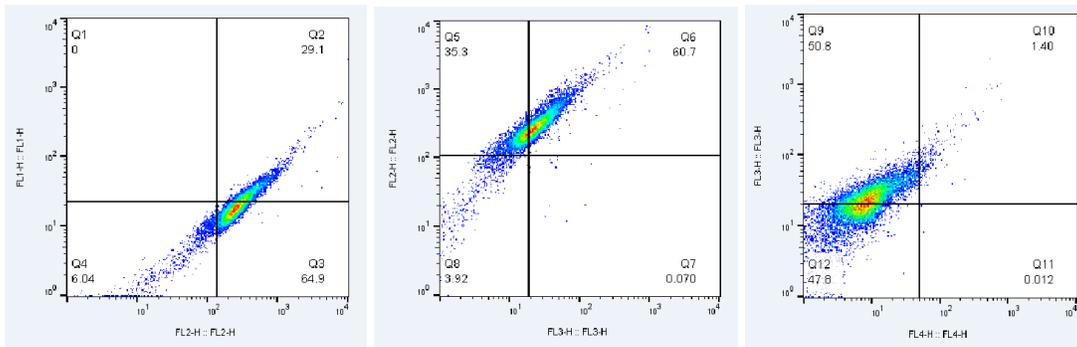
C1)



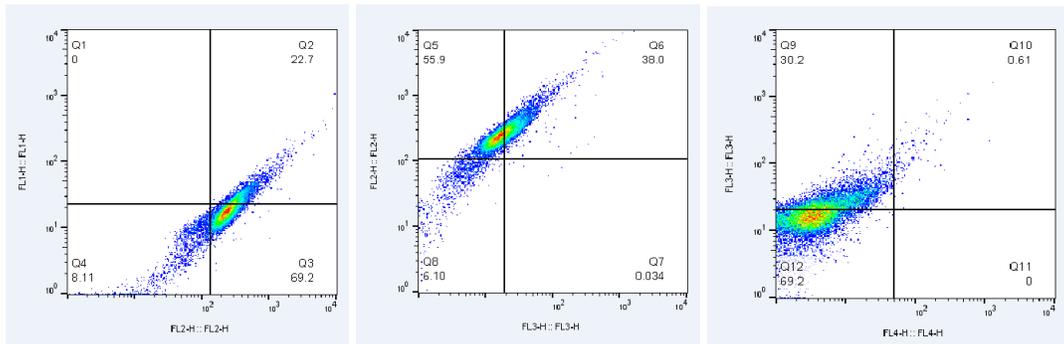
C2)



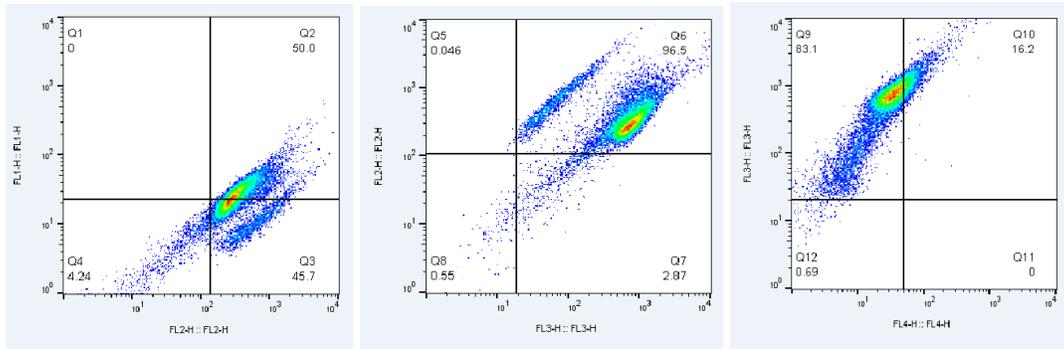
D1)



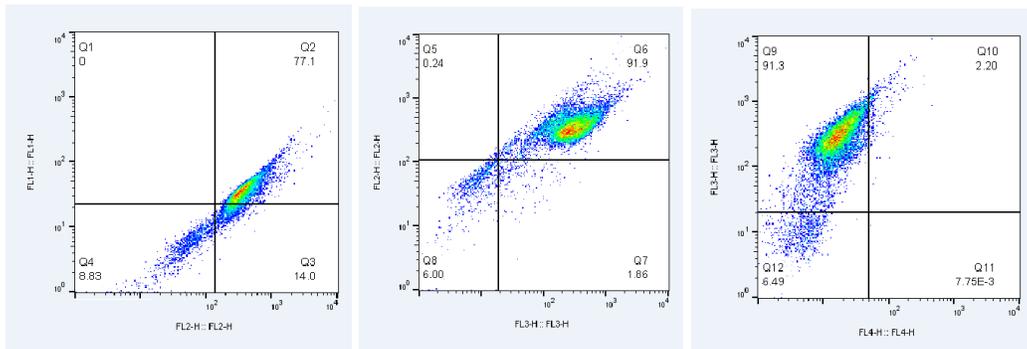
D1)



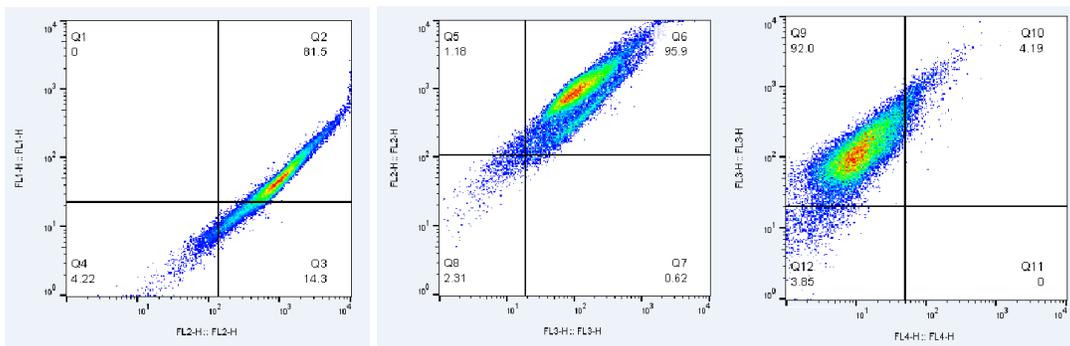
E1)



E2)



F1)



F2)

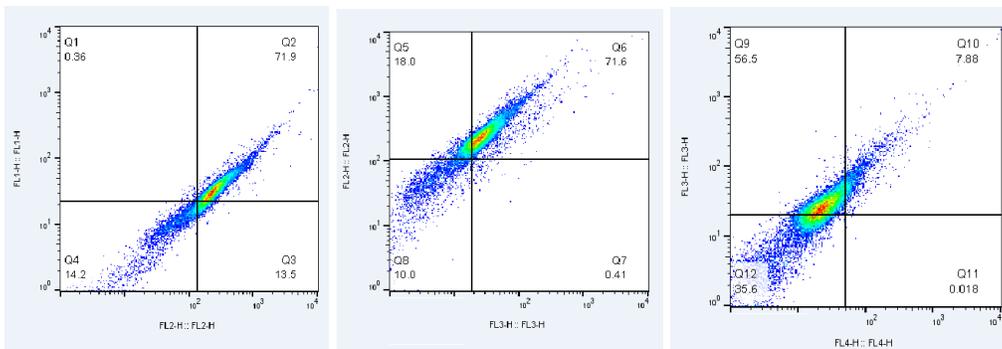


Figura 7.6.2 Diagrama de puntos A1-F1 antes y A2F2 después del tratamiento con H_2O_2 las sondas CC (1)- CCy (6).

8. Funcionamiento de la sonda CC334

En esta sección se presentan los experimentos llevados a cabo para la sonda **CCy (1)**, la cual se le denominó en las publicaciones resultantes como: **RC334** o **CC334**, que fue la que presentó propiedades fotoquímicas más interesantes y se eligió para una caracterización más especializada. Entre la caracterización detallada se encuentra la determinación de los tiempos de vida de fluorescencia y las anisotropías de la molécula, de esta forma se pudo proponer el mecanismo fotofísico que rige a la sonda. Para lo anterior se utilizaron las técnicas de fluorescencia resuelta en tiempo conocida como: conteo de fotones únicos correlacionado en tiempo y también la técnica de fluorescencia de suma de frecuencias. Posteriormente, para indagar en los límites de la aplicación de la sonda, se estudió el funcionamiento de la molécula en un sistema más complejo que las líneas celulares por lo que se utilizó el modelo biológico *Danio Rerio*, pez cebra, para dar mayor robustez a la aplicación de la sonda molecular.

8.1. Fluorescencia resuelta en tiempo

8.1.1 Conteo de fotones individuales con correlación de tiempo

En los experimentos con la técnica de conteo de fotones únicos correlacionado en tiempo, se obtuvieron los decaimientos de fluorescencia que conforman cada banda de emisión, el mecanismo detallado de la técnica y del tratamiento de los datos ya ha sido reportado². Con los decaimientos de fluorescencia (**Figura 8.1.1**) se pueden obtener los tiempos de vida de fluorescencia que se reportan en la **Tabla 8.1.1** para la banda de 500 nm y en la **Tabla 8.1.2** para la banda de 700 nm donde **a** son los coeficientes de ajustes y τ son los tiempos de vida de fluorescencia. El IRF es la señal propia del equipo resultado del fotón de excitación. Se pudieron detectar decaimientos con tiempos de vida con valores menores a la resolución de la técnica (<1 ps) por lo que se decidió hacer estudios con una técnica con resolución en femtosegundos conocida como: fluorescencia de suma de frecuencias.

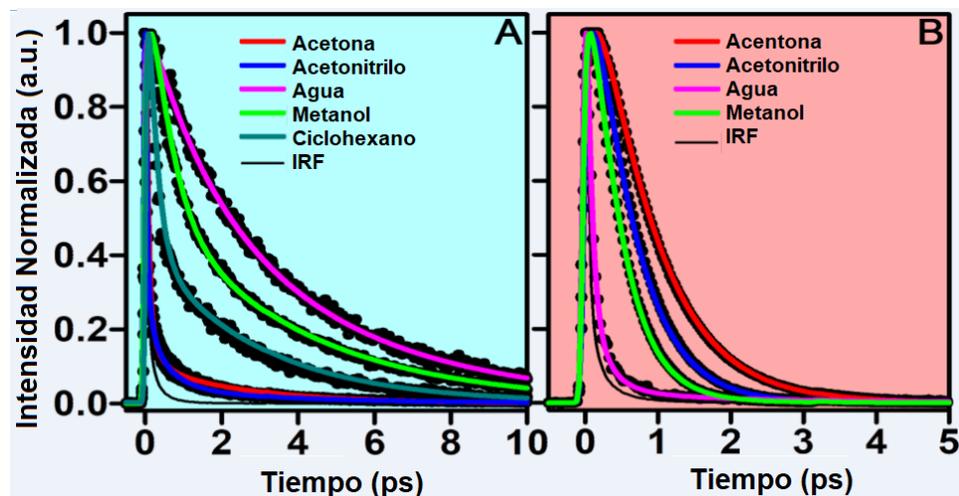


Figura 8.1.1 Curvas de decaimiento de fluorescencia para la banda de (A) 500 nm y para la banda de (B) 700 nm en diferentes disolventes. IRF- función de respuesta instrumental.

Tabla 8.1.1 Parámetros de ajuste para las gráficas de la banda de emisión en el azul (500 nm) en diferentes disolventes excitando a 405 nm.

Disolvente	a_1 [%]	τ_1 [ns]	a_2 [%]	τ_2 [ns]	a_3 [%]	τ_3 [ns]	$\langle \tau \rangle$ [ns]
Acetona	<1	3.7 ± 0.12	>99	<0.1	<1	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Acetonitrilo	<1	3.8 ± 0.1	>99	<0.1	<1	0.6 ± 0.1	<0.1
Agua	54	4.3 ± 0.1	46	0.9 ± 0.1			3.8 ± 0.1
Metanol	33	3.8 ± 0.1	67	0.5 ± 0.1			3.2 ± 0.1
Ciclohexano	17	2.9 ± 0.1	83	0.2 ± 0.1			2.3 ± 0.1

Tabla 8.1.2 Parámetros de ajuste para las gráficas de la banda de emisión en el rojo (700 nm) en diferentes disolventes excitando a 405 nm.

Disolvente	a_1 [%]	τ_1 [ns]	a_2 [%]	τ_2 [ns]	$\langle \tau \rangle$ [ns]
Acetona	100	0.7 ± 0.1			0.7 ± 0.1
Acetonitrilo	100	0.5 ± 0.1			0.5 ± 0.1
Agua	>99	<0.1	<1	2.9 ± 0.12	0.6 ± 0.1
Metanol	100	0.3 ± 0.1			0.3 ± 0.1

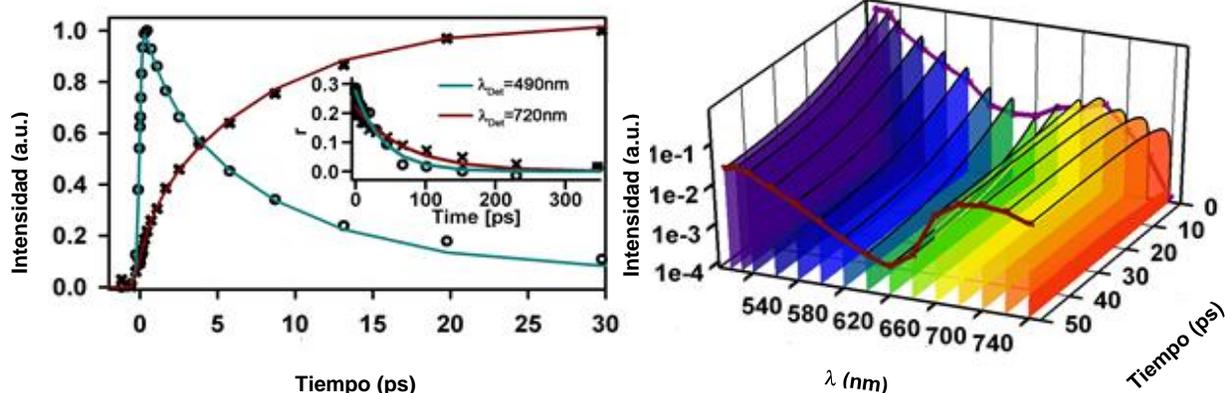
De los datos en las tablas se pueden observar diferentes valores de tiempo de vida de fluorescencia (τ) con sus respectivos coeficientes de ajuste (a) presentados en porcentaje de contribución. Para los datos de la banda de 500 nm se pueden observar hasta tres tiempos de vida de fluorescencia en acetona y acetonitrilo, en cuyo caso el de mayor coeficiente, es el que tiene menor tiempo de vida de fluorescencia (menor a la resolución del equipo). Los tres tiempos de vida de fluorescencia sugiere que hay tres especies con emisión de fluorescencia con tres diferentes tiempo de vida. Uno con τ en el orden de nanómetros, otro en decimas de nanómetros y otro menor a la resolución del equipo < 1 nm. Mientras que en los otros disolventes agua, metanol y ciclohexano se observan dos tiempos de vida de fluorescencia (con valores de nanómetros y el otro en decimas de nanómetros), lo que puede interpretarse como que hay dos especies que están emitiendo. Por

otra parte, en la banda de 700 nm se observa prácticamente un único tiempo de vida de fluorescencia con valores de decimas de nanosegundos. Por la naturaleza de los disolventes en acetona y acetonitrilo debido a su polaridad se puede proponer que se forma un estado de transferencia de carga, el cual no se observó en los otros disolventes, por ello se obtuvieron tres tiempos de vida de fluorescencia y los otros estados emisores corresponden a un estado local excitado y a un decaimiento y a la emisión de un estado superior, lo cual se discute en la siguiente sección. Se eligieron dos disolventes para hacer los estudios con la técnica de suma de frecuencias, un disolvente prótico y uno no prótico, metanol y acetona respectivamente.

8.1.2 Suma de frecuencias transitorias

Con la técnica de suma de frecuencias transitorias se obtuvieron los decaimientos de fluorescencia con resolución en pico segundos. De tal forma que se puede observar en la **Figura 8.2.1** las gráficas de decaimiento de fluorescencia de la sonda **CCy (1)** con detección en 490 nm y con detección en 720 nm, también se presenta una gráfica insertada el decaimiento de anisotropía a las mismas longitudes de onda (490 y 720 nm). Por otro lado, también se presenta el espectro resuelto en tiempo para **CCy (1)** a las diferentes longitudes de onda medidas, tanto para las disoluciones en acetona **A)**, como en metanol **B)**. En ambos casos el espectro resuelto en tiempo a los 50 ps permite ver la construcción de un espectro similar al obtenido por la técnica de fluorescencia de estado estacionario. Mientras que con los decaimientos de anisotropía se permite determinar en el caso de la disolución en metanol que la especie en estado basal y en estado excitado es similar en ambas longitudes de onda, lo que permite deducir que se trata de la misma especie y por tanto decir que se trata de un estado energético superior, de tal forma que estaría ocurriendo una ruptura a la regla de Kasha. Mientras que la anisotropía en la disolución de acetona permite ver que son dos especies muy diferentes en el caso de la longitud de onda de 720 nm, esto permite corroborar lo que se había observado en fluorescencia estacionaria, que la emisión de 720 nm en acetona es debido a un estado de transferencia de carga.

A)



B)

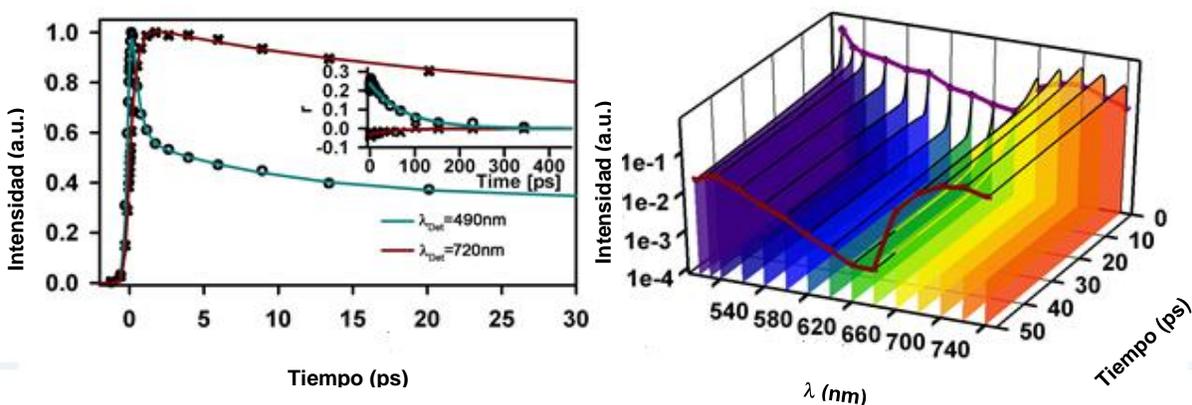


Figura 8.2.1 Curvas de decaimiento de fluorescencia de **CCy (1)** en (A) metanol y (B) acetona.

8.3 Experimentos *in vivo* con *Danio rerio*

Para probar la permeabilidad de la sonda a las células de embriones se hizo una primera prueba de incubación, dejando los embriones en las mismas disoluciones de la sonda **CCy (1)**, a diferentes tiempos (30, min, 1, 3, 12 y 24 horas. No se observaron cambios significativos a partir de una exposición mayor a tres horas. En la **Figura 8.3.1** se observan imágenes de microscopio estereoscópico de los embriones de pez cebra con cuatro horas post fecundación (hpf) incubadas por tres horas con $10 \mu\text{M}$ de la sonda **CCy (1)**. En la figura A) se observan los embriones con la sonda en campo claro y en el canal verde y en las imágenes de B) se observan otros embriones con la sonda, pero con la adición de oxígeno singlete. Es posible observar cualitativamente un aumento en la intensidad de fluorescencia en el canal verde, lo que implica la oxidación de la sonda y la formación de la cumarina.

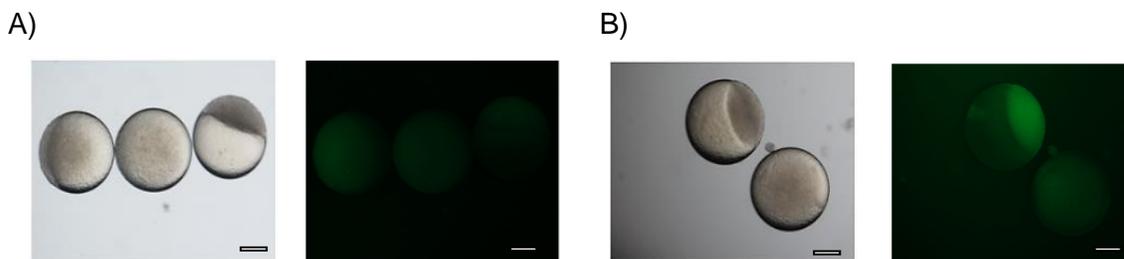


Figura 8.3.1 Embriones de pez cebra (4 hpf), con 10 μ M de **CCy (1)**. A) sin estímulo y B) con estímulo de oxígeno singlete. Canal verde y campo claro (Barra de escala de 1 mm)

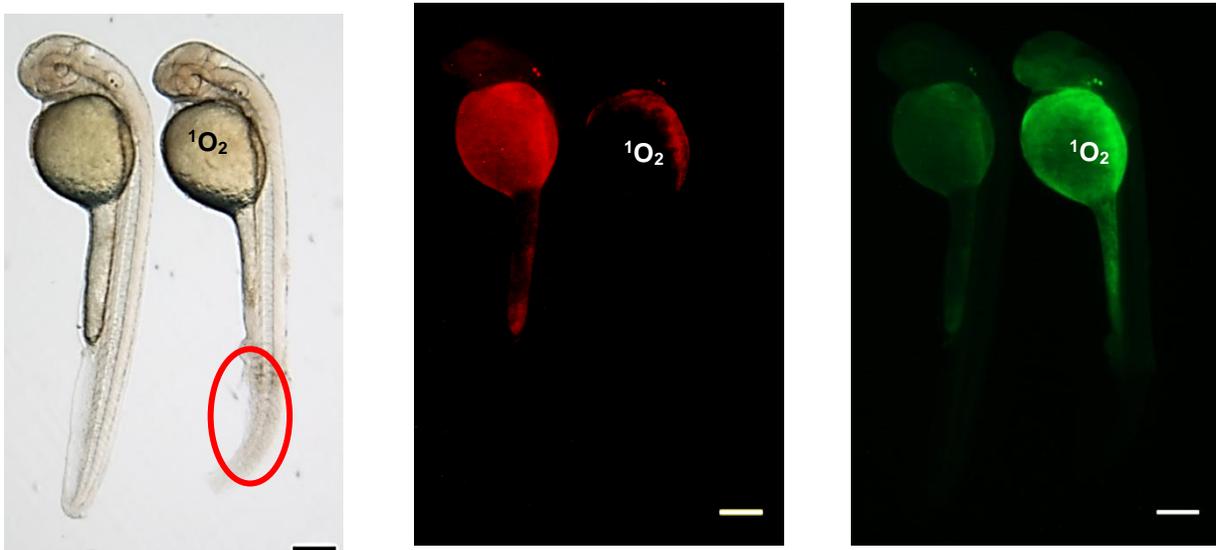
Posteriormente se estudió el efecto de la concentración en larvas del pez cebra, utilizando concentraciones de 0, 5, 10, 25 y 50 mM. Fue posible observar un aumento en la intensidad de emisión conforme se incrementó la concentración de la sonda. También cabe señalar que a tales concentraciones no se observó algún daño o cambios morfológicos en el desarrollo de la larva. En la **Figura 8.3.2** se observa las imágenes de microscopía estereoscópica de las larvas de pez a las concentraciones mencionadas tanto en el canal verde como en campo claro. Cabe señalar que la larva del pez en la imagen de campo claro que fue tratada con 10 mM de la sonda presenta pigmentación debido al propio desarrollo del pez y no está asociado al tratamiento con la molécula. Es posible observar que la emisión proviene principalmente del vitelo y del otolito, aunque en menor intensidad también se observa emisión en tejido epitelial.



Figura 8.3.2 Larvas de pez cebra (48 hpf) con diferentes concentraciones de **CCy (1)** en campo claro y canal verde.

Después de corroborar la permeabilidad de la sonda a las larvas de pez y de seleccionar la concentración de la sonda óptima para trabajar se hicieron pruebas de oxidación $^1\text{O}_2$ en larvas de pez, para observar el cambio en la intensidad de fluorescencia producido por la oxidación (detección) del analito. Nuevamente se utilizaron larvas con 48 hpf a las cuales se les dispuso en

una disolución 25 mM de **CCy (1)**, para posteriormente añadir oxígeno singlete 5 μL (0.62 M) preparado *ex situ* a partir de una relación de peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio, se dejó permear por unos 10 min y se tomaron las imágenes (**Figura 8.3.3**). De las imágenes en campo claro se puede observar que al pez que se le añadió el tratamiento oxidativo presentó un daño al final del caudal, matando a las células por completo. En el pez sin tratamiento oxidativo se observa la emisión dual característica de la sonda, presenta emisión tanto en el canal verde como en el canal rojo. Por otro lado, al pez con tratamiento de oxígeno singlete se observa una disminución en la emisión en el canal rojo, pero un aumento en la intensidad de emisión en el canal verde; también puede notarse que en la parte que sufrió mayor daño por el tratamiento, no hay emisión. Esto nos indica que está ocurriendo la oxidación de la sonda por el tratamiento oxidativo.



*Figura 8.3.3 Imágenes de microscopía estereoscópica en campo claro, canales rojo y verde para larvas de pez con la sonda **CCy (1)**, con y sin tratamiento oxidativo. Barra de escala de 1 mm.*

Posteriormente para demostrar en microscopía estereoscópica el cambio en la emisión debido al tratamiento oxidativo, se decidieron hacer estudios con microscopía confocal para determinar si el comportamiento de la sonda era igual en las células del organismo vivo que en los cultivos celulares. Por lo que nuevamente a un pez con 48 hpf se incubó con 50 mM de **CCy (1)**, se tomaron imágenes con microscopía confocal, de la región caudal del pez, tratando de enfocar las células epiteliales con menor capa de células para lograr un mejor enfoque. Después de observar el comportamiento similar con emisión en el canal verde y rojo se pudo observar con un zoom de 60x células epiteliales. De esta forma se visualizó que la emisión tanto en el canal verde como en el canal rojo provenían de la región en la periferia del núcleo tipo red mitocondrial, justo lo que se había observado en los cultivos celulares. Pero posteriormente al hacer la adición de oxígeno

singlete generado *ex situ*, se observó un cambio en la intensidad y localización en el canal verde mientras que en el canal rojo se observó una disminución de la emisión muy significativa. Para el caso del pez tratado con $^1\text{O}_2$ en el canal verde la emisión desapareció de la periferia del núcleo casi en su totalidad y apareció emisión desde el núcleo. Lo anterior ya se había explicado previamente y se debe a la fragmentación de la molécula, generándose una cumarina que se va a intercalar en el ADN que se encuentra en el núcleo, dicha cumarina tiene mayor intensidad de fluorescencia, por eso la señal es mayor.

En la **Figura 8.3.4** se observa en A) una imagen de microscopía estereoscópica del pez cebra, en B) se puede observar una imagen de microscopía confocal con un objetivo 20x la parte del fin del caudal del mismo pez, en el canal rojo, verde y una superposición de canales antes del tratamiento oxidativo con oxígeno singlete. Mientras que en C) se observan imágenes, con un objetivo 60x de la región del caudal del pez donde ya es posible observar estructuras celulares, se puede notar que la emisión tanto en verde como en rojo provienen de la periferia del núcleo tipo red mitocondrial. Y en D) se pueden observar las células del final del caudal después del tratamiento oxidativo con oxígeno singlete, en este caso se puede notar que la emisión en el canal rojo ha disminuido considerablemente, mientras que en el canal verde puede observar que aumentó la fluorescencia y que la localización ha cambiado, ahora la emisión proviene principalmente de la región nuclear. Lo anterior corresponde perfectamente a lo que se había observado en los cultivos celulares. De tal forma que podemos concluir que la sonda **CCy (1)** funciona en sistemas vivos de diferente complejidad. Cabe señalar que los estudios presentados son experimentos que se limitaron a la parte cualitativa donde el cambio en la intensidad de señal en ambos canales nos confirma la oxidación de la sonda. De igual forma tener dos canales de respuesta con misma localización antes del tratamiento oxidativo y con localización diferenciada después del tratamiento oxidativo ayuda a observar dos organelos en diferentes momentos del proceso. Finalmente, para poder hacer un estudio cuantitativo similar al realizado en las líneas celulares con el tratamiento fotodinámico, donde de alguna forma se pudo controlar la irradiación, el tiempo de exposición y por tanto la producción de $^1\text{O}_2$, se torna más complicado en los experimentos *in vivo*, por ello se recurrió a la estimulación externa donde es también es difícil conocer con exactitud la concentración que logra permear de $^1\text{O}_2$ y que a su vez va a inducir la producción oxígeno *singlet* endógeno. Por tanto, dar un dato cuantitativo en los estudios en organismos más complejos que las líneas celulares aun significa un reto.

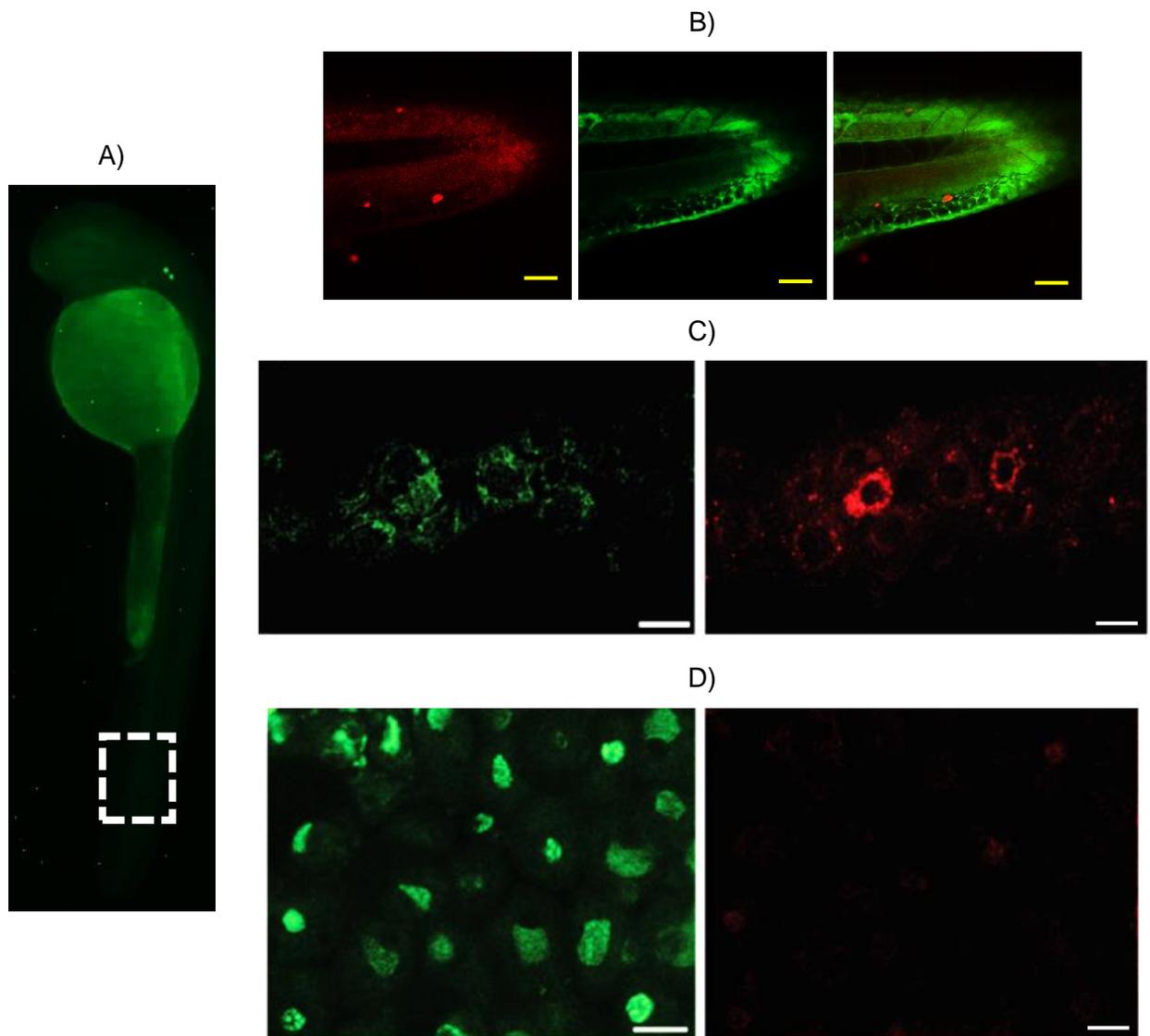
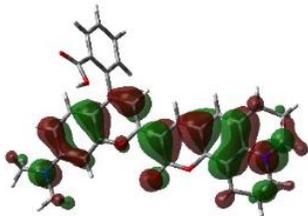
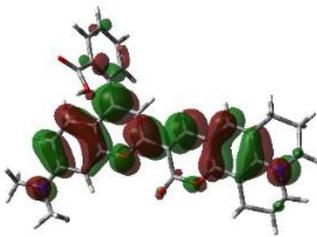
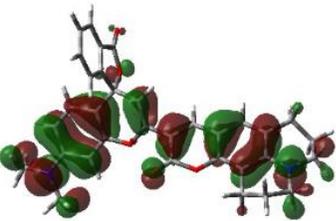
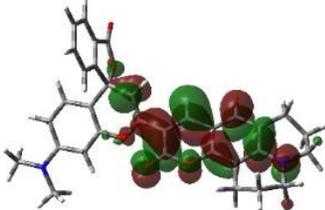


Figura 8.3.4 Imagen de Pez cebra incubado con la sonda **CCy (1)** A) microscopía estereoscópica, B) confocal a 20x. C) Confocal a 60x antes y D) después del tratamiento oxidativo en el canal verde y rojo.

8.4 Metodología computacional

Tabla 7.3.1 Orbitales naturales de transición (NTO) para el primer estado singlete excitado **CCy (1)**. La columna de la izquierda indica en secuencia las energías de transición en eV, la fuerza del oscilador (f), los valores propios de NTO (w) y los niveles de MO asociados.

Tabla 7.3.1 Orbitales y secuencias de energía de transición para la sonda **CCy (1)**

RC334 absorption	Hole	Particle
2.362 eV; $f = 1.240$; $w = 0.98$; HOMO – LUMO		
3.399 eV; $f = 0.419$; $w = 0.93$; HOMC – LUMO		

Analizamos las características de densidad electrónica tras la excitación de la sonda y el análisis de orbitales naturales de transición (NTO), que proporciona una representación orbital compacta de la transición electrónica a través de una interacción única hueco-electrón. Luego, las interacciones NTO muestran que la sonda involucra una distribución electrónica diferente entre las formas abiertas y cerradas al analizar el par HONTO-LUNTO. Los valores propios de NTO (w) que representan el grado en que la interacción electrónica se puede escribir como una excitación única son 0.98 en ambas formas, abierta y cerrada. Mientras que la forma cerrada tiene una conformación no plana, que interrumpe cualquier comunicación electrónica en el eje molecular conjugado, la forma abierta favorece una conformación altamente plana en este eje conjugado, permitiendo un momento pseudo-cuadrupolo con características de transferencia de carga $\pi \rightarrow \pi^*$.

9. CONCLUSIONES

La serie de compuestos fluorescentes diseñados para presentar fluorescencia dual y localización mitocondrial muestran propiedades y sensibilidades diferentes ante diversos parámetros químicos y fisicoquímicos explorados. Los equilibrios ácido-base que presentaron las sondas fue el principal parámetro que modificó la intensidad de fluorescencia de manera reversible, sin que estas fueran sensibles a la polaridad o a la viscosidad. Sin embargo, por sus constantes de acidez intrínsecas, las cuales están muy alejadas de los valores de pH fisiológico, no son una buena opción para determinar cambios de pH en organelos celulares específicos, como mitocondria (pH ~ 8) o lisosomas (pH ~ 4). Pero, por otra parte, las sondas **CCy (1)** y **CCy (2)** presentaron sensibilidad a la oxidación, la primera de manera selectiva y la segunda de manera no selectiva hacia alguna ROS. Estas sondas además nos permitieron definir que es el grupo enona el sensible a la oxidación frente a diferentes agentes oxidantes y no el grupo oxonio como se había reportado anteriormente. La diferencia en la reactividad entre ambas sondas ante la oxidación proponemos que se debe a la geometría de las moléculas y a los propios mecanismos de reacción de cada ROS. El mecanismo de reacción de oxígeno singlete en diversas moléculas reportadas ocurre por la formación de un endoperóxido a través de una cicloadición 2-4^{53,54}. Mientras que el peróxido de hidrogeno y el hipoclorito de sodio reaccionan a través de una epoxidación nucleofílica⁹. Ello a su vez depende de la geometría de la sonda para que pueda darse uno u otro mecanismo.

Con la sonda **CCy (1)**, se determinaron mediante técnicas de fluorescencia resuelta en tiempo que los mecanismos fotofísicos responsables de la fluorescencia dual son particularmente los mecanismos de transferencias de carga y rompimiento a la regla de Kasha, principalmente. Lo cual ayuda a comprender y trasladar lo observado en microscopía confocal a un marco más químico, para un mejor entendimiento del fenómeno. Para el caso de esta sonda fue posible hacer una diferenciación suborganelar posterior a la oxidación, permitiendo observar a la mitocondria y posteriormente tras el tratamiento con oxígeno singlete que genera la fragmentación a una cumarina con localización nuclear debida a la intercalación en los *grooves* del ADN. También con esta sonda se realizó una serie de pruebas en el modelo biológico pez cebra, en el cual se estudió nuevamente la localización en las células del pez, observando un comportamiento similar a lo descrito en los cultivos celulares, logrando obtener la diferenciación organelar tras el tratamiento oxidativo con oxígeno singlete. Para el caso de la sonda **CCy (2)**, hubo sensibilidad a la oxidación con peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y con hipoclorito de sodio, sin embargo, dado que las respuestas observadas en microscopía después de generar el estrés oxidativo, la emisión en el canal verde

aumenta pero sin cambio en la localización de la sonda debido a que no se fragmenta, permite hacer una diferenciación en una simple modificación como es el aumento de la conjugación.

Aunque las otras sondas no demostraron ser sensibles a algún parámetro en particular, si exhibieron una excelente localización mitocondrial. Además algunas tuvieron buenos rendimientos cuánticos de fluorescencia como el caso de **CCy (3)**, **CCy (4)** y **CCy (6)** y aunado a ello la síntesis para su preparación es sencilla, lo que las convierte sin duda en una excelente opción para ser utilizadas como marcadores celulares de mitocondria. Algunas propiedades que se pueden seguir explorando es el intentar generar el proceso de *Blinking* o centelleo, necesario para utilizar la microscopía de súper resolución, a través de mecanismos como el estado transferencia de carga producto del cambio estructural de la molécula. También podría ser interesante estudiar este tipo de sondas con microscopía FLIM para determinar los tiempos de vida de fluorescencia y poder hablar de diferencias locales en la mitocondria y quizá de esa forma lograr comprender aún más los procesos químicos involucrados. Por último, otro interés más específico sería ampliar el estudio a otros sistemas vivos más complejos que puedan dar mayor aplicación a las sondas.

10. APÉNDICES

1.- Ajuste para determinación de pK_a por absorción

$$\text{Abs} = (A_{in} + A_0 * 10^{(pK_a - pH)}) / (1 + 10^{(pK_a - pH)})$$

Donde la Abs es la absorción a una longitud de onda fija

A_{in} es la Absorción al final de la titulación

A_0 es el valor de absorción al inicio de la titulación

2.- Ajuste para determinación de pK_a por fluorescencia

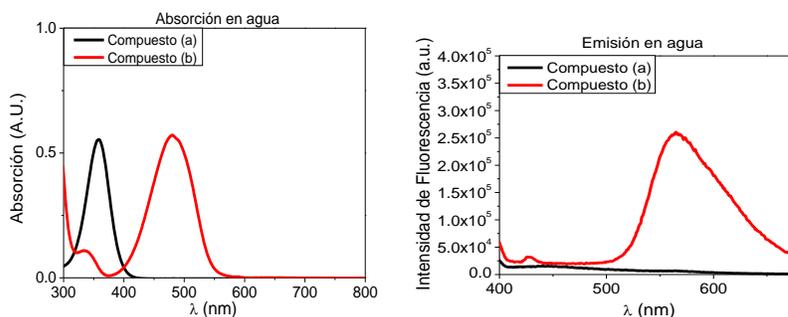
$$FI = (FI_{in} + FI_0 * 10^{(pK_a - pH)}) / (1 + 10^{(pK_a - pH)})$$

Donde la FI es la absorción a una longitud de onda fija

FI_{in} es la Absorción al final de la titulación

FI_0 es el valor de absorción al inicio de la titulación

3.- Espectros de Absorción y emisión para los compuestos a) y b) de la síntesis



4.- Estudio solvatocrómico para la sonda CCy (1) análisis de Catalán^{25,55}

Se realizó un estudio solvatocromico utilizando del modelo multiparamétrico de Catalán, utilizando los valores reportados de SA, SB, SP y SdP para 30 diferentes disolventes. Y a continuación se presentan los espectros de absorción y emisión para la sonda **CCy (1)**, en los disolventes que aparecen en los espectros. Se utilizaron 2 mL de disolvente y una concentración de 10 mM de la sonda. De tal forma que se observó un comportamiento muy diferenciado en los espectros de absorción entre disolventes próticos y no próticos; se ordenaron por valor de polaridad (SP) para facilitar identificar tal efecto, pero se concluyó que el principal efecto que se observó fue la acidez y basicidad y en menor medida la polaridad y polarizabilidad. En las tablas se muestran los valores y se señalan las contribuciones que fueron más significativos, considerando los mínimos errores. Dado a las enormes semejanzas en los espectros de absorción y emisión en los diferentes

disolventes de las demás sondas, consideramos que todas presentarían un comportamiento solvatocrómico muy similar al de esta sonda **CCy (1)**. Por lo que el parámetro más importante que influye es la acidez y basicidad.

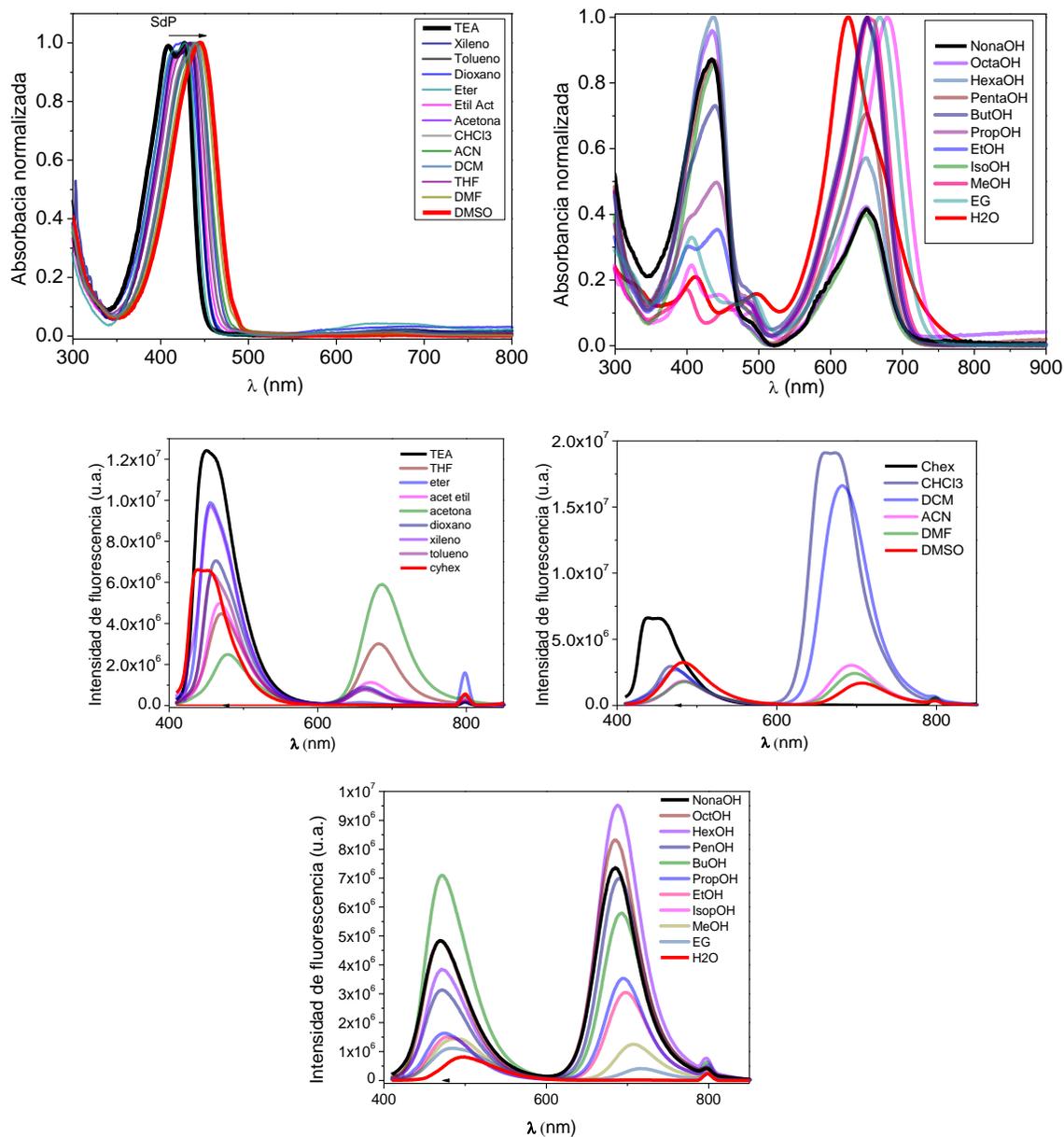


Tabla 1 Valores Estimados de los coeficientes y_0 , a_{SA} , b_{SB} , c_{SP} , d_{SdP} y el coeficiente de correlación múltiple r para el análisis de regresión del compuesto CCy (1), de acuerdo con los parámetros de Catalán (SA , SB , SP , SdP) en 30 diferentes disolventes.

Observable	y_0 (cm ⁻¹)	a_{SA}	b_{SB}	c_{SP}	d_{SdP}	R
v abs	20030 ± 5467	-8581 ± 1883	222 ± 1555	5480 ± 7455	-1636 ± 1733	0.79
v em	20601 ± 7062	-2469 ± 2433	-4973 ± 2433	4879 ± 9630	-5198 ± 2238	0.70

Δv	-571 ± 8767	-4678 ± 4151	4382 ± 2964	241 ± 11889	3519 ± 2760	0.76
------------	-----------------	------------------	-----------------	-----------------	-----------------	------

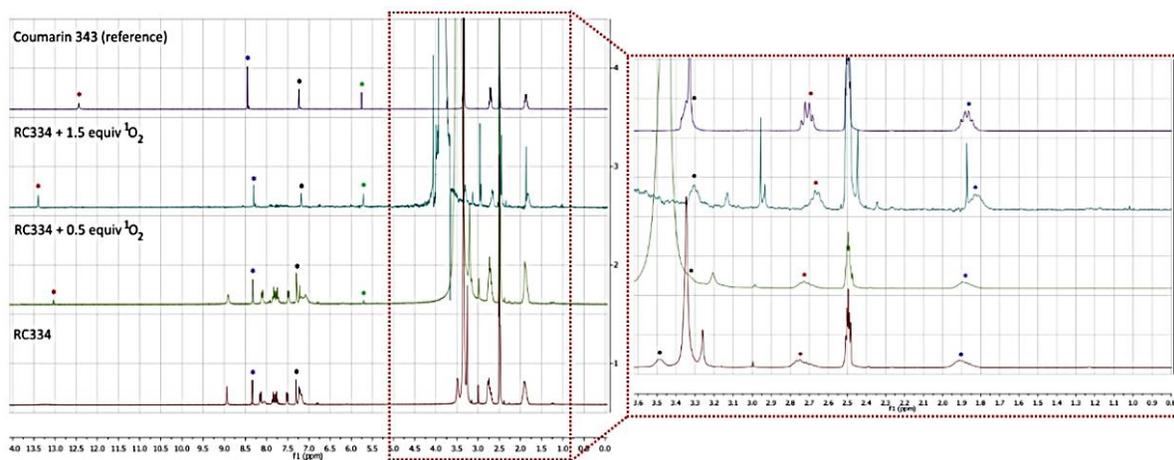
Tabla 2 Valores Estimados de los coeficientes y_0 , a_{SA} , b_{SB} , c_{SP} , d_{SdP} y el coeficiente de correlación múltiple r para el análisis de regresión del compuesto CCy (1), de acuerdo con los parámetros de Catalán (SA, SB, SP, SdP) en disolventes próticos.

Observable	y_0 (cm ⁻¹)	a_{SA}	b_{SB}	c_{SP}	d_{SdP}	r
v_{abs}	10149 ± 27865	-13120 ± 10153	4544 ± 7079	18604 ± 26960	-3060 ± 13828	0.79
v_{em}	15396 ± 322	-1233 ± 117	-212 ± 82	-129 ± 312	-382 ± 160	0.99
Δv	-55246 ± 27658	-11887 ± 1077	4756 ± 7026	18734 ± 26761	-2678 ± 13725	0.77

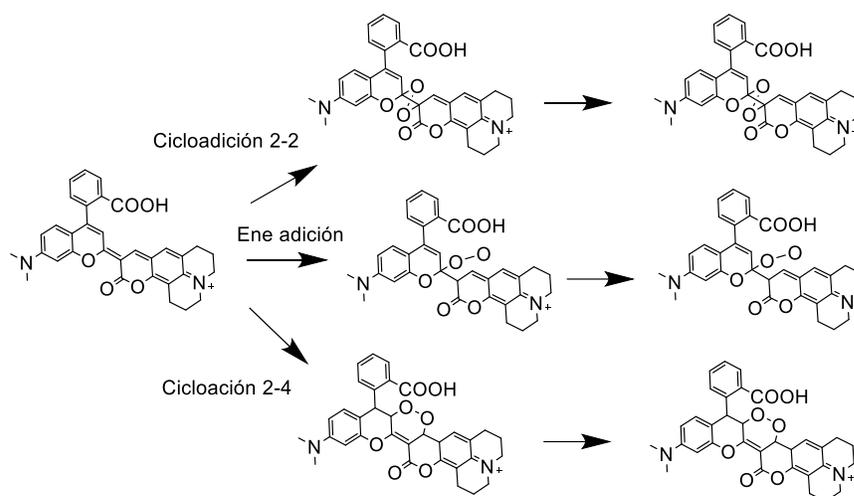
Tabla 3 Valores Estimados de los coeficientes y_0 , a_{SA} , b_{SB} , c_{SP} , d_{SdP} y el coeficiente de correlación múltiple R para el análisis de regresión del compuesto CCy (1), de acuerdo con los parámetros de Catalán (SA, SB, SP, SdP) en disolventes no próticos.

Observable	y_0 (cm ⁻¹)	a_{SA}	b_{SB}	c_{SP}	d_{SdP}	R
v_{abs}	24549 ± 334	-4057 ± 1858	88 ± 120	-1695 ± 460	-470 ± 117	0.97
v_{em}	15553 ± 8301	34377 ± 46220	1478 ± 2985	11537 ± 11452	-8732 ± 2911	0.78
Δv	8996 ± 8281	-38434 ± 46108	-1390 ± 2978	-13232 ± 11424	8262 ± 2904	0.76

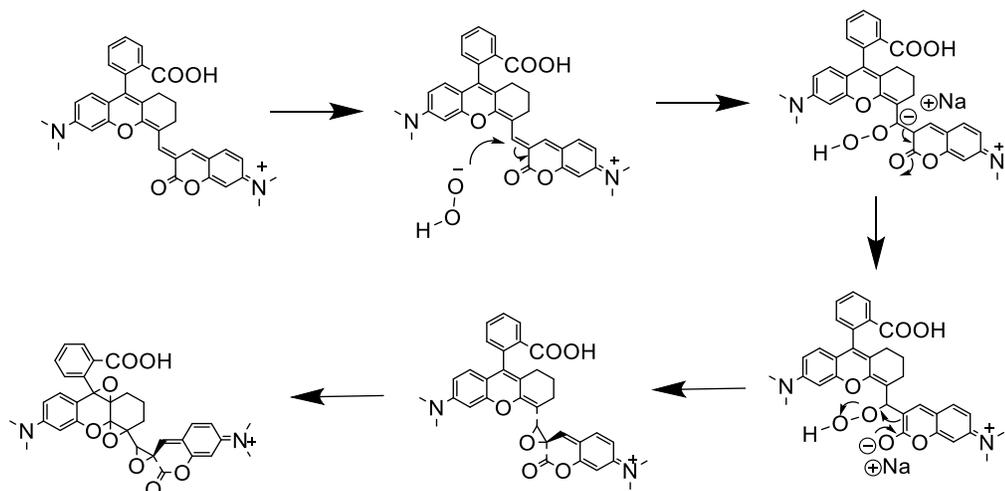
5.- Espectros de RMN de protón para la titulación de la sonda CCy (1) con ¹O₂.



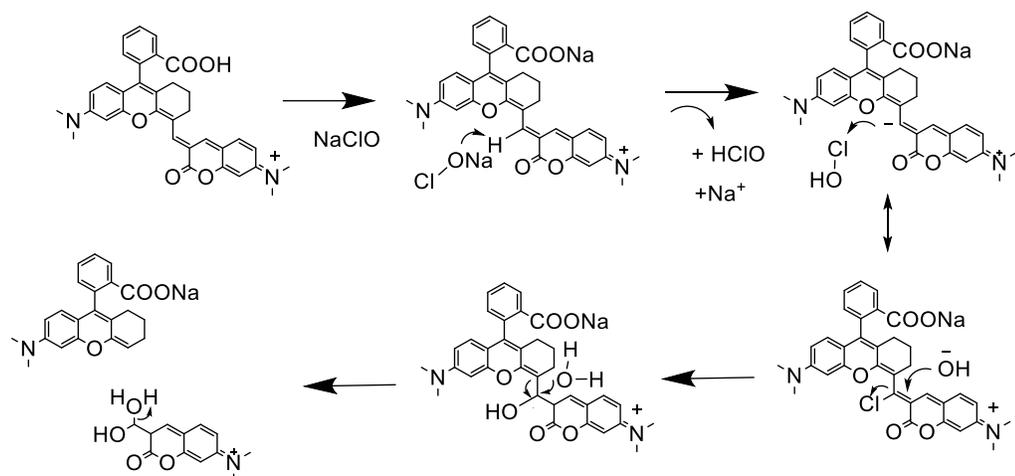
6.- Mecanismos de reacción CCy (1). Cicloadición 2-2, 2-4 y ene-adición^{56,57}



7.- Mecanismo de reacción CCy (2). Epoxidación nucleofílica asimétrica con H₂O₂⁵⁸

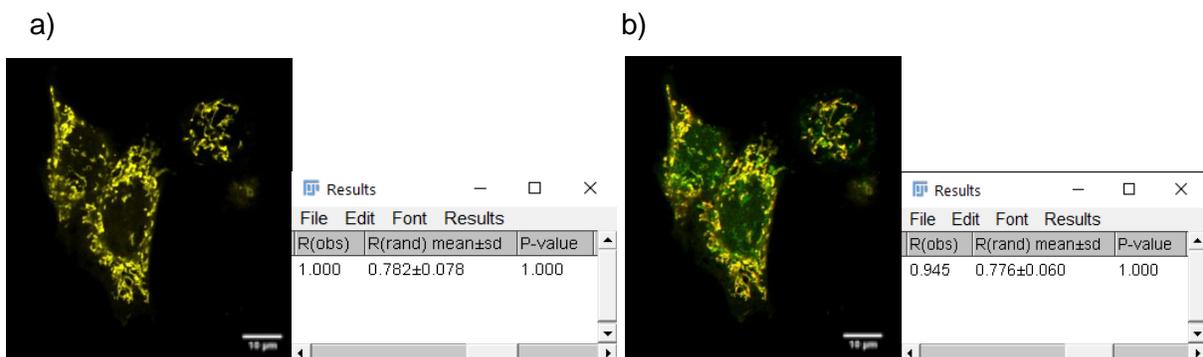


Mecanismo de reacción CCy (2). Epoxidación nucleofílica asimétrica con NaClO⁵⁸



8.- Ejemplo de colocación de la sonda CCy (6) con TMRM (Tetramethylrhodamine)

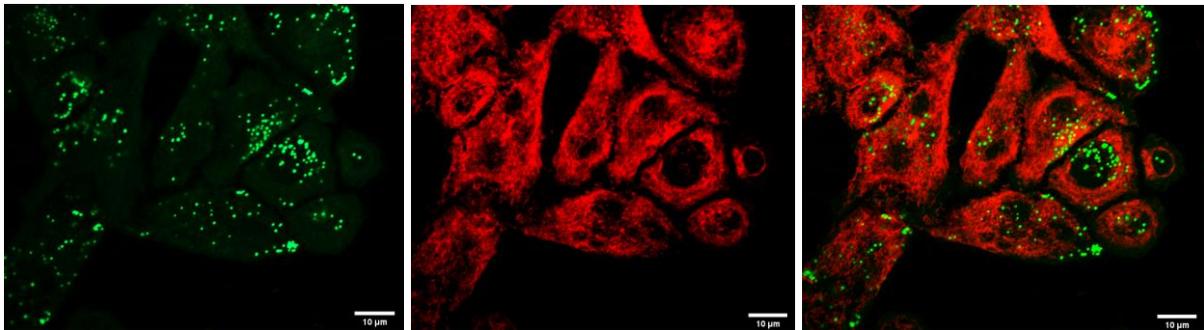
Con el programa de ImageJ 1.52p que es un *software* libre, para el análisis de imágenes, con dicho programa se determinaron las R(obs) que son equivalentes al coeficiente de Pearson. Primero se incubó nuestra y después de obtener la emisión en el canal rojo y verde se determinó la imagen **a)** solapamiento de imágenes en ambos canales para **CCy (6)**, se obtuvo evidentemente un coeficiente de Pearson de 1, dado que la emisión proviene del mismo lugar para ambos canales. Sin embargo, al adicionar el estándar se observó que al solapar nuevamente los colores ahora hay regiones en verde (que corresponden a nuestra la sonda **CCy (6)** ya que TMRM emite en el canal rojo). Esto puede indicar que la adición de TMRM desplaza a la localización de la sonda **CCy (6)**, pero para determinar el coeficiente de Pearson, se omitió efecto del desplazamiento y se obtuvo un valor de 0.94 de la imagen **b)**. (R (rand) mean representa los valores medios de puntos de emisión)



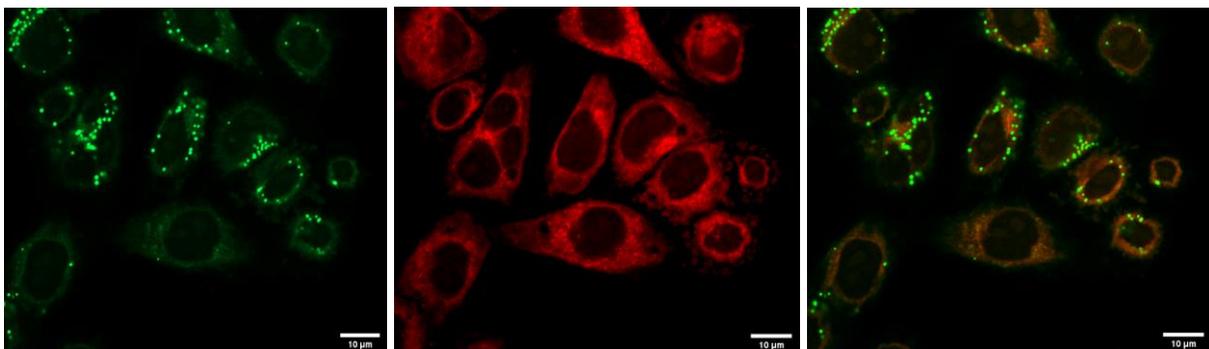
9.- Despolarización de la membrana mitocondrial con CCCP, sonda CCy (3).

En las imágenes se puede apreciar en A) células HeLa con la sonda **CCy (3)** antes de la adición de el ionóforo Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) y en B) después del tratamiento. CCCP desacopla el gradiente de protones lo que hace que disminuya el potencial de membrana mitocondrial y por tanto las moléculas que se encuentra por gradiente nernstiano salen de la mitocondria, lo que lleva a una disminución de la fluorescencia en esa región además y por lo mismo se vuelve más difusa. Para el caso de la sonda **CCy (3)** se había mencionado que en el canal verde marcaba una región diferente a mitocondria. Lo que se puede observar es que efectivamente al adiciones CCCP la emisión en el canal rojo se hace muy difusa y además disminuye un poco, mientras que en el canal verde dado que no son mitocondrias y no sufren despolarización la emisión permanece casi intacta. Para el caso de las demás sondas simplemente se observó la disminución en la intensidad de fluorescencia en la región mitocondrial.

A)



B)



10. Biblioografía

1. Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012).
2. Josep R Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer US, 2006).
3. Birk, U. j. *Super-Resolution Microscopy. A Practical Guide*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2018).
4. Manzo, C. & Garcia-Parajo, M. F. A review of progress in single particle tracking: From methods to biophysical insights. *Reports Prog. Phys.* **78**, 124601–124629 (2015).
5. Wolfbeis, O. S. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4743–4768 (2015).
6. Mahendra, S., Zhu, H., Colvin, V. L. & Alvarez, P. J. Quantum dot weathering results in microbial toxicity. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 9424–9430 (2008).
7. Shaya, J. *et al.* Turn-on Fluorene Push-Pull Probes with High Brightness and Photostability for Visualizing Lipid Order in Biomembranes. *ACS Chem. Biol.* **12**, 3022–3030 (2017).
8. Bruns, O. T. *et al.* Next-generation in vivo optical imaging with short-wave infrared quantum dots. *Nat. Biomed. Eng.* **1**, 56–67 (2017).
9. Gao, P., Pan, W., Li, N. & Tang, B. Fluorescent probes for organelle-targeted bioactive species imaging. *Chem. Sci.* **10**, 6035–6071 (2019).
10. Neuzil, J., Pervaiz, S. & Fulda, S. *Mitochondria: The Anti- cancer Target for the Third Millennium. Mitochondria: The Anti- cancer Target for the Third Millennium* (Springer Netherlands, 2014).
11. Galloway, C. A. & Yoon, Y. Mitochondrial morphology in metabolic diseases. *Antioxidants Redox Signal.* **19**, 415–430 (2013).
12. Jiang, L. *et al.* Determining the contents and cell origins of apoptotic bodies by flow cytometry. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
13. Li, Y. & Li, Z. Mitochondria and apoptosis. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* **34**, 183–184 (2000).
14. Sakamuru, S., Attene-Ramos, M. S. & Xia, M. Mitochondrial membrane potential assay. *Methods Mol. Biol.* **1473**, 17–22 (2016).
15. Nam, H. Y. *et al.* Mitochondria-Targeting Peptoids. *Bioconjug. Chem.* **29**, 1669–1676 (2018).
16. Tian, M., Ma, Y. & Lin, W. Fluorescent Probes for the Visualization of Cell Viability. *Acc. Chem. Res.* **52**, 2147–2157 (2019).

17. Valledor, M. *et al.* A critical comparison between two different ratiometric techniques for optical luminescence sensing. *Sensors Actuators, B Chem.* **139**, 237–244 (2009).
18. Wu, P., Hou, X., Xu, J. J. & Chen, H. Y. Ratiometric fluorescence, electrochemiluminescence, and photoelectrochemical chemo/biosensing based on semiconductor quantum dots. *Nanoscale* **8**, 8427–8442 (2016).
19. Demchenko, A. P. The concept of λ -ratiometry in fluorescence sensing and imaging. *J. Fluoresc.* **20**, 1099–1128 (2010).
20. Zhu, M. *et al.* Lysosome-targeting ratiometric fluorescent pH probes based on long-wavelength BODIPY. *J. Mater. Chem. B* **6**, 4422–4426 (2018).
21. Wu, Y. *et al.* Fluorescence sensing of anions based on inhibition of excited-state intramolecular proton transfer. *J. Org. Chem.* **72**, 62–70 (2007).
22. Xu, Y. & Pang, Y. Zinc binding-induced near-IR emission from excited-state intramolecular proton transfer of a bis(benzoxazole) derivative. *Chem. Commun.* **46**, 4070–4072 (2010).
23. Marini, A., Muñoz-Losa, A., Biancardi, A. & Mennucci, B. What is solvatochromism? *J. Phys. Chem. B* **114**, 17128–17135 (2010).
24. López-Pérez, G., González-Arjona, D., López-Pérez, G., Domínguez, M. M. & González, A. G. Solvatochromism: A Comprehensive Project for the Final Year Undergraduate Chemistry Laboratory. *J. Lab. Chem. Educ.* **2016**, 45–52 (2016).
25. Babusca, D., Benchea, A. C., Morosanu, A. C., Dimitriu, D. G. & Dorohoi, D. O. Solvent empirical scales and their importance for the study of intermolecular interactions. *AIP Conf. Proc.* **1796**, (2017).
26. Jiang, N. *et al.* Ratiometric fluorescence imaging of cellular polarity: Decrease in mitochondrial polarity in cancer cells. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54**, 2510–2514 (2015).
27. Jiménez-Sánchez, A., Lei, E. K. & Kelley, S. O. A Multifunctional Chemical Probe for the Measurement of Local Micropolarity and Microviscosity in Mitochondria. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **57**, 8891–8895 (2018).
28. Xiao, H., Li, P., Zhang, W. & Tang, B. An ultrasensitive near-infrared ratiometric fluorescent probe for imaging mitochondrial polarity in live cells and in vivo. *Chem. Sci.* **7**, 1588–1593 (2016).
29. Yang, Z. *et al.* A Self-Calibrating Bipartite Viscosity Sensor for Mitochondria. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 9181–9185 (2013).
30. Baek, Y. *et al.* A viscosity sensitive fluorescent dye for real-time monitoring of mitochondria transport in neurons. *Biosens. Bioelectron.* **86**, 885–891 (2016).
31. Guo, R., Yin, J., Ma, Y., Wang, Q. & Lin, W. A novel mitochondria-targeted rhodamine analogue for the detection of viscosity changes in living cells, zebra fish and living mice. *J.*

- Mater. Chem. B* **6**, 2894–2900 (2018).
32. ShenEqual Contribution, S. L. *et al.* A mitochondria-targeted ratiometric fluorescent probe for hypochlorite and its applications in bioimaging. *J. Mater. Chem. B* **5**, 289–295 (2017).
 33. Cheng, D. *et al.* Selective Visualization of the Endogenous Peroxynitrite in an Inflamed Mouse Model by a Mitochondria-Targetable Two-Photon Ratiometric Fluorescent Probe. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 285–292 (2017).
 34. Dong, B. *et al.* Simultaneous Near-Infrared and Two-Photon In Vivo Imaging of H₂O₂ Using a Ratiometric Fluorescent Probe based on the Unique Oxidative Rearrangement of Oxonium. *Adv. Mater.* **28**, 8755–8759 (2016).
 35. https://www.cellsignal.com/contents/_/overview-of-flow-cytometry/flow-cytometry-overview.
 36. Conn, P. M. *Animal Models for the Study of Human Disease: Second edition. Animal Models for the Study of Human Disease: Second Edition* (Elsevier Inc., 2017).
 37. <https://www.nationalgeographic.org/media/genes-are-us-and-them/>.
 38. Yang, X. *et al.* A multi-signal mitochondria-targeted fluorescent probe for real-time visualization of cysteine metabolism in living cells and animals. *Chem. Commun.* **54**, 11387–11390 (2018).
 39. Millar, D. P. Time resolved fluorescence spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 637–642 (1996).
 40. Tanielian, C., Wolff, C. & Esch, M. Singlet oxygen production in water: Aggregation and charge-transfer effects. *J. Phys. Chem.* **100**, 6555–6560 (1996).
 41. Hayyan, M., Hashim, M. A. & Alnashef, I. M. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem. Rev.* **116**, 3029–3085 (2016).
 42. Invitogen. CELL CULTURE BASICS Handbook. in.
 43. Guarin, C. A., Villabona-Monsalve, J. P., López-Arteaga, R. & Peon, J. Dynamics of the higher lying excited states of cyanine dyes. An ultrafast fluorescence study. *J. Phys. Chem. B* **117**, 7352–7362 (2013).
 44. Adamo, C. & Jacquemin, D. The calculations of excited-state properties with time-dependent density functional theory. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 845–856 (2013).
 45. Savarese, M., Guido, C. A., Brémond, E., Ciofini, I. & Adamo, C. Metrics for Molecular Electronic Excitations: A Comparison between Orbital- and Density-Based Descriptors. *J. Phys. Chem. A* **121**, 7543–7549 (2017).
 46. Narayanan, R. Synthesis of green nanocatalysts and industrially important green reactions. *Green Chem. Lett. Rev.* **5**, 707–725 (2012).
 47. Würth, C., Grabolle, M., Pauli, J., Spieles, M. & Resch-Genger, U. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples. *Nat. Protoc.* **8**, 1535–

- 1550 (2013).
48. Reynolds, G. A. & Drexhage, K. H. New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers. *Opt. Commun.* **13**, 222–225 (1975).
 49. Horton, K. L., Pereira, M. P., Stewart, K. M., Fonseca, S. B. & Kelley, S. O. Tuning the activity of mitochondria-penetrating peptides for delivery or disruption. *ChemBioChem* **13**, 476–485 (2012).
 50. Zhou, X. *et al.* Laser controlled singlet oxygen generation in mitochondria to promote mitochondrial DNA replication in vitro. *Sci. Rep.* **5**, 1–10 (2015).
 51. Mehiri, M. *et al.* Cellular Entry and Nuclear Targeting By a Highly Anionic Molecular Umbrella. *Bioconjug. Chem.* **19**, 1510–1513 (2008).
 52. Govindappa M, U. T. Isolation and Characterization of Coumarin Isolated from Endophyte, *Alternaria Species -1* of *Crotalaria pallida* and Its Apoptotic Action on HeLa Cancer Cell Line. *J. Postgenomics Drug Biomark. Dev.* **05**, 1–8 (2015).
 53. Kim, S., Tachikawa, T., Fujitsuka, M. & Majima, T. Far-red fluorescence probe for monitoring singlet oxygen during photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 11707–11715 (2014).
 54. Liu, H. W. *et al.* An efficient two-photon fluorescent probe for monitoring mitochondrial singlet oxygen in tissues during photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **52**, 12330–12333 (2016).
 55. Jiménez-Sánchez, A. & Santillan, R. A photochromic-acidochromic HCl fluorescent probe. An unexpected chloride-directed recognition. *Analyst* **141**, 4108–4120 (2016).
 56. Frimer, A. A. The Reaction of Singlet Oxygen with Olefins: The Question of Mechanism. *Chem. Rev.* **79**, 359–387 (1979).
 57. Di Mascio, P. *et al.* Singlet Molecular Oxygen Reactions with Nucleic Acids, Lipids, and Proteins. *Chem. Rev.* **119**, 2043–2086 (2019).
 58. Oestreich, M. Organic Reactions. Volume 75 (Diamond Volume). Edited by Scott E. Denmark. *Angew. Chemie Int. Ed.* **51**, 4270–4270 (2012).

Publicaciones



Cite this: DOI: 10.1039/c8cc08289h

Received 16th October 2018,
Accepted 13th November 2018

DOI: 10.1039/c8cc08289h

rsc.li/chemcomm

Tracking mitochondrial $^1\text{O}_2$ -ROS production through a differential mitochondria-nucleoli fluorescent probe†

Ricardo Flores-Cruz and Arturo Jiménez-Sánchez *

The dual-emissive fluorescent probe described here enabled dynamic tracking of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)-ROS species production and localization dynamics between the mitochondria and nucleoli in the presence of agents perturbing the mitochondrial membrane potential and under a photodynamic (PDT) system. Local structural information during the probe- $^1\text{O}_2$ interaction was followed by spectrally resolved confocal microscopy.

Molecular-level information obtained from synthetic probes with optimized photophysical characteristics represents a valuable method for monitoring subcellular activity.¹ The probes should possess controlled optical properties in a specific environment, such that cross-talk and interference problems can be avoided.² Such a tool holds great relevance in reactive oxygen species (ROS) monitoring, as each ROS has a unique function and chemical structure and different susceptibilities to the chemical environment,^{2–4} their detection, however, generates similar output responses.³ ROS production is a critical parameter in healthy and diseased states, but its monitoring remains challenging given the reactivity, low specificity for naturally occurring substrates, and transient nature of ROS.⁵ Traditional ROS probes include genetically encoded proteins and synthetic fluorophores. One of the main disadvantages of the protein counterparts is the need for transfection.⁶ Synthetic probes, on their part, have shown intrinsic problems such as low photostability and selectivity.⁷ Dihydrorhodamine (DHR) derivatives are a common choice, but their neutral charge distribution leads to a non-preferential mitochondrial localization even before oxidation.⁸ Delivery vectors for mitochondrial import and sensing, such as the triphenylphosphonium (TPP⁺) group, are often a good alternative, but they have no compatibility with fluorophores having $\text{pK}_a < 8.0$, as the resultant product becomes neutral under functional mitochondrial conditions (pH 8.0).⁹

In the present work, we describe the rational design and implementation of a new fluorescent probe, termed **RC334** (Fig. 1A), that enables the monitoring of subtle mitochondrial singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), which is photodynamically (PDT) generated within mitochondria. Its variations are also monitored through differential organelle (mitochondria-nucleoli) distribution after redox inputs, exhibiting no interference from local pH variations, membrane potential, H_2O_2 , and OH and superoxide radicals, which are highly relevant interferents when probing these

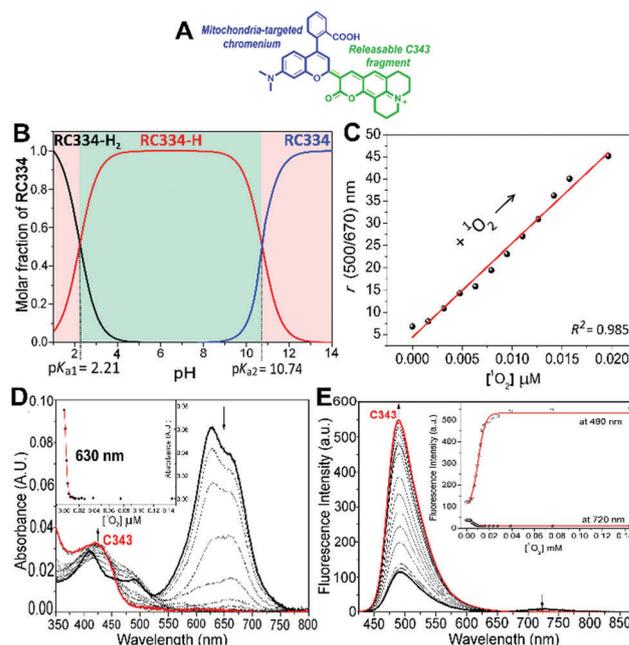


Fig. 1 (A) Structure of the mitochondria-nucleoli **RC334** probe. (B) Concentration distribution curves of **RC334** (5 mM) in 50 mM NaCl at 25 °C. The molar fractions are plotted using potentiometric constants. **RC334**-H₂ (dicationic), **RC334**-H (monocationic), **RC334** (neutral-closed form). (C) Ratiometric calibration plot for fluorescence intensity ratio $r = 500/670$ nm upon $^1\text{O}_2$ addition. (D) and (E) UV-Vis and fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 430$ nm) spectra of 2 μM **RC334** at variable $^1\text{O}_2$ concentration. Insets show absorbance vs. $[\text{}^1\text{O}_2]$ μM at selected wavelengths.

Instituto de Química – Universidad Nacional Autónoma de México,
Ciudad Universitaria, Circuito Exterior s/n, De. Coyoacán 04510,
Ciudad de México, Mexico. E-mail: arturo.jimenez@iquimica.unam.mx

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8cc08289h

organelles. Subcellular **RC334** fluorescence distribution was found to be dependent on the local variations of $^1\text{O}_2$. Once oxidized, a coumarin moiety is formed and released into the cell, giving rise to a corresponding nucleoli colocalization. Importantly, the functional response scheme of **RC334** enables subtle $^1\text{O}_2$ monitoring under continuous variations of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), a characteristic that has not been explored with a dual-organelle localizer. Through exhaustive fluorescence imaging, using a differential localization dynamic, we propose a new quantitative scheme to monitor local $^1\text{O}_2$ in live cells.

Single-channel imaging contrast does not allow differentiation of interferent responses, such as pan-assay interference compounds (PAINS) or colloidal aggregators.¹⁰ Dual-color imaging contrast and differential subcellular localization brings the possibility to distinguish those interference signals, giving more structural information, an important feature when it comes to separate subtle levels of chemical parameters involved in the molecular environment, *i.e.* local pH and ROS levels on mitochondria, but the development of those molecular probes is uncommon and not a single differential organelle localizer known to date enables the monitoring of subtle ROS variations in biological specimens. The dual-fluorescent probe was synthesized according to structure-property relationship principles; the experimental procedure and full chemical characterization are provided in the ESI† file. The electronic structure of **RC334** facilitates a dual-emission band pattern in the visible (Vis) and near-infrared (NIR) regions of absorption and emission spectra. The Vis-NIR emission is activated by the spirolactone *vs.* open-acid esterification equilibrium, as described previously for similar chromenium dyes.¹¹ **RC334** exhibits completely different electronic properties between open and closed forms. A three-model scheme analysis of electron density difference,¹² natural transition orbital (NTO) hole-electron distributions¹² and charge transfer extent index upon photoexcitation¹² for both open-acid and spirolactone closed forms reveals that the closed form, which favours a planar structure in its conjugated longitudinal axis, has a slight charge transfer character, and is thus dependent on local mitochondrial micropolarity variations.² Interestingly, the open form loses the charge transfer properties by favouring a propeller-like geometry, disrupting the electronic communication in this axis, see Fig. S1 (ESI†). Charge-transfer (CT) indexes upon photoexcitation and NTO eigenvalues are summarized in the ESI† file, Table S1. Further inspection of NTO through the HONTO-LUNTO pair corroborates a slight quadrupolar charge transfer redistribution for the closed form, in good agreement with the charge-transfer index scheme. Further analysis of **RC334** indicates a strong acid-base influence. The acid-base features were then studied in detail. Proton dissociation constants were estimated by potentiometric technique, and the obtained $\text{p}K_a$ values were used to calculate the pH distribution of molar fractions for individual diprotic-dicationic, monoprotic-monocationic and neutral-closed forms of **RC334**, Fig. 1B. The first $\text{p}K_a$ in the dimethylamino group is 2.21 ± 0.08 , while the second one responsible for the spirolactone cyclization is 10.74 ± 0.09 . The $\text{p}K_a$ assignment of individual groups was corroborated by spectrophotometric means, Fig. S2 (ESI†). Thus, the acid form gives rise to the NIR band, while the closed form to the band at 500 nm.

Fortunately, potentiometric data indicated that the species distribution of molar fractions allow 100% of the individual open-acid form at around pH 5.5 to 8.5.

The dual-fluorescent molecular response of **RC334** is not only a combination of chromenium and coumarin 334 modules but also a consequence of the electronic communication from the whole construct in the spirolactone *vs.* the propeller-like acid forms. Besides this, the oxidation capabilities of chromenium-like moieties enabled us to use the probe for intracellular mitochondrial measurements of ROS species. ROS monitoring includes superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl) and hypochlorite ion (ClO^-), hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) and ozone (O_3). The effect of those ROS on the photophysical properties of **RC334** and the corresponding competition experiments are presented in Fig. S3 (ESI†). Notably, $^1\text{O}_2$ ion was found to be strongly effective in selectively oxidizing **RC334** (see Fig. 1C–E). On the other hand, the specific subcellular localization of **RC334** originates from its rhodamine-like identity, which combines hydrophobicity with positively charged centroids. As can be seen from Fig. 2A, **RC334** specifically localizes in the mitochondria of live cells. Mitochondrial colocalization with MitoTracker Deep Red[®] (Fig. 2B) reveals strong preference of **RC334** for this organelle in the 5–10 μM concentration range, with no significant cytotoxicity (see ESI† file). Not surprisingly, slight endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus localization at concentrations above 20 μM were observed, Fig. S4 and S5 in the ESI† file. However, this non-specific membrane distribution at high concentrations is common for commercial probes such as MitoTrackers[®].

The *in vivo* studies under photosensitization with 5-amino-levalulinic acid (ALA), a common photosensitizer of intramitochondrial $^1\text{O}_2$ production,¹³ is presented in Fig. 3. Although not generated by oxidative phosphorylation, $^1\text{O}_2$ is one of the main ROS in biological systems, produced by the irradiation of either exogenous or naturally occurring photosensitizers.¹⁴ Previously reported probes for $^1\text{O}_2$ are poorly water soluble, single-channel detectors, deactivated by $\Delta\psi_m$ and only used with a large excess of extracellular $^1\text{O}_2$ treatment. **RC334** probe was found to overcome these hurdles. In principle, a good amphiphilic balance was observed ($\log P = -0.51$). While the expected interaction

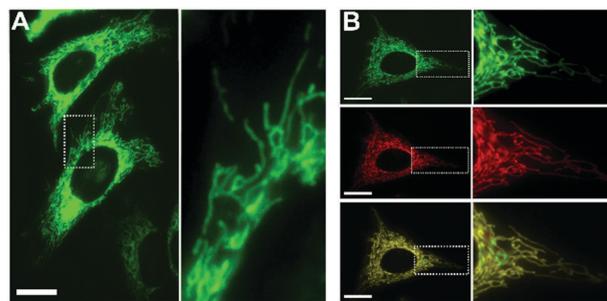


Fig. 2 (A) Intra-cellular localization of **RC334** in live HeLa cells under the GPF confocal channel setup ($\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm). (B) Correlation of **RC334** localization with the Mitotracker Deep Red[®] dye ($\lambda_{\text{exc}} = 596$ nm), and localization overlap indicating that **RC334** is mitochondria-specific. Pearson's coefficient for **RC334** = 0.95. Scale bars represent 20 μm .

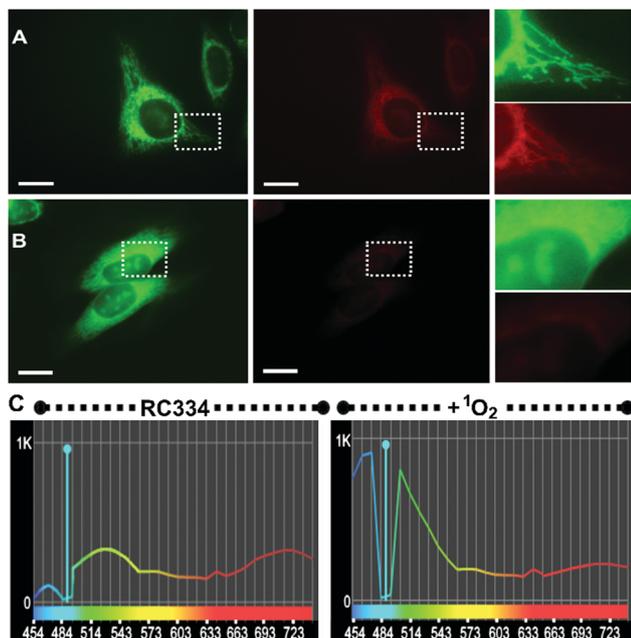


Fig. 3 Differential mitochondria-nucleoli localization of **RC334** in the green and red confocal channels for HeLa cells. (A) Mitochondrial fluorescence distribution of **RC334** before oxidation with PDT system. (B) Simultaneous mitochondrial fluorescence loss with nucleoli redistribution of **RC334** upon oxidation. Scale bars represent 20 μm . (C) Real-time local fluorescence spectra of **RC334** corresponding to modules A and B in the microscope. The excitation wavelengths are 488 nm and 596 nm for the green and red images.

with hydroxyl radical was observed according to typical double-bond dye-radical chain reactions,¹⁵ this interaction was not observed under *in vivo* conditions, detecting only fluorescence increments about 500 nm, indicating coumarin emission activation.

Intracellular mitochondrial $^1\text{O}_2$ was monitored using **RC334** under conditions promoting $^1\text{O}_2$ along with mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) polarization (Fig. 3 and 4). The low-dose mitochondrial photodynamic treatment in live cells was done by 100 μM ALA incubation for 8 hours and exposure to laser irradiation (0.1 to 0.3 J cm^{-2}) prior to imaging experiments. $\Delta\psi_m$ was considered during **RC334** monitoring mainly for two reasons. The *in situ* effect of $\Delta\psi_m$ on $^1\text{O}_2$ is crucial for proper ROS monitoring but is usually forgotten, although it is widely known that mitochondria produce more ROS at high membrane potentials.¹⁶ Also, the equilibration features of Nernstian fluorescent probes need to be considered during ROS calibration and imaging analysis to avoid interference problems, cross-talk and signal artefacts. However, one of the largest problems toward this goal is the loss of structural information as well as local spectral resolution during measurements. In this sense, spectrally resolved confocal microscopy gives analytical bioimaging unique possibilities for *in situ* calibration, accessing continuous structural information of the probe response. Using a confocal array coupled with a spectral detector unit, accurate spectral unmixing enabled the probe **RC334** to be spectrally resolved in real time with 32-channel images of 512×512 pixels. Because dye oxidation delivers a coumarin adduct, we were able to observe a differential organelle localization where coumarin leaves the

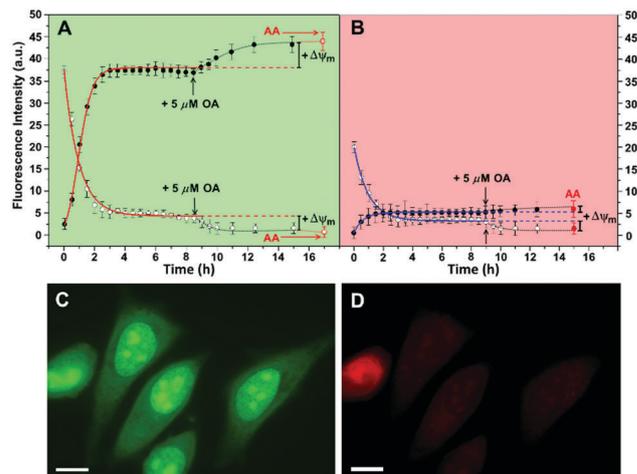


Fig. 4 Oligomycin (OA) vs. antimycin (AA) effect on the $\Delta\psi_m$ and nucleoli localization of **RC334** in HeLa cells. (A) and (B) are **RC334** profiles of the whole mitochondrial and nucleoli networks in the green ($\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm) and red ($\lambda_{\text{exc}} = 596$ nm) channels, respectively. Increasing profiles represent nucleolar localization over time, while decreasing profiles are mitochondrial; initial readings at time 0 h are controls before PDT. (C) and (D) are confocal images for the end-points (AA) of modules (A) and (B). Scale bars are 20 μm .

mitochondria to achieve a clean nucleolar distribution (Fig. 3), finding a Pearson's coefficient (PC) of **RC334** = 0.87 when colocalizing with Hoechst dye, while the mitochondrial delocalization was compared with MitoTracker Deep Red[®] as well, finding a PC = 0.019 (Fig. S6, ESI[†]). Interestingly, when this phenomenon was followed with spectral resolution using 488 nm excitation, we observed that the blue-shifted emission band increased significantly, with a concomitant decrease in the red-shifted band, thus providing real-time local structural information, Fig. 3C. This observation is consistent with the fluorescence titration experiments (Fig. 1), pointing out that the coumarin channel dominates the fluorescence response after $^1\text{O}_2$ production to release this fluorophore into the nucleoli. In fact, structural analysis of **RC334**- $^1\text{O}_2$ interaction by high-resolution mass spectrometry and NMR revealed the ion identity as coumarin 343 (the carboxylic acid analogue of coumarin 334), Fig. S7 (ESI[†]). This type of coumarin nucleolar localization can be explained by DNA groove interactions, as previously described.¹⁷ To visualize the localization dynamics of **RC334**, the time-dependent effect during the course of oxidation was analysed. As mentioned above, 100 μM ALA treatment activates the oxidation mechanism of **RC334**, leading to a strong nucleolar fluorescence increment in the green channel, while mitochondrial fluorescence disappears. Similar effects were observed in the Texas Red channel, but to a lesser extent, probably because of the lower coumarin fluorescence intensity in this region, Fig. 4. However, this red emission can also be a consequence of protoporphyrin IX (PpIX) accumulation in mitochondria caused by ALA treatment, since PpIX shows a low fluorescent signal around 630 nm.¹³ To further corroborate the interference-free output of **RC334** under ROS production, the effect of the mitochondrial membrane potential variations was analysed using oligomycin A (OA) and antimycin A (AA).

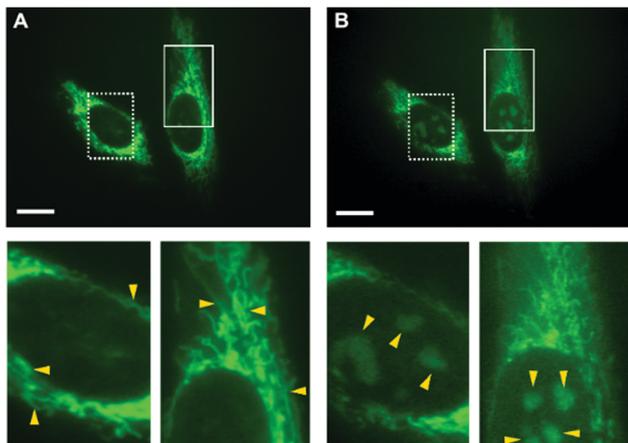


Fig. 5 Effect of one-hour ALA incubation and 0.1 J cm^{-2} irradiation, detected in the green ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$) channel for HeLa cells. (A) Before and (B) after treatment. The image was manually focused, and excitation light was fully shielded between recordings to prevent artefacts and photobleaching. 8 hour incubation experiments are shown in Fig. S10 (ESI[†]). Scale bars, $20 \mu\text{m}$.

While oligomycin increases $\Delta\psi_m$ by inhibition of ATP synthase, leading to a decrease in the reduced respiratory chain intermediates, AA inhibits complex III of the respiratory chain, inducing the accumulation of reduced intermediates and thus blocking the chain and increasing the leakage of electrons. Then, OA increases ROS production with $\Delta\psi_m$ hyperpolarization (more negative potential), while AA increases ROS with a $\Delta\psi_m$ depolarization (see Fig. S8 for $\Delta\psi_m$ polarization controls, ESI[†]). After ALA incubation and laser irradiation, treating live cells with $5 \mu\text{M}$ OA and AA at 8 and 15 h, respectively, resulted in a higher ROS production, as evidenced by the differential localization dynamics of RC334, Fig. 4. In the green channel, the nucleolar fluorescence profile after ALA treatment (time 0 to 8 hours) increased by 74% and was further augmented by 16% with OA or 17% with AA addition, while the mitochondrial fluorescence after ALA treatment (time 0 to 8 hours) decreased by 77% and further decreased by 10% with both OA and AA. Single-cell images show a strong cytosol–nucleoli equilibration, Fig. 3 and 4. Thus, once formed by the PDT, $^1\text{O}_2$ is the main oxidant of all ROS generated species acting on RC334, and interestingly, the effect of $\Delta\psi_m$ at both hyper- or de-polarization directions is indicative of the non-interfering nature of the probe, a characteristic that has not been addressed before. Thus, the differential localization dynamic of RC334 allowed us to estimate the $^1\text{O}_2$ production in mitochondria by using the internal reference signal (λ -ratiometric) method. The ratiometric plot shown in Fig. 1B was calibrated at 500 nm and 670 nm, where the fluorescence spectra show a strong linear dynamic range ($r = 0$ to 50) and the green/red confocal images can be acquired. After 3 hours of incubation, the system reaches equilibrium as shown in Fig. 4A and B. Then, taking the red emission (670 nm) as internal reference, the $^1\text{O}_2$ production is practically constant, with a $^1\text{O}_2$ rate of $0.0025 \mu\text{M}$ ($2500 \pm 120 \text{ pM}$, $r = 38/3.5 = 10.9$) corresponding to the whole mitochondrial network (detailed protocol is described in Fig. S9, ESI[†] file). Finally, the time-course experiments of Fig. 4 were analysed by confocal imaging, indicating the loss of mitochondrial localization

after the oxidation stimuli, along with a clear equilibrium displacement between mitochondria–cytosol–nucleoli, Fig. 5.

RC334 is a versatile new strategy able to continuously monitor singlet oxygen PDT-ROS species through differential organelle dynamics. With the help of spectrally resolved confocal imaging, we demonstrated local probe oxidation and how this *in vivo* structural information can be used to separate the fluorescence profiles from interfering signals. Particularly, $^1\text{O}_2$ was monitored and quantified under mitochondrial membrane potential variations using the oligomycin and antimycin A inhibitors, and very subtle signal variations were easily detected during $^1\text{O}_2$ PDT production for the first time. In addition, the observed selectivity for $^1\text{O}_2$ over common ROS agents such as H_2O_2 , OH and $\text{O}_2^{\bullet-}$ radicals makes RC334 an interesting probe to separate ROS interferents. Given the high relevance of $^1\text{O}_2$ in the mitochondrial function and redox status, this dual-emissive probe is a new way to monitor ROS activity through different organelles. Combining this probe with fluorescent blinking buffers for super-resolution microscopy will provide a new avenue for understanding the communication of organelles under ROS production.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Notes and references

- M. Sauer, J. Hofkens and J. Enderlein, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Single-Molecules to Ensembles*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2011, p. 290.
- A. Jiménez-Sánchez, E. Lei and S. O. Kelley, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2018, **57**, 8891.
- L. Greene, R. Godin and G. Cosa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, **138**, 11327.
- Z. Yang, Y. He, J. H. Lee, N. Park, M. Suh, W. S. Chae, J. Cao, X. Peng, H. Jung, C. Kang and J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 9181.
- (a) A. R. Lippert, G. C. van de Bittner and C. J. Chang, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 793; (b) A. R. Lippert, T. Gschneidner and C. J. Chang, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 7510.
- V. V. Belousov, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, D. B. Staroverov, K. S. Shakhbazov, A. V. Tersikh and S. Lukyanov, *Nat. Methods*, 2006, **3**, 281.
- B. Dong, X. Song, X. Kong, C. Wang, Y. Tang, Y. Liu and W. Lin, *Adv. Mater.*, 2016, **28**, 8755.
- Y. Koide, Y. Urano, S. Kenmoku, H. Kojima and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 10324.
- See main text and ESI[†] of W. Chyan, D. Y. Zhang, S. J. Lippard and R. J. Radford, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014, **111**, 143.
- (a) J. Baell and M. A. Walters, *Nature*, 2014, **513**, 481; (b) K. Tedford, M. Steiner, S. Koshutin, K. Richter, L. Tech, Y. Eggers, I. Jansing, K. Schilling, A. E. Hauser, M. Korthals and K.-D. Fischer, *Nat. Commun.*, 2017, **8**, 1.
- (a) M. Fang, R. Adhikari, J. Bi, W. Mazi, N. Dorh, J. Wang, N. Conner, J. Ainsley, T. Christova, F.-T. Luo, A. Tiwari and H. Liu, *J. Mater. Chem. B*, 2017, **5**, 9579; (b) H. Chen, B. Dong, Y. Tang and W. Lin, *Acc. Chem. Res.*, 2017, **50**, 1410.
- (a) M. Savarese, C. A. Guido, E. Brémond, I. Ciofini and C. Adamo, *J. Phys. Chem. A*, 2017, **121**, 7543; (b) R. L. Martin, *J. Chem. Phys.*, 2003, **118**, 4775.
- A. Sparsa, *et al.*, *Oncol. Rep.*, 2013, **29**, 1196.
- X. Zhou, Y. Wang, J. Si, R. Zhou, L. Gan, C. Di, Y. Xie and H. Zhang, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 16925, DOI: 10.1038/srep16925.
- U. Krüger and R. Memming, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1974, **78**, 679.
- J. F. Turrens, *J. Physiol.*, 2003, **15**, 335.
- (a) M. Mehiri, B. Jing, D. Ringhoff, V. Janout, L. Cassimeris and S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 1510; (b) T. Umashankar, M. Govindappa, L. R. Yarappa, R. S. Padmalatha and R. Channabasava, *Metabolomics*, 2015, **5**, 158; (c) A. K. Saini, V. Sharma, P. Mathur and M. M. Shaikh, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 34807.



Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*,
2019, 21, 15779

Unravelling the modus-operandi of chromenylium-cyanine fluorescent probes: a case study†

Ricardo Flores-Cruz,^a Rafael López-Arteaga,^{id}^a Lizbeth Ramírez-Vidal,^b
Fernando López-Casillas^b and Arturo Jiménez-Sánchez^{id}^{*a}

Small-molecule fluorescent probes having optimized optical properties, such as high photostability and brightness, local microenvironment sensitivity and specific subcellular localizations, are increasingly available. Although the basis for designing efficient fluorophores for bioimaging applications is well established, implementing an improvement in a given photophysical characteristic always tends to compromise another optical property. This problem has enormous consequences for *in vivo* imaging, where ensuring a specific localization and precise control of the probe response is challenging. Herein we discuss a fluorescent probe, **CC334**, as a case study of the chromenylium-cyanine family that commonly exhibits highly complex photophysical schemes and highly interfered bioanalytical responses. By an exhaustive and concise analysis of the **CC334** optical responses including detailed spectroscopic calibrations, steady-state microenvironment effects, ultrafast photophysics analysis and computational studies, we elucidate a new strategy to apply the probe in the singlet oxygen reactive oxygen species (¹O₂-ROS) monitoring using *in vitro* and *in vivo* models. The probe provides a new avenue for designing fluorescent probes to understand the dynamic behavior of subcellular environments.

Received 10th June 2019,
Accepted 27th June 2019

DOI: 10.1039/c9cp03256h

rsc.li/pccp

Introduction

Chromenylium-cyanine (CC) probes are a well-studied family of fluorophores combining good photostability,¹ low cytotoxicity,² privileged structural diversity,^{1–3} and low to moderate fluorescence quantum yields (QY_f),⁴ expanding their applications from materials chemistry to fluorescence bioimaging.^{1–5} Such properties, in part, are a consequence of their coumarin- and/or rhodamine-like identity, an intrinsic feature retained in their structure, exhibiting similar properties but lower QY_f. This brings the possibility to use these molecules as *fluorogens*, molecules able to activate their fluorescence in response to a given stimulus.⁶ In fact, sacrificing QY_f to some extent enables different activation/deactivation pathways of the probe to be exploited in different stimuli-responsive scenarios. CC probes then comprise one of the most important examples of how existing fluorophores can be structurally modified to activate different response channels. However, the optical properties and the corresponding analytical responses of such ‘recycled probes’ are far from trivial. Activating a more versatile

photophysical process in a fluorescent probe has several advantages, as mentioned, but the decrease in the QY_f and the signal-to-noise ratio are not the only disadvantages; in imaging microscopy more acquisition times are needed and unavoidable interference problems with the subcellular environment and misinterpretation of the output responses arise. For example, previously described CC probes are sensitive to acid–base,⁷ oxidative,⁸ local polarity,⁹ ionic species,¹⁰ temperature,¹¹ and reductant¹² stimuli, all of them however, present the same response scheme being extremely difficult to calibrate single-channel fluorescence profiles without no interference or cross-talk problems. Here we address the above-mentioned limitations using a CC probe having similar fluorescence responses upon exposure to different stimuli. Then, we describe a new strategy to analyse the multi-stimuli scenario of CC probes. The probe is derived from a chromenylium ion and coumarin 334, termed **CC334**. Finally, *in vivo* studies were implemented using Zebrafish models to draw a more robust conclusion.

Results and discussion

The chemical structures of **CC334** as well as some previously reported CC probes are presented in Fig. 1. To analyse their multistimuli-responsive profile, it is worth noticing that the

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., No. 04510, Mexico. E-mail: arturo.jimenez@iquimica.unam.mx

^b Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., No. 04510, Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9cp03256h

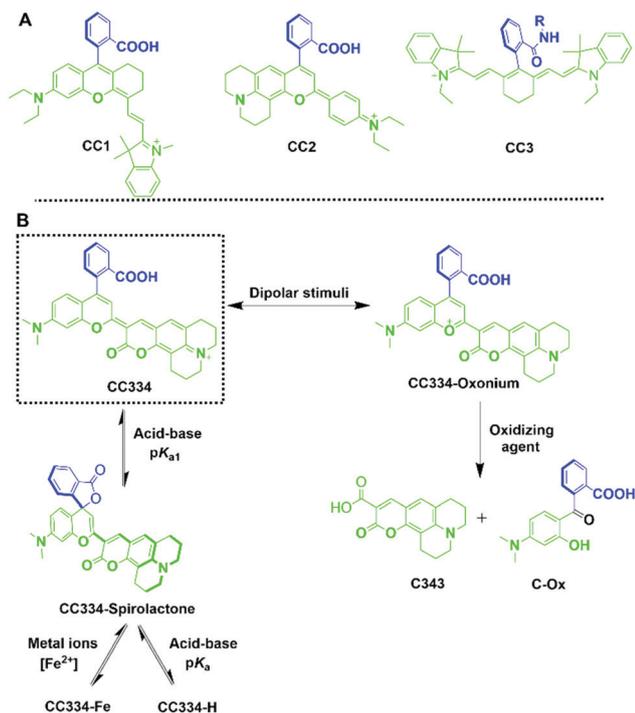


Fig. 1 Chemical structure of (A) three CC probes previously described^{1–5} and (B) probe **CC334** upon exposure to different stimuli, *i.e.* dipolar: equilibrating the quinoline vs. oxonium cations, acid–base: promoting the closed spirolactone form vs. open acid form, oxidative: to release coumarin **C343** and a C-oxidation by-product. Further acid (**CC334-H**) or metal ion (Fe^{2+} ion, **CC334-Fe**) stimuli are also possible (see below).

probes exist in an equilibrium between the open-acid and closed-spirolactone forms. Previously reported CC structures suggest the spectroscopic features to be a consequence of this acid–base equilibrium. Such a general conception comes from the fact that the electronic conjugation between these forms is substantially different, favoring the open form to exhibit a near infrared (NIR) emission and the closed form to exhibit a visible (Vis) fluorescence. While the Vis-NIR emission pattern of CC probes can be modulated with acid–base stimuli, this dual-emission behaviour can also be tuned with redox, polarity (in terms of dielectric constant) variations and some environmental cues, Fig. 1.¹³ The spectroscopic characterization of **CC334** is shown in Fig. 2. As can be seen, it is possible to calibrate the probe response to several stimuli which comprises an analytical problem of CC probes not described before. In panel A, although showing low fluorescence intensities, a clear dual-band pattern ($\lambda_{\text{em}1} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}2} = 725 \text{ nm}$) is observed in methanol with a fluorescence quantum yield of 0.06 in this solvent. Panel B shows a quantitative interaction scheme for polarity using a continuous variation of dioxane:water volume fractions (ϕ_{dioxane}), which is a suitable system to separate polarity from other solvent parameters.¹⁴ As solvent polarity increased, both fluorescence intensities (I_{fl}) increased as well and the corresponding maximum wavelengths for the red-shifted emission at 720 nm and the blue one at 520 nm exhibited a remarkable hypsochromic shift to 655 nm and

485 nm, respectively. Notably, the blue-component showed a stronger intensity increment while the red-component showed a stronger wavelength shift. The position of I_{fl} and solvent polarity were used to construct calibration curves (Fig. 2B, inset) showing that altering the polarity of the surroundings is the major contributor to the observed changes in the blue- and red-components.

Then, the acid–base properties of **CC334** were studied in detail to know which species exist at a determined pH for imaging experiments, Fig. 2C. Proton dissociation constants were estimated by potentiometry. The obtained pK_{a} values were used to calculate the pH distribution of molar fractions for individual open forms (diprotic–dicationic and monoprotic–monocationic) and closed form (neutral) of **CC334**, Fig. S1 (ESI[†]). The first protonation at the dimethyl(amino) group has a $\text{pK}_{\text{a}} = 2.21 \pm 0.08$, and the spirolactone cyclization reaches a $\text{pK}_{\text{a}} = 10.74 \pm 0.09$. The pK_{a} assignment is corroborated by spectro-photometry. Thus, the acid form activates the NIR band where **CC334** is totally conjugated and planar in geometry, while the closed spirolactone form (non-planar with the electron conjugation dominating over the coumarin moiety) contributes more to the VIS band at 500 nm. Importantly for imaging experiments, the potentiometric data indicated a 100% molar fraction of the individual open-acid form at pH 5.5 to 8.5.

Once the pH properties were analysed and the possible species existing in a mitochondrial environment (pH ~ 8.0) was determined, the oxidation interactions were studied since chromenylium ions are known to exhibit important reactivity for these analytes,^{1,8} Fig. 2D–F. A strong binding interaction at pH 7.4 with the Fe^{2+} metal ion was only observed. However, the same result observed for Fe^{2+} was found for Fe^{3+} ions, which can be attributed to the fast oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+} ions upon ligand binding.^{15,16} Then, the stability constant for Fe^{2+} ions determined at pH 7.4 showed a complex trend (Fig. 2D) probably because of simultaneous $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ oxidation and **CC334** ligand oxidation after one equivalent addition could be involved in this titration. The fitting of the titration results using the HypSpec program revealed the formation of a 1:1 complex with a logarithm of the observed stability constant K_{obs} of 5.01. This result highlights the ability of CC probes to interact with metal ions through oxygen functional groups.

Similarly, as shown in Fig. 2E and F, **CC334** also exhibits a strong fluorescence increment upon interaction with singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), while competition experiments with common oxidizing agents revealed no significant interaction, Fig. S2 (ESI[†]). These results indicate that **CC334** is a specific $^1\text{O}_2$ -ROS reporter providing the classical molecular probe scenario, *i.e.* oxidation of **CC334** to coumarin 343 (**C343**), a stronger green-fluorophore as confirmed by chemical characterization using high-resolution mass spectrometry and $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy (see Fig. S3, ESI[†]). Note that such oxidation interactions make the fluorescence profiles of the red-shifted band disappear as **CC334** is fragmented to form coumarin 343. Fig. 2F shows the corresponding λ -ratiometric calibration plot for the **CC334**– $^1\text{O}_2$ interaction. A good linear fit was obtained at a wavelength ratio r (490/720) nm, such a fluorescence intensity variation is a consequence of the strong blue emission band increment with a simultaneous red emission deactivation.

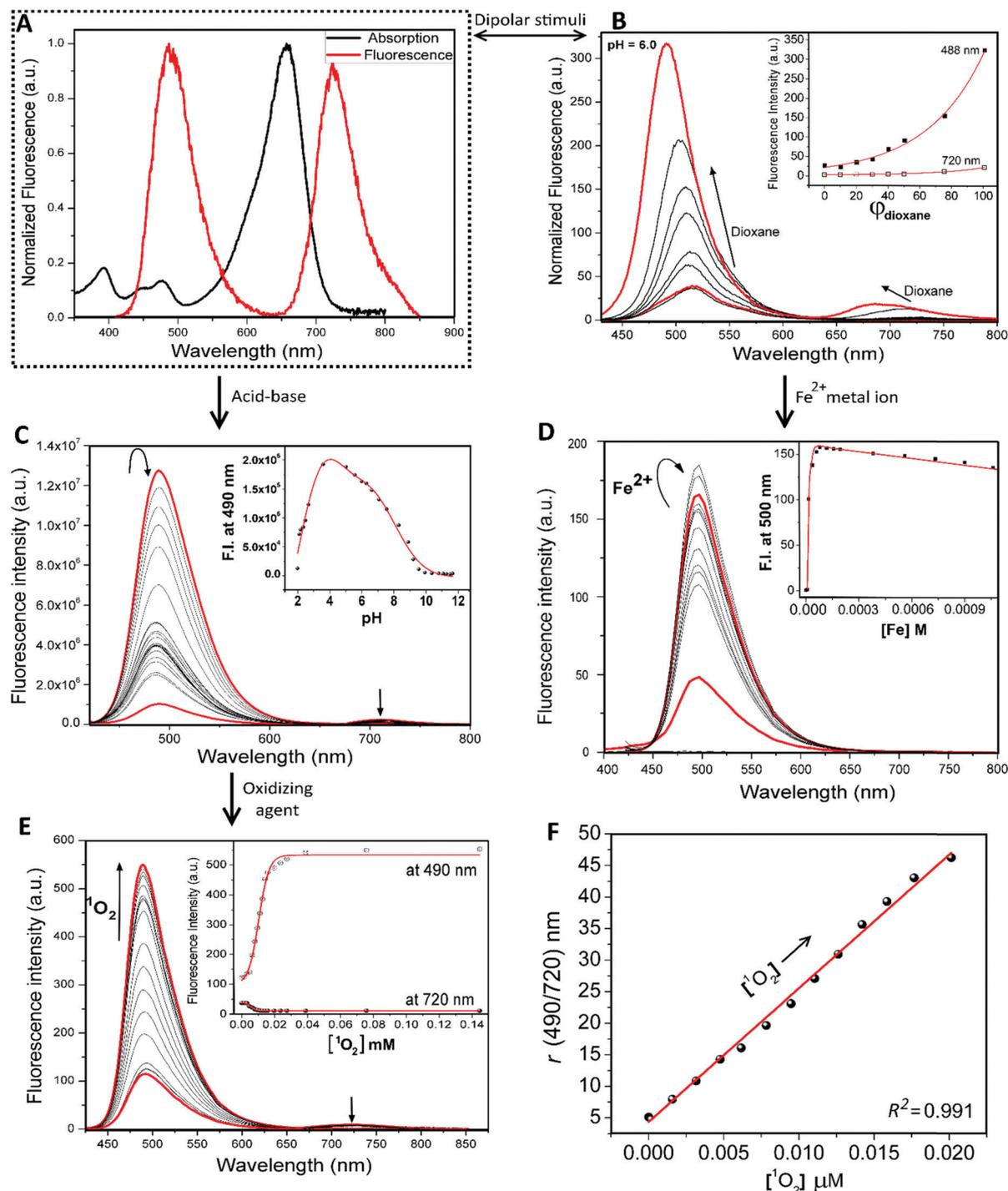


Fig. 2 Multistimuli-responsive scenario of **CC334** upon excitation at $\lambda_{\text{exc}} = 400$ nm. (A) UV-Vis and fluorescence spectra in methanol. (B) The dipolar stimuli titration using a dioxane:water system. (C) pH variation effect from 2.0 to 11.85. (D) Fe^{2+} ion titration profile. (E) Oxidation effect using singlet oxygen ($^1\text{O}_2$). (F) Corresponding λ -ratiometric calibration plot for the **CC334**- $^1\text{O}_2$ interaction. Insets: Titration profiles with their theoretical fittings: (B) fluorescence intensity at 488 and 720 nm; (C) the two- pK_a fitting; (D and E) the binding association constant (K_a) profiles: $(F_0 + F_{\text{inf}} * K_a[\text{CC334}]) / (1 + K_a[\text{CC334}])$, where F = fluorescence intensity.

On the other hand, *in vitro* experiments were carried out to study the subcellular permeability and localization of the probe. Fig. 3 shows a highly specific mitochondrial localization in a human cell line. The mitochondrial localization is a consequence of the lipophilic and positive charge balance of **CC334**. In fact,

octanol partitioning was measured, giving a $\log P$ value of -0.51 , reaching the lipophilic threshold for mitochondrial distribution.¹⁷ This was corroborated by colocalization with the commercial dye MitoTracker Deep Red[®], Fig. 3B. As discussed, **CC334** is an oxidizing-sensitive probe. Thus, mitochondrially generated ROS

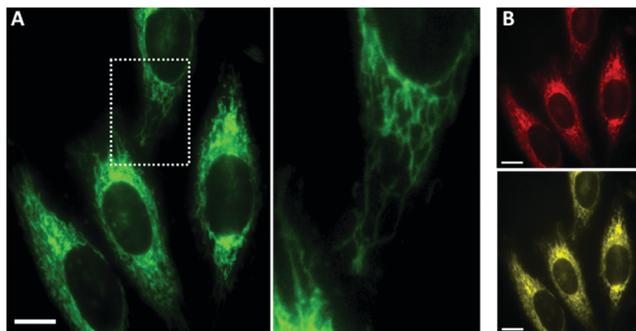


Fig. 3 (A) Intracellular localization of **CC334** in live HeLa cells. (B) Correlation of the **CC334** localization (green) with MitoTracker Deep Red[®] (red). The high level of overlap for the localization (yellow) of these two molecules indicates that **CC334** is mitochondria-specific. Scale bars represent 20 μm .

species can in principle be monitored using the fluorescence profile of **CC334**. Stimulating ROS formation in our *in vitro* studies by using low-dose singlet oxygen $^1\text{O}_2$ photodynamically generated under laser irradiation from 0.1 to 0.3 J cm^{-2} using 5-amino-levalulinic acid (ALA), which is a common photosensitizer of intramitochondrial $^1\text{O}_2$ production,^{18,19} resulted in a detectable fluorescence signal redistribution from mitochondria to cytosol and then into the nucleoli when recording with the confocal-green channel ($\lambda_{\text{exc}} = 503 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$), Fig. 4. This type of coumarin distribution in the nuclei has been described to occur because of DNA groove interactions.^{20–22} Then, $^1\text{O}_2$ -**CC334** interaction was analysed in more detail by UV-Vis and fluorescence spectrophotometry. However, to demonstrate that no signal interference or false positives are observed during such re-localization dynamics from mitochondria to nucleoli, the typical co-localization controls by staining those organelles with commercial co-localizers (in this case MitoTrackers[®] for the mitochondrion and DAPI or Hoechst[®] for the nuclei) and then probing that **CC334** moves from one organelle to the other are not enough and more precise structural information is required. Then, the confocal microscopies that are spectrally resolved provide continuous local information of the probe fluorescence profiles upon exposure to a given stimulus. We used a confocal array upgraded with a spectral detector unit having a 32-channel photomultiplier tube assembly. Thus, using a $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, the mitochondria to nucleoli probe redistribution upon $^1\text{O}_2$ -**CC334** interaction was spectrally-resolved, observing an important increment in the vis-emission band while a slight decrease in the NIR-emission band, Fig. S4 (ESI[†]), which is in full agreement with the $^1\text{O}_2$ -**CC334** fluorescence profile discussed in Fig. 2E.

The observed *in vitro* fluorescence response of **CC334** and the unequivocal data interpretation can evidently be extremely difficult. The problem is that the photophysical properties of **CC** probes (including **CC334**) can be modulated by several inputs. One of the main disadvantages of **CC** probes is that they can be used as all, pH, metal ion, ROS, local polarity, local microviscosity sensors by using the same fluorescence response channel. Their Vis-NIR emission properties can originate from the combination of different activation pathways, *i.e.* acid-base

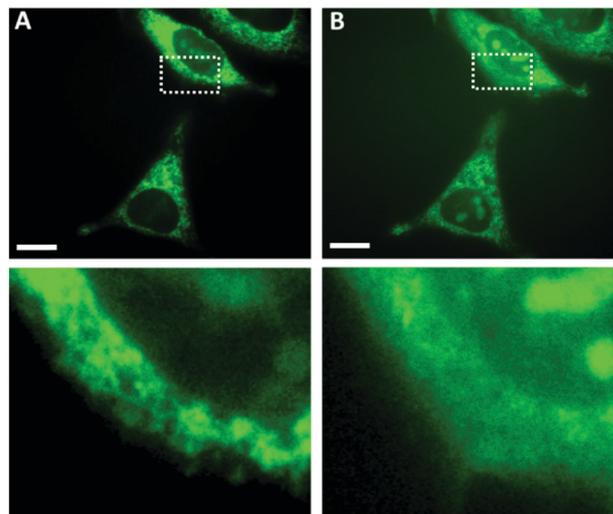


Fig. 4 Effect of low-dose singlet oxygen generation and 0.1 J cm^{-2} irradiation detected in the green ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$) channel for HeLa cells. (A) Before and (B) after treatment. The image was manually focused, and excitation light was fully shielded between recordings to prevent artefacts and photobleaching. Scale bars represent 20 μm .

equilibrium, intramolecular charge transfer, intramolecular proton transfer, photoacid generation, Kasha's rule breaking, chelation-enhanced fluorescence, site-specific-solvation, among others in such a way that either one or both Vis and NIR channels can be activated. To gain deep insight into the response scheme of **CC334** in highly heterogeneous media, the deactivation pathways present in the molecule were explored. Time-resolved fluorescence spectroscopy was carried out using the time correlated single-photon counting technique (TCSPC); solvents such as acetone and acetonitrile only favor the blue-shifted absorption band at 405 nm, although the emission spectra exhibit the characteristic dual-emission band pattern, $\lambda_1 = 488 \text{ nm}$ and $\lambda_2 = 710 \text{ nm}$, see Fig. S5 (ESI[†]). Non-monoexponential decay life-times were mostly found, Fig. 5. BG40 and LPF 655 filters were used to isolate the emission from the blue and red bands, respectively. In acetone, the blue emission presented two lifetimes of $\tau_1 = 3.7$ and a fast $\tau_2 < 1 \text{ ns}$ while the red band was short-lived and mono-exponential with 0.7 ns. One of the blue components can be attributed to the locally excited state while the red one is assigned to an ICT state. A similar scheme was found in acetonitrile, with lifetimes of $\tau_1 = 3.8$ and $\tau_2 < 1 \text{ ns}$ in the blue emission and $\tau = 0.5 \text{ ns}$ in the red emission. When testing a non-protic non-polar solvent such as cyclohexane the locally excited (LE) state was evidenced, finding a lifetime of $\tau = 2.9 \text{ ns}$ in the blue emission band. However, in solvents such as methanol and water a more complex behaviour of **CC334** arises.

In methanol, the absorption spectrum exhibits a strong red-shifted band and a dual-emission band pattern as well. Being polar protic solvents, comparison with the polar non-protic features of acetone and acetonitrile the first hypothesis is that the red-shifted band comes from a proton transfer excited state. Thus, lifetimes of 3.8 and 0.5 ns were found for the blue component in methanol, while the red emission presented a

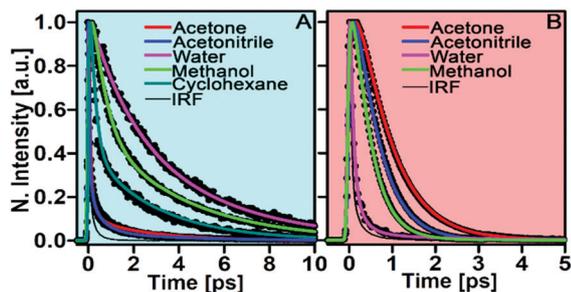


Fig. 5 Nanosecond fluorescence decay curves of **CC334** at the blue emission band (A); and at the red emission band (B) in different solvents, IRF: instrument response function.

0.3 ns lifetime, which in principle involves the closed-spirolactone and the open-acid forms, respectively. When changing from methanol to water the red band decreased, and the lifetimes were 4.3 and 0.9 ns for the blue emission and 2.9 and <0.1 ns for the red emission. Table S1 and Fig. S5 (ESI[†]) summarize the TCSPC results.

As noticed, the locally excited, charge transfer and proton transfer states can be activated by simple medium effects. However, those states define how much interference a CC probe will present *vs.* one specific analyte. Then, ultrafast time dynamics studies were implemented to study the excited state population of **CC334**, and femtosecond fluorescence up-conversion experiments were carried out in acetone and methanol. In acetone the probe only shows a blue absorption band at 438 nm and a dual emission band at 488 and 710 nm (Fig. S6A, ESI[†]), showing high Stokes shifts that are typical for photoinduced ICT states.²³ The formation of the ICT state is further supported since negligible absorption at longer wavelengths (>600 nm) is observed, and as can be seen in the excitation spectra (Fig. S6B, ESI[†]) the fluorescence of both the blue and red bands comes from the absorption band at 438 nm. As mentioned before, the dual-emission of **CC334** is a powerful tool in dual-channel confocal microscopies. Two representative results of the ultrafast photophysics for such emission patterns are presented in Fig. 6. There is a clear decay of 8 ps in the 490 nm transient and an accumulation with the same time constant is found at 720 nm, indicating that the locally excited state forms the ICT state in a kinetic scheme $A \rightarrow B$ with a rate constant of $1.25 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$.

As mentioned, the molecular geometry in the excited state is crucial in the photophysical scheme of CC fluorophores and thus fundamental for the photophysical scheme to be properly interpreted. Then, to gain more insight into the molecular geometry dynamics at the excited state by means of the transition moment direction changes, we determined the fluorescence anisotropy $r(t)$ of **CC334**. The inset of Fig. 6A shows the anisotropy decays for the two detected states (bands). The blue band anisotropy presents an initial value of $r = 0.3$ and is lost in $40.5 \pm 0.3 \text{ ps}$ (Fig. S7, ESI[†]), which is typical for fluorescent probes that only have one emissive state. This indicates that the angle between the excited and the emissive transition dipole moments is around 24° , suggesting that the pumped state (locally excited) is the same as the one detected at 490 nm.

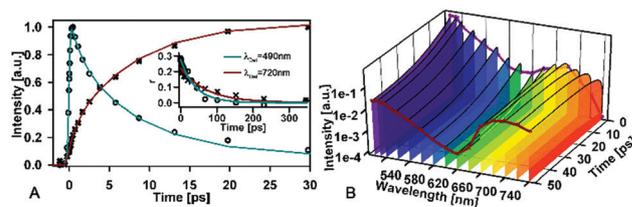


Fig. 6 (A) Normalized fluorescence up-conversion transients detected at 490 nm (blue) and 720 nm (red) for **CC334** in acetone; the inset shows the corresponding anisotropy decays. (B) Obtained ultrafast Time-Resolved Emission Spectra (TRES) in acetone.

The red band, however, presents an $r = 0.2$, which means that the angle between the excited and the ICT transition dipole moments is 35° . Overall this indicates the formation of a different molecular species in the excited state, probably, due to a conjugation and/or planarization of the whole molecule, which is further supported by a higher rotational diffusion constant in the ICT state. The ultrafast temporal evolution of the LE and the ICT states of the molecule is seen in the semi-logarithmic Time-Resolved Emission Spectrum (TRES), Fig. 6B.

In the blue region of the TRES, the LE state quickly decays (in 8 ps) to a relaxed state that lives 2.92 ns (obtained from the TCSPC experiments), while the red band accumulates also in 8 ps and reaches equilibrium between the two species; from the TCSPC results we obtained that the lifetime of this state is 0.69 ns. At 50 ps the temporal spectrum totally resembles the static emission spectrum (Fig. S6A, ESI[†]) indicating that the LE state relaxation is reached and ICT state is formed.

As mentioned before, the absorption spectrum of the molecule in methanol shows a maximum at 650 nm and some minor features at shorter wavelengths that correspond to higher singlet states (S_n) (Fig. S8A, ESI[†]). The emission spectrum presents a dual-band pattern when excited at these higher states, similar to the spectrum in acetone. Both bands come from different states as can be seen from the excitation spectra (Fig. S8B, ESI[†]), the red band corresponds to the S_1 state while the blue band corresponds to the emission from higher singlet excited states or to the coumarin moiety coming from the molecular population that can be found in the spiro-lactone form. These signatures are indicative that the kinetics of the excited state must be different. The ultrafast temporal behaviour (Fig. 7) indicates that S_n relaxes to S_1 in less than 500 fs, which is a typical time constant for an internal conversion process. This process is further confirmed since the red band is formed at the same time scale. The population of the S_n state that does not convert to the S_1 state reaches equilibrium as long as the pumped state lives (4.08 ns). The anisotropy value near $t = 0$ for the blue band ($r = 0.25$) indicates that the angle between the dipole moment of the pumped and the detected state is about 31° and the loss of the anisotropy occurs in $76.9 \pm 0.4 \text{ ps}$ (Fig. S9A, ESI[†]). The rotational diffusion presents a similar time constant to the photoinduced ICT state detected in acetone, which again suggests the extended conjugation of the **CC334** probe. On the other hand, the anisotropy of the S_1 state (Fig. S9B, ESI[†]) presents an initial value of -0.03 , indicating that the angle between the dipole moments of

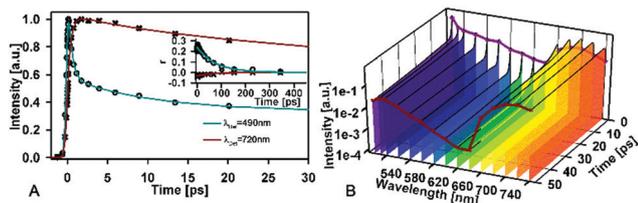


Fig. 7 (A) Normalized fluorescence up-conversion transients detected at 490 nm (blue) and 720 nm (red) for **CC334** in methanol. Inset: The corresponding anisotropy decays. (B) Obtained ultrafast Time-Resolved Emission Spectra (TRES) of **CC334** in methanol, obtained from the fluorescence up-conversion transient fits.

the higher singlet state and the S_1 states is around 58° . This strong variation in the angle indicates that the nature of the pumped state is completely different from the detected state, confirming that the initial state is a higher singlet excited state. Since this value of the anisotropy is very low, it remains difficult to extract the rotational diffusion constant from the experimental data. The TRES of the **CC334** probe in methanol at early times is presented in Fig. 7B. The molecule reaches the equilibrium between the S_n and the S_1 state in this time scale. The internal conversion process is nicely visualized as an ultrafast decay in the blue region and an accumulation in the red part of the spectrum. The long lifetimes of the bands were determined by the TCSPC technique described before: 4.08 ns and 0.32 ns for the blue and red bands, respectively. The different behaviour observed for the two bands in different environments is a clear indication of the highly complex and versatile molecular scenario that arises when using **CC334** as a fluorescent probe in cellular studies.

In order to schematize the photophysical dynamics of **CC334**, we optimized the molecular structures (open-acid and closed spirolactone forms, Fig. S10, ESI[†]) which were corroborated by a frequency analysis having no imaginary points at a PBE0/G-31+G(d,p)/IEF-PCM (water) level of theory. We analysed the electron density characteristics upon excitation²⁴ of the probe and the Natural Transition Orbital (NTO) analysis,²⁵ which provides a compact orbital representation of the electronic transition through a single configuration of a hole and electron interaction. Then, the NTO interactions show that the probe involves a different electronic distribution between open and closed forms when analysing the HONTO–LUNTO pair. The NTO eigenvalues (w) that represent the extent to which the electronic interaction can be written as a single excitation are 0.98 in both the open and closed forms. While the closed form has a non-planar conformation, which disrupts any electron communication in the conjugated molecular axis, the open form favours a highly planar conformation in this conjugated axis, enabling a pseudo-quadrupole moment with $\pi \rightarrow \pi^*$ charge transfer features, Fig. S10 (ESI[†]).

To study the effect of **CC334** probe incubation, *in vivo* imaging experiments in live *Danio rerio* (Zebrafish) embryos were performed. The localization studies were done in several stages of development. Fig. 8 shows 4 and 40 hpf (hours post fertilization) incubation with **CC334** before (panels A) and after (panels B) exposure to an oxidative stimulus induced by *in situ*

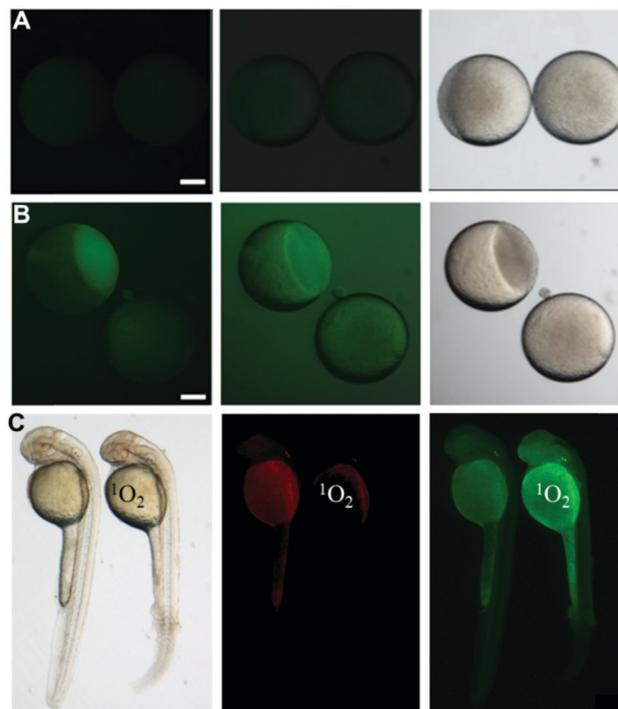


Fig. 8 Fluorescence microscopy of Zebrafish embryos at (A) sphere stage (4 hours post fertilization, hpf) incubated with **CC334** for 30 minutes followed by (B) *in situ* $^1\text{O}_2$ stimulation for 10 minutes. After washing excess **CC334** three times for 10 min, specimens were imaged. Left and middle panels show the green channel using 10 μM and 20 μM **CC334**, respectively. The right modules show the bright-field views. Panel C shows 40 hpf Zebrafish before (left) and after (right) $^1\text{O}_2$ stimulation in the bright, red and green channels. Scale bars represent 200 μm .

formed $^1\text{O}_2$ (preparation of $^1\text{O}_2$ and other ROS reagents is described in the ESI[†] file). These experiments revealed that **CC334** is a permeable fluorescent probe, which, due to the optical transparency of Zebrafish, makes it ideal for imaging single cell stages and subcellular dynamics *in vivo* and in real time.²⁶ Therefore, we tested whether the selective singlet oxygen **CC334** response could be observed in this model. Interestingly, the epidermis of the developing Zebrafish contains several specialized cell types that allow for the exchange of oxygen, ions and macromolecules, similar to mammalian bilayered epithelia.^{27,28}

Stimulation by *in situ* $^1\text{O}_2$ generation for 10 minutes resulted in detectable changes of the **CC334** fluorescence, Fig. 8 and 9. The green-channel was enhanced after exposure to the oxidative stimuli, particularly in the embryonic cells composing the sphere, where the latter exhibited a high fluorescence distribution, Fig. 8. Then, confocal imaging of 72 hpf embryos allowed us to visualize the mitochondrial-nuclear redistribution observed in tissue culture cells after exposure to $^1\text{O}_2$ oxidative stimuli. Fig. 9 shows clear mitochondria to nucleoli re-localization, where the former was observed using the green and red confocal channels and the nucleoli were observed using the green-channel, indicating that **CC334** could be used in living epithelium to track mitochondrial nuclear redistribution dynamics during exposure to oxidative stimuli with $^1\text{O}_2$.

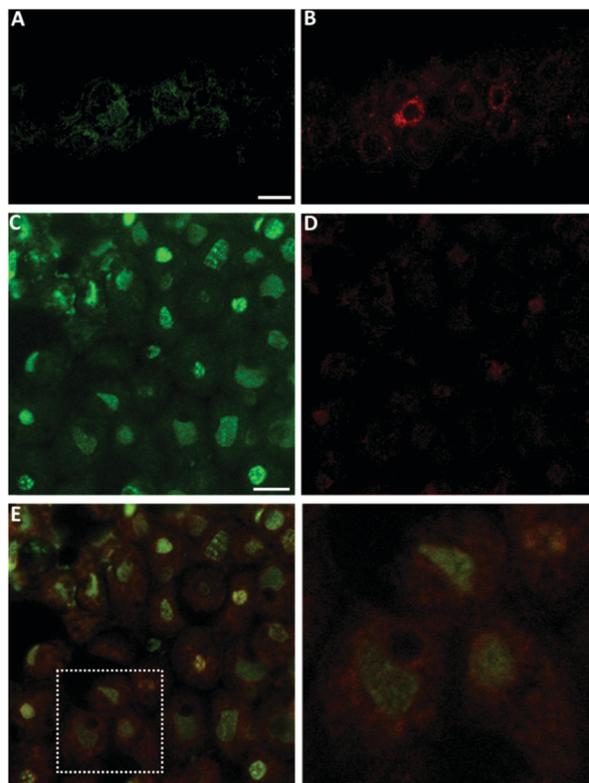


Fig. 9 Confocal imaging for the dorsal fin of the 40 hpf Zebrafish showing epithelial skin cells incubated with **CC334** before exposure to oxidative stimuli imaged in the green (A) and red (B) channels. $^1\text{O}_2$ stimulation for 10 minutes and washing excess **CC334** three times for 10 min, specimens were imaged in the green (C) and red (D) channels. (E) Merged image showing the nuclear distribution in the green channel. Scale bar represents 10 μm .

Conclusions

CC334 is a representative probe from the chromenylium-cyanine (CC) family of fluorophores. This versatile probe enables bio-analytical sensing and analysis of different species and local microenvironment parameters. Potential interfering factors present in living systems prevents CC probes to provide a selective recording of fluorescence. Here, singlet oxygen $^1\text{O}_2$, Fe^{2+} ions, pH and polarity/polarizability exert a strong influence on **CC334**, a common problem in the CC family. However, we demonstrate that understanding the **CC334** photophysics for all the possible excited-state dynamics (LE, ICT, and IPT) and how the change in molecular nature between the S_1 and S_n excited states governs its reactivity not only facilitates a correct and interference-free bioanalytical analysis but also allows the study of subcellular dynamics *in vivo*. With this study we also clarify that CC dual emission behaviour originates from a kinetic process involving the formation of the ICT state by the locally excited state. The dual emission is intrinsic to the CC probes regardless of whether the absorption bands have dual-absorption characteristics or not. This advantage is unique to CC probes and confers important properties in the analysis of living systems. Spectrally resolved confocal microscopy facilitated the interference-free analysis of $^1\text{O}_2$ providing continuous information of the probe emission

during measurements. Using CC probes in different media inducing redox, pH, polarity and specific ionic interactions for super-resolution microscopy and upconversion luminescence imaging will provide a new avenue for the interference-free analysis of subcellular chemistry.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts to declare.

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Jorge Peón Peralta for fruitful discussions on ultrafast dynamics during this work and for the laser spectroscopy facility. The authors acknowledge financial support from PAPIIT IA201318. We acknowledge assistance of Miguel Tapia Rodríguez (PhD. IIBO, UNAM) and Ruth Rincón Heredia (PhD. Unidad de Imagenología, IFC-UNAM) in imaging microscopy and Salvador Ramírez Jiménez (Biol. IIBO, UNAM) in tissue culture, Everardo Tapia Mendoza (MS), Beatriz Quiroz García (NMR) from the LURMN at IQ-UNAM Project: 0224747.

References

- 1 H. Chen, B. Dong, Y. Tang and W. Lin, *Acc. Chem. Res.*, 2017, **50**, 1410–1422.
- 2 L. Yuan, W. Lin, Y. Yang and H. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 1200–1211.
- 3 L. Wang, C. W. Barth, M. Sibrian-Vazquez, J. O. Escobedo, M. Lowry, J. Muschler, H. Li, S. L. Gibbs and R. M. Strongin, *ACS Omega*, 2017, **2**, 154–163.
- 4 X. Wu, M. Yu, B. Lin, H. Xing, J. Han and S. Han, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 798–803.
- 5 L. Zhou, Q. Wang, Y. Tan, M. J. Lang, H. Sun and X. Liu, *Chem. – Eur. J.*, 2017, **23**, 8736–8740.
- 6 H. Yang, C. Han, X. Zhu, Y. Liu, K. Y. Zhang, S. Liu, Q. Zhao, F. Li and W. Huang, *Adv. Funct. Mater.*, 2016, **26**, 1945–1953.
- 7 See ref. 4 and; Q. Wan, S. Chen, W. Shi, L. Li and H. Ma, *Angew. Chem.*, 2014, **126**, 11096–11100.
- 8 D.-Y. Zhou, Y. Li, W.-L. Jiang, Y. Tian, J. Fei and C.-Y. Li, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 11590–11593.
- 9 H. Xiao, C. Wu, P. Li, W. Gao, W. Zhang, W. Zhang, L. Tong and B. Tang, *Chem. Sci.*, 2017, **8**, 7025–7030.
- 10 See ref. 6 and; Y. Wei, D. Cheng, T. Ren, Y. Li, Z. Zeng and L. Yuan, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 1842–1849.
- 11 M. Homma, Y. Takei, A. Murata, T. Inoue and S. A. Takeoka, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 6194–6197.
- 12 Q. A. Best, A. E. Johnson, B. Prasai, A. Rouillere and R. L. McCarley, *ACS Chem. Biol.*, 2016, **11**, 231–240.
- 13 S. Kothavale, A. G. Jadhav and N. Sekar, *Dyes Pigm.*, 2017, **137**, 329.
- 14 B. R. Pujary, B. Barik and B. Behera, *Phys. Chem. Liq.*, 1998, **36**, 105–112.

- 15 V. A. Timoshnikova, V. I. Klimentieva, N. E. Polyakova and G. J. Kontoghiorghes, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2014, **289**, 14.
- 16 E. Farkas, E. A. Enyedy, L. Zekany and G. Deak, *J. Inorg. Biochem.*, 2001, **83**, 107–114.
- 17 L. F. Yousif, K. M. Stewart, K. L. Horton and S. O. Kelley, *ChemBioChem*, 2009, **10**, 2081–2088.
- 18 A. Sparsa, S. Bellaton, T. Naves, M.-O. Jauberteau, J.-M. Bonnetblanc, V. Sol, M. Verdier and M.-H. Ratinaud, *Oncol. Rep.*, 2013, **29**, 1196–1200.
- 19 X. Zhou, Y. Wang, J. Si, R. Zhou, L. Gan, C. Di, Y. Xie and H. Zhang, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 16925, DOI: 10.1038/srep16925.
- 20 M. Mehiri, B. Jing, D. Ringhoff, V. Janout, L. Cassimeris and S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 1510–1513.
- 21 T. Umashankar, M. Govindappa, L. Yarappa, R. S. Padmalatha and R. Channabasava, *Metabolomics*, 2015, **5**, 1000158.
- 22 A. K. Saini, V. Sharma, P. Mathur and M. M. Shaikh, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 34807.
- 23 R. López-Arteaga, A. B. Stephansen, C. G. Guarín and T. I. Sølling, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**, 9947–9955.
- 24 C. Adamo and D. Jacquemin, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 845–856.
- 25 R. L. Martin, *J. Chem. Phys.*, 2003, **118**, 4775–4777.
- 26 A. E. Webb and D. Kimelman, *Methods Mol. Biol.*, 2005, **289**, 137.
- 27 I. Jevtov, T. Samuelsson, G. Yao, A. Amsterdam and K. Ribbeck, *Sci. Rep.*, 2014, **4**, 6653, DOI: 10.1038/srep06653.
- 28 G. T. Eisenhoffer, G. Slattum, O. E. Ruiz, H. Otsuna, C. D. Bryan, J. Lopez, D. S. Wagner, J. L. Bonkowsky, C.-B. Chien, R. I. Dorsky and J. Rosenblatt, *J. Cell Sci.*, 2017, **130**, 269–277.