



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Orgánica

***Diseño y síntesis de ligandos fluorescentes específicos
para la detección de blancos proteicos***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
de Química Orgánica

Nicolás Arrupe

Directora de Tesis: Dra. Luciana Giordano

Consejero de Estudios: Dr. Fernando Durán

Lugar de trabajo: Centro de investigaciones en BioNanociencias (CIBION-CONICET)

Diseño y síntesis de ligandos fluorescentes específicos para la detección de blancos proteicos

Las técnicas basadas en fluorescencia constituyen una herramienta fundamental en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos. Son métodos robustos y económicos, que permiten evaluar en forma eficiente un gran número de compuestos siendo adecuados para llevar a cabo ensayos de Cribado de Alta Capacidad. Para el desarrollo de procedimientos convenientes de screening, se necesita un método simple donde se evalúe la unión del ligando a la proteína con alta sensibilidad. El desarrollo de este método comienza con el diseño y la síntesis de sondas fluorescentes que se conjugan a ligandos específicos de blancos proteicos.

Una de las aproximaciones para desarrollar sondas fluorescentes, involucra la incorporación de fluoróforos sensibles al entorno del tipo solvatocrómicos y rotores moleculares. Éstos exhiben comúnmente una fluorescencia muy débil en ambientes polares y próticos pero muestran una fuerte fluorescencia en ambientes hidrofóbicos. Por lo tanto, se espera que la unión del ligando en el sitio de unión a la proteína blanco acerque al fluoróforo al bolsillo hidrofóbico y cause un aumento en la emisión de fluorescencia. En contraste, en ausencia de la proteína blanco, la sonda permanecerá en un buffer acuoso y exhibirá una fluorescencia débil. Este enfoque es novedoso ya que no implica una reacción enzimática para que el cambio en la señal ocurra y por ende se puede aplicar a cualquier blanco proteico que tenga un sitio de unión.

En esta tesis se sintetizaron sondas fluorescentes a partir fluoróforos sensibles al entorno del tipo solvatocrómicos basados en 3-hidroxicromonas y rotores moleculares basados en BODIPYs. Para esto se sintetizaron los fluoróforos incluyendo un halogenuro de arilo en su estructura. Por otro lado, se obtuvieron ligandos específicos para los blancos proteicos a estudiar funcionalizados con alquinos terminales. De esta manera se generaron las sondas fluorescentes específicas usando la reacción de acoplamiento de Sonogashira.

En segundo lugar, se desarrolló un ensayo de unión ligando proteína que permitió calcular las constantes de unión de los sensores a las proteínas. A partir de esto, también se implementó un ensayo de desplazamiento que

permite calcular constantes de disociación de ligandos específicos de la proteína blanco.

Finalmente se realizaron diversos estudios computacionales que permitieron profundizar en la dinámica de la unión de las sondas a los distintos sistemas proteicos, entender la reactividad de los fluoróforos usados respecto a la reacción de Sonogashira, y como anexo, comprender el efecto electrónico que tienen los sustituyentes en distintas 3-hidroxicromonas.

Design and synthesis of fluorescent ligands specific for the detection of protein targets.

Fluorescence-based techniques are an important tool in the development of new drugs. They are robust and cost-effective methods for evaluating a large number of compounds and are suitable for High Throughput Screening (HTS) assays. In particular, fluorescence techniques, including anisotropy, Förster Resonance Energy Transfer (FRET), and fluorescence lifetime, are widely used in HTS assays. For the development of convenient screening procedures, a simple method for assessing the binding of the ligand to the proteins with high sensitivity is required. The development of this method begins with the design and synthesis of fluorescent probes that are conjugated to specific ligands of protein targets.

One approach to developing fluorescent probes involves the incorporation of environmentally sensitive fluorophores, such as solvatochromic dyes, and molecular rotors. These compounds commonly exhibit weak fluorescence in polar and protic environments but show strong fluorescence in hydrophobic environments. Therefore, ligand binding at the target protein binding site is expected to bring the fluorophore closer to the hydrophobic pocket, causing an increase in fluorescence emission. In contrast, without the target protein, the probe will remain in an aqueous buffer and exhibit weak fluorescence. This approach is novel it can be used with any protein target that has a binding site and does not require an enzymatic reaction for the signal to change.

In this thesis, fluorescent probes were synthesized using environmentally sensitive fluorophores based on 3-hydroxychromones and molecular rotors based on BODIPYs. To achieve this, fluorophores with an aryl halogenide were synthesized. Additionally, specific ligands for target proteins functionalized with terminal alkynes were obtained. This way, specific fluorescent probes were generated using the Sonogashira coupling reaction.

Secondly, a ligand-protein binding assay was developed, allowing the calculation of binding constants for the sensors to the proteins. Subsequently, a displacement assay was developed that allows the calculation of dissociation constants for ligands specific to the target protein.

Finally, several computational studies were conducted to better understand the dynamics of probe binding to different protein systems, the reactivity of the fluorophores used in the Sonogashira reaction, and, as an annex, comprehend the electronic effects that substituents have in different 3-hydroxichromones.

A mi mamá Mónica y a Valentina

Agradecimientos

A Luciana, por acompañarme y dirigirme en este largo camino. Durante todos estos años, siempre estuvo disponible para discutir resultados, aconsejarme, proponer alternativas y plantear nuevos desafíos. De ella absorbí mucho del rigor científico que considero que escasea hoy en día. Agradezco también que permitió darle rienda suelta a mi desorganizada curiosidad. ¡Gracias, Lu!

A Mariela, por oficiar de co-directora y mostrarme siempre cómo funciona el mundo. Cada charla que tenemos es valiosísima.

A todos los investigadores del CIBION, de los que de alguna forma u otra aprendí algo. Mención especial para Andrés Zelcer, que me dio una mano enorme para hacer que las deconvoluciones espectrales sean más amenas. También a Mariano por ayudarme con la purificación y expresión de las proteínas en el momento justo.

A Pedro Aramendía, por toda la ayuda y conocimiento que me brindó en lo que respecta a la fotofísica y la ciencia en general. Gran ejemplo de científico y de persona. "Cuando sea grande quiero ser como él".

A Ana Bellomo (¡Anita!) por tenerme una paciencia infinita durante mi primer año de doctorado. De ella aprendí casi todo lo que sé de química orgánica y de las buenas prácticas en el laboratorio.

A todas las generaciones de Becarixs del CIBION por crear sostener un espacio laboral sano y espectacular para trabajar.

A todas las personas que formaron y forman parte del laboratorio de química del CIBION. De todos aprendí algo.

A Verónica Sánchez por instruirme en el área de las simulaciones computacionales.

Al CONICET por financiar mi doctorado.

Este trabajo utilizó recursos computacionales del CCAD-UNC, que forma parte del SNCAD-MinCyT, Argentina

En lo personal

A Valentina, mi compañera de vida. Ella es la que está en el día a día escuchando todas las ideas locas que le planteo sin siquiera sorprenderse (y viceversa). Gracias por el apoyo de todos estos años. Construimos algo muy lindo. ¡Te amo!

A mis viejos por siempre impulsarme a hacer lo que me gusta. Siempre me otorgaron la libertad de ser y hacer y me inculcaron valores invaluableles. En particular, agradecerle a mi vieja. Fue y es un ejemplo de vida para cualquier persona que se haya cruzado con ella. A mi viejo, Juan, porque me inculco dos de las conductas más importantes que se pueden tener: la constancia y la disciplina.

A mis abuelos por brindarme amor infinito (y mucha comida rica).

A la familia de Valen, que me adoptó desde el día uno como uno más, a pesar de ser considerablemente callado e introvertido.

A Ariel, porque transitamos mano a mano un momento durísimo durante este último año y, si no hubiese sido por él, todo hubiera sido aún más complejo.

A mis amigos por recordarme que antes de ser un científico soy un mono más o menos evolucionado y me hacen caer a tierra. Todo es más liviano cuando hacemos un asado.

A Gastón y Flor, mis amiguites de Balcarce/Urquiza, por la amistad de todos estos años. ¡Esos cortes de semana son importantísimos! Un saludo especial a Fermín, que nacerá en unas pocas semanas. Lo vamos a esperar con mucho cariño y comida.

Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
AFO	Algar-Flynn-Oyamada
AIC	Criterio de información de akaike
ANS	1,8-anilinaftalensulfonato
BODIPY/BDP	Borodipirrometano
CCD	Cromatografía en capa delgada
CT	Transferencia de carga
DCM	Diclorometano
DIPEA	N,N-diisopropilamina
DMF	Dimetilformida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESICT	Transferencia de carga en el estado excitado
ESIPT	Transferencia de protón en el estado excitado
FABP	Proteína de unión a ácidos grasos
FE	3-hidroxicromona
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
HOBt	Hidroxibenzotriazol
HOMO	Orbital ocupado de mayor energía
HSA	Albúmina de suero humano
HTS	Cribado de alto rendimiento
hCAII	Anhidrasa carbónica humana II
ITC	Titulación calorimétrica isotérmica
K_a	Constante de afinidad
K_b	Constante de disociación
KOH	Hidróxido de potasio
LUMO	Orbital desocupado de menor energía
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
N	Estado Normal
nm	Nanometro
ON	Toda la noche
RMN	Resonancia magnética nuclear
T	Estado tautomérico
t.a./RT	Temperatura ambiente
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
Ts	Tosilo

Índice

1. Introducción	1
1.1. Descubrimiento de fármacos	1
1.1.1. Cribado de alto rendimiento	2
1.1.2. Sondas fluorescentes para proteínas blanco	3
1.2. Fluorescencia y fluoróforos	5
1.2.1. Fluorescencia	5
1.2.2. Efectos del entorno sobre la fluorescencia	7
1.2.3. Fluoróforos ES IPT	9
1.2.4. Rotores	12
1.3. Objetivos de la tesis	18
1.4. Referencias	19
2. Síntesis de sondas fluorescentes sensibles al entorno	26
2.1. Diseño de sondas fluorescentes	27
2.2. Síntesis de Fluoróforos	29
2.2.1. Síntesis de BODIPYs	29
2.2.2. Síntesis de 3-hidroxicromonas	41
2.3. Síntesis de sondas	60
2.3.1. Reacción de Sonogashira:	60
2.3.2. Sondas selectivas para Anhidrasa Carbónica humana 2	62
2.3.3. Sonda selectiva para proteínas de unión a ácidos grasos (FABP)	83
2.3.4. Sonda derivada de morfolina	84
2.4. Conclusiones	86
2.5. Detalles Experimentales	87
2.5.1. Síntesis de BODIPYs	87
2.5.2. Síntesis de 3HCs	91
2.5.3. Síntesis de ligandos selectivos para hCAII	95
2.5.4. Síntesis de sondas	98
2.6. Referencias	109
3. Materiales y métodos	116
3.1. Espectroscopía	117
3.1.1. Absorción	117
3.1.2. Emisión estacionaria	117
3.1.3. Anisotropía de fluorescencia	118
3.1.4. Emisión resuelta en el tiempo	120

3.1.5.	Medidas de fluorescencia en lector de placas	121
3.1.6.	Deconvoluciones espectrales.....	121
3.2.	Simulaciones computacionales.....	124
3.2.1.	Docking Molecular	124
3.2.2.	Dinámica Molecular	125
3.2.3.	Métodos cuánticos (QM).....	127
3.3.	Obtención de proteínas	128
3.4.	Referencias.....	129
4.	<i>Determinaciones en sistemas proteicos.....</i>	132
4.1.	Introducción	133
4.1.1.	Determinación de constantes de afinidad de las sondas	134
4.1.2.	Determinación de constantes de afinidad de ligandos competitivos	137
4.1.3.	Diseño de experimentos	139
4.1.4.	Tipo de determinaciones	140
4.2.	Resultados.....	142
4.2.1.	Sistema Albúmina de suero Humano	142
4.2.2.	Sistema Anhidrasa Carbónica humana II	153
4.2.3.	Sistema Proteína de unión a ácidos grasos 2	169
4.3.	Conclusiones.....	172
4.4.	Referencias.....	176
5.	<i>Estimación de momentos dipolares en 3-hidroxicormonas asimétricas</i>	181
5.1.	Introducción	182
5.2.	Resultados estructurales teóricos	183
5.2.1.	Optimización de geometría y análisis estructural.....	183
5.2.2.	Análisis de interacciones no covalentes:	185
5.2.3.	Análisis de orbitales moleculares de frontera	187
5.2.4.	Densidad de carga.....	188
5.2.5.	Momentos dipolares.....	190
5.3.	Determinación de momentos dipolares experimentales	191
5.4.	Comparación de los valores experimentales y teóricos	192
5.5.	Conclusiones.....	194
5.6.	Referencias.....	200
6.	<i>Resumen.....</i>	202

Capítulo 1

Introducción

1.1. Descubrimiento de fármacos

El desarrollo de nuevos fármacos es un proceso complejo y altamente costoso que suele llevar más de una década desde las etapas iniciales de investigación hasta la aprobación por parte de la autoridad regulatoria.¹ Estas sustancias actúan sobre un blanco biológico específico que desempeña algún rol clave en el desarrollo de la patología. En la práctica, estos blancos suelen ser proteínas con funciones estructurales o enzimáticas. De esta manera el fármaco debe unirse a estas para lograr que la unión sea biológicamente relevante, desencadenando el efecto farmacológico deseado. La complejidad de este proceso requiere de la participación de profesionales de distintas áreas de la ciencia y puede pensarse como una serie de etapas esquematizadas en la figura 1.1, divididas principalmente en dos instancias: la fase preclínica donde la droga es diseñada y evaluada *in vitro*, en células y en animales, y la fase clínica donde se realizan estudios en humanos.

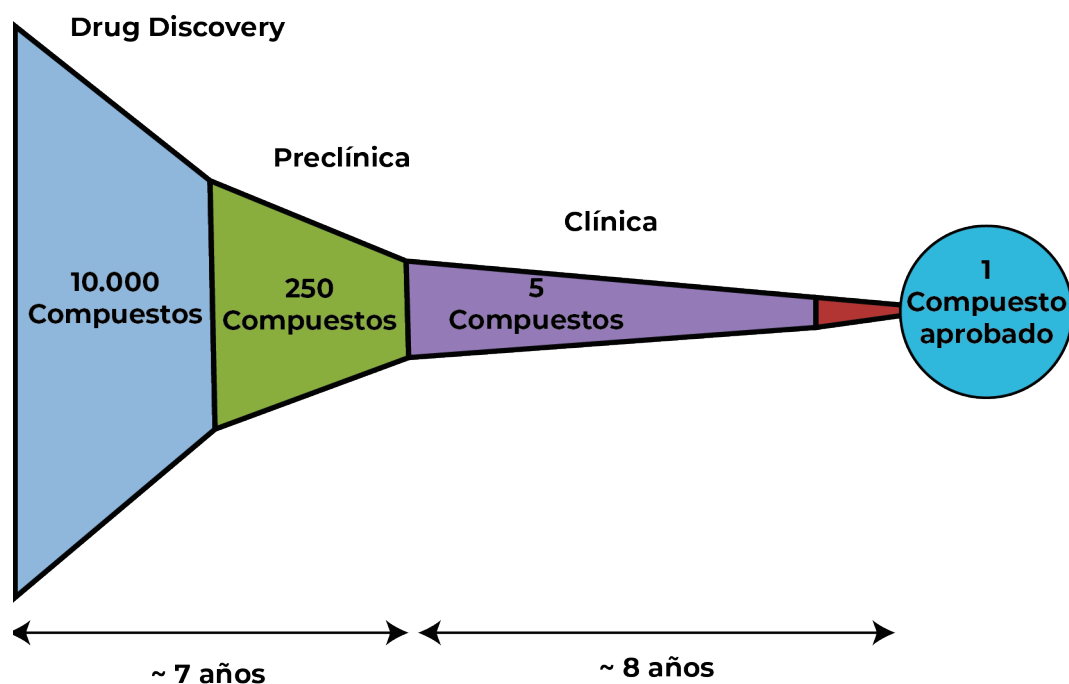


Figura 1.1 Proceso de descubrimiento de un fármaco.

A su vez la fase preclínica puede dividirse en: identificación y validación del blanco terapéutico, descubrimiento y desarrollo de moléculas candidatas (hits), optimización de los candidatos (leads), y ensayos preclínicos de toxicidad en animales, biodisponibilidad, etc. La etapa

identificación y validación del blanco terapéutico suele darse en el marco de investigaciones académicas y consiste en identificar y validar un blanco terapéutico a atacar. Estos blancos pueden ser, en principio, cualquier entidad biológica, pero habitualmente suelen ser proteínas. Un punto clave es confirmar el rol patológico del blanco para asegurar que, actuando sobre este, se desencadene el efecto farmacológico buscado. Una vez elegido el blanco, comienza el descubrimiento y desarrollo de fármacos *per se*. Esta fase consiste en realizar cribados (screening) en los que se testean bibliotecas de compuestos y se determina cual de estos desencadena la actividad biológica deseada. Estas primeras moléculas encontradas son denominadas hits. La etapa posterior, habitualmente llamada hit-to-lead, consiste en optimizar el hit para que cumpla con una serie de propiedades fisicoquímicas óptimas para un fármaco² y lograr tanto afinidades por el blanco en el rango sub micromolar como selectividad. Finalmente se desarrollan los ensayos preclínicos y clínicos siendo los primeros *in vitro* y en animales, y los segundos en humanos.

1.1.1. Cribado de alto rendimiento

El objetivo de las campañas de cribado no es el de encontrar moléculas listas para salir al mercado, sino hits factibles de ser optimizados en etapas posteriores (Figura 1.2). Funciona como una especie de filtro primario para tener un punto de partida, puesto que el espacio molecular es de 10^{60} moléculas y racionalizar la interacción que puede tener una de estas en un entorno biológico es imposible si no se tiene un punto de partida.

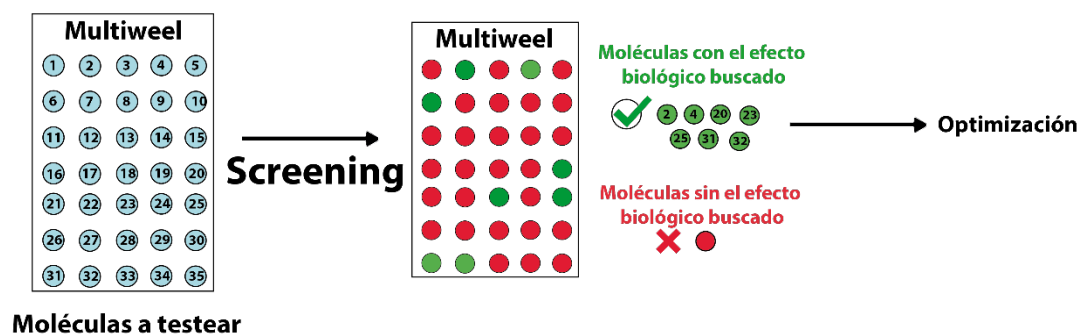


Figura 1.2. Esquema básico de HTS.

El cribado ha evolucionado significativamente desde su auge en los años 90, cuando las compañías farmacéuticas invertían grandes sumas de dinero en instalaciones de cribado de alto rendimiento (HTS por sus siglas

en inglés, High Throughput Screening) altamente automatizadas donde miles de compuestos son evaluados de forma simultánea. Si bien este desarrollo no fue tan revolucionario como se esperaba, es una de las técnicas predominantes hoy en día.³

Existen cuatro elementos claves para realizar un HTS: 1) bibliotecas de moléculas con características adecuadas para lo que se busca en un fármaco; 2) un método que permita ensayos automatizables; 3) una plataforma robótica; 4) un sistema de análisis de datos.⁴ En lo que respecta a los últimos dos, desde los años 90' hasta la fecha, este tipo de tecnologías han sido ampliamente desarrolladas y no representan un desafío considerable. Por otro lado, las bibliotecas de moléculas empleadas deben tener compuestos con características fisicoquímicas compatibles con un adecuado perfil farmacológico y además ser diversas estructuralmente para garantizar una exploración suficiente del espacio químico. Con el paso de los años diversas compañías desarrollaron librerías de millones de compuestos filtrados y listos para testear.⁵

Entre los principales desafíos se encuentra el desarrollo de ensayos capaces de determinar con exactitud qué molécula de las evaluadas produce el efecto biológico esperado, asegurando además que estos ensayos sean estadísticamente robustos, reproducibles y de bajo costo. La necesidad de aumentar el rendimiento en el testeo de moléculas y miniaturizar los ensayos generó la necesidad de alejarse de las técnicas de ensayo tradicionales que requerían separaciones y lavados hacia técnicas de lecturas radioactivas o simples cambios de fluorescencia por ser más homogéneas y automatizables.³ En particular los ensayos de fluorescencia muestran una elevada sensibilidad, una velocidad de respuesta rápida y no son destructivos para la muestra.⁶

Es importante destacar que no hay una técnica que sea mejor que otra, si no, que se debe disponer de un conjunto completo de técnicas diversas para tal fin.

1.1.2. Sondas fluorescentes para proteínas blanco

Los ensayos de fluorescencia para blancos proteicos, requieren el desarrollo de moléculas fluorescentes (llamadas sondas) que se unan a la proteína a estudiar y que cuando esto ocurra produzca un cambio en la emisión de fluorescencia. Luego al introducir una molécula que actúa sobre

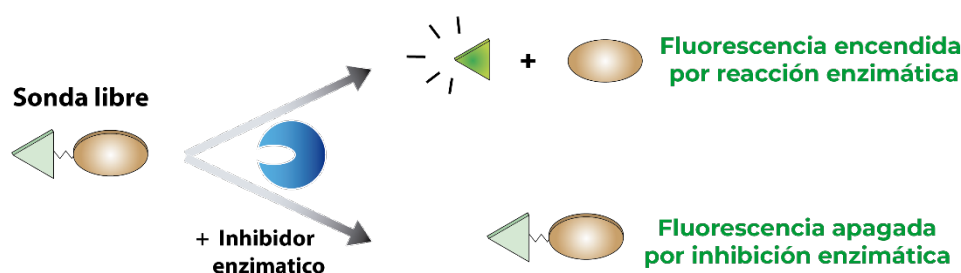
el blanco proteico, la señal puede cambiar nuevamente en base a como interactúa la molécula a estudiar con el sitio de unión.⁷ Estas variaciones en la señal son estudiadas y calibradas para desarrollar ensayos de fluorescencia que permitan caracterizar eventos de unión al testear bibliotecas enteras de moléculas.

Las sondas fluorescentes específicas a proteínas, suelen estar conformadas por un fragmento que da especificidad por el blanco a estudiar y un fragmento fluorescente que aporta la señal. Existe una amplia diversidad de sondas que van desde moléculas orgánicas pequeña, hasta péptidos y nanopartículas.⁸⁻¹¹

Los fluoróforos orgánicos pequeños tienen la ventaja de que son modificables con técnicas sintéticas estándar, y sus propiedades de fluorescencia suelen variar tanto por cambios en el entorno¹² como por reacciones químicas.¹³ Un fluoróforo ideal para esta aplicación es aquel que presenta un rango dinámico amplio en sus estados posibles (apagado y encendido) y permite discernir que molécula de la biblioteca es ligando de cual no.

A la hora de diseñar un ensayo de este tipo existen al menos dos variables que hay que determinar: por un lado, el tipo de señal fluorescente a recolectar, puesto que los ensayos basados en fluorescencia abarcan diversas técnicas que registran no solo la intensidad total de fluorescencia, si no también, la polarización de fluorescencia, la transferencia de energía por resonancia (FRET) y la fluorescencia resuelta en el tiempo entre otros. Como segunda variable a definir se encuentra el principio de detección. Existen dos enfoques principales: el primero se centra en la detección a través de reacciones enzimáticas^{14, 15} (Figura 1.3.a), donde la sonda actúa como sustrato y la señal de fluorescencia cambia por reacción enzimática con la proteína blanco. En caso de que el ligando que se introduce sea un inhibidor, la señal no se altera dando así un positivo. El segundo enfoque es no enzimático y utiliza sondas que responden a cambios en su entorno, alterando sus propiedades de fluorescencia al unirse al sitio de unión^{16, 17} (Figura 1.3.b). En este caso, si la molécula a testear es ligando de la proteína, la sonda es desplazada y la señal vuelve a cambiar.

a) Enfoque enzimático



b) Enfoque no enzimático

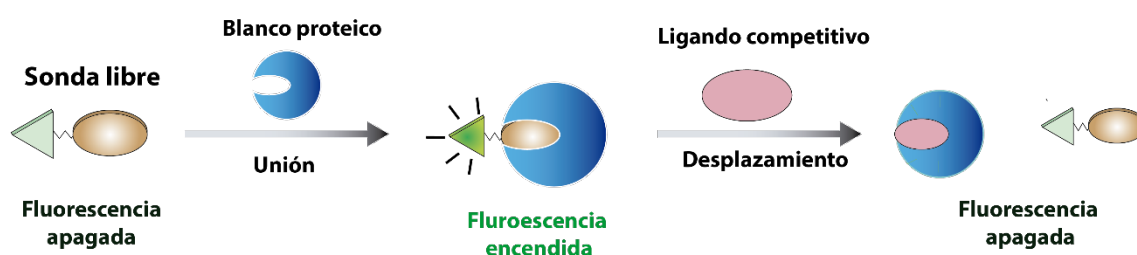


Figura 1.3 a) Enfoque de detección enzimático. b) Enfoque no enzimático.

El enfoque no enzimático se encuentra menos explorado en literatura y tiene menos aplicaciones comerciales. Sin embargo, permite el estudio de una mayor diversidad de sistemas, ya que no se restringe a enzimas y puede extrapolarse a otros tipos de blancos biológicos mediante la modificación de la región molecular que proporciona la selectividad. El enfoque no enzimático será el que se explorará en esta tesis.

1.2. Fluorescencia y fluoróforos

1.2.1. Fluorescencia

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia que surge como consecuencia de la relajación radiativa de los electrones de una molécula que fueron previamente excitados, a partir de luz. Este evento suele tener lugar en un espacio temporal en la escala de los sub-nanosegundos hasta una decena de estos. Cabe destacar que no todas las moléculas son fluorescentes. El ciclo completo de fluorescencia puede ser esquematizado utilizando un diagrama simplificado denominado “diagrama de Jablonski” (Figura 1.4).¹⁸

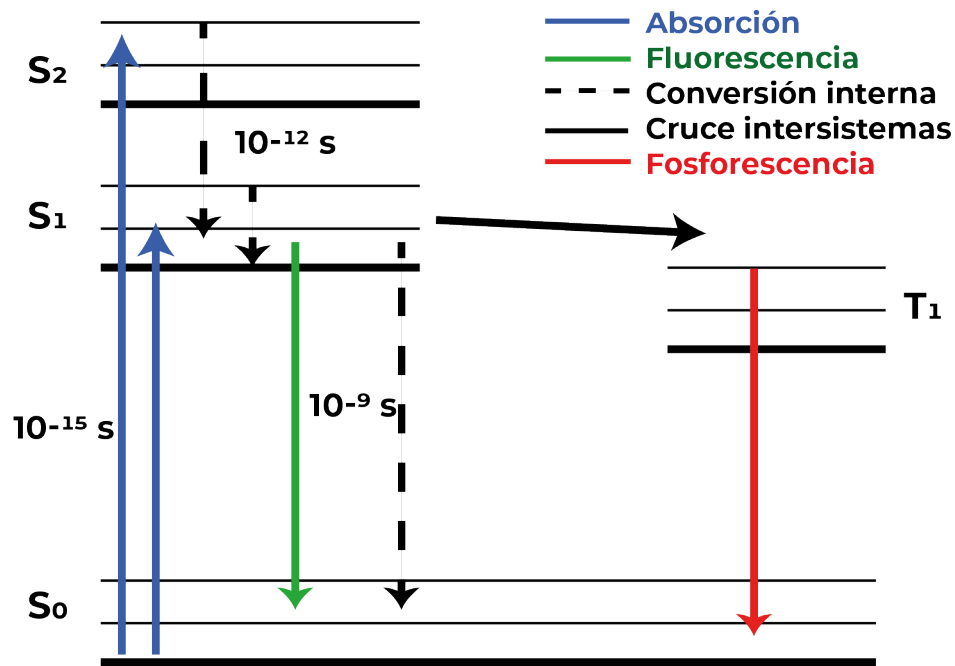


Figura 1.4 Diagrama de Jablonski.

El proceso de fluorescencia ilustrado en el diagrama de Jablonski puede simplificarse en tres pasos clave: la excitación, la conversión interna y el decaimiento radiativo. La excitación consta en que una molécula absorba un fotón de energía ($h\nu_A$) de una fuente externa como lo es una lámpara o un láser. El fluoróforo se excita típicamente a uno de los estados vibracionales excitados del primer estado singlete electrónico (S_1). El exceso de energía vibracional se transfiere rápidamente al solvente a través de colisiones, en un proceso no radiativo llamado relajación vibracional que ocurre en el rango de los sub-picosegundos. Si el fluoróforo se excita al segundo estado singlete electrónico (S_2), cae rápidamente al estado S_1 debido a la conversión interna. Esta dinámica produce que la emisión de fluorescencia ocurra a longitudes de ondas mayores que la de emisión, puesto que parte de la energía de excitación es disipada. Este efecto es conocido como el corrimiento de Stokes y es relevante para el diseño de fluoróforos que son sensibles al entorno. Finalmente, desde el estado S_1 , se da el decaimiento al estado S_0 que puede ser no radiativo o radiativo (fluorescencia). Notar que la conversión interna no radiativa a S_0 es menos eficiente respecto a la de S_2 - S_1 debido a la mayor diferencia de energía entre S_1 y S_0 .

En lo que caracteriza a la fluorescencia se pueden definir dos parámetros relevantes: el rendimiento cuántico y el tiempo de vida de

fluorescencia. El primero se define como la relación del número de fotones emitidos sobre los absorbidos y se expresa matemáticamente según la ecuación 1.1 en donde k_r es la constante radiativa y k_{nr} la no radiativa

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad [1.1]$$

Por otro lado, el tiempo de vida debe su nombre a que su determinación experimental que se lleva a cabo midiendo el tiempo en el que decae la emisión y formalmente se define como el promedio de tiempo que la molécula pasa en el estado excitado antes de volver al estado fundamental. Matemáticamente se expresa en la ecuación 1.2 como:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad [1.2]$$

Estos dos parámetros son de vital importancia porque dan noción de lo que ocurre en el estado excitado. Si bien las definiciones planteadas hasta ahora son simples, los estados excitados son sensibles a las interacciones con el entorno, y la dinámica entre los fenómenos fotofísicos puede cambiar entre dos solventes distintos, y más aún en entornos biológicos. Es por esto por lo que es importante comprender como el entorno modifica las propiedades de fluorescencia para realizar un diseño racional de fluoróforos dirigido a resolver problemas específicos.

1.2.2. Efectos del entorno sobre la fluorescencia

Dada la naturaleza de los estados excitados, los solventes tienen un marcado efecto en la emisión de los fluoróforos especialmente en moléculas polares. Típicamente el aumento en la polaridad del solvente desplaza la emisión a energías aún más bajas debido a la estabilización del estado excitado por las moléculas del solvente. Los fluoróforos suelen tener un momento dipolar mayor en el estado excitado (μ_E) que en el estado fundamental (μ_G). Tras la excitación, los dipolos del solvente pueden reorientarse o relajarse alrededor de μ_E , lo que disminuye la energía del estado excitado (Figura 1.5.a). Este fenómeno se conoce como solvatocromismo.

Una pregunta que se puede hacer es ¿Por qué se busca en la fluorescencia una herramienta sensible al entorno pudiéndose utilizar la absorción? Lo que ocurre es que el marco temporal de la absorción es menor

(10^{-15} s) que el tiempo de reorganización del solvente (10-100 ps para solventes fluidos), por lo que el efecto del entorno influye poco. Como los tiempos de vida de fluorescencia son del orden de 1-10 ns, lo que se observa en un espectro de fluorescencia es representativo del estado excitado relajado del solvente, es decir, la resultante de la interacción de la molécula en estado excitado con el solvente. Un diagrama de Jablonsky más realista es el de la figura 1.5.b.

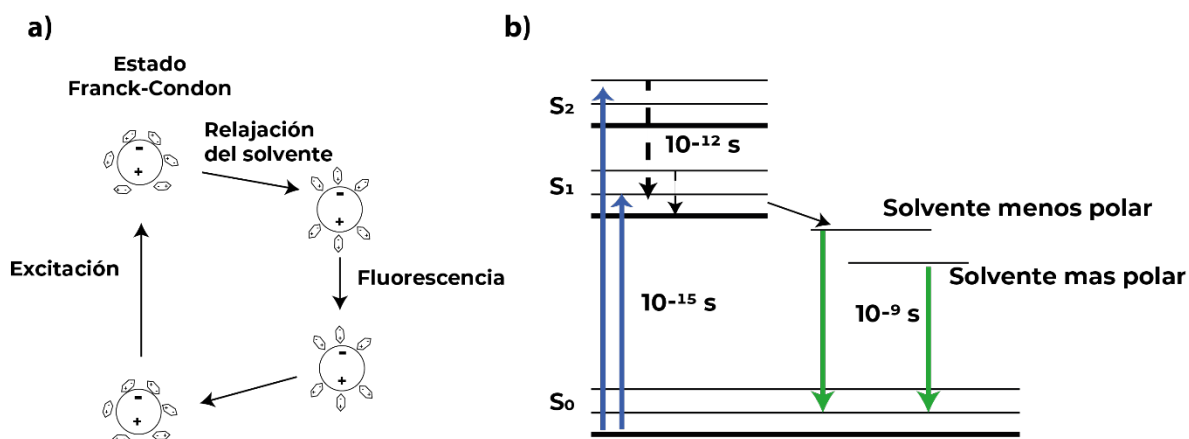


Figura 1.5 a) Representación de la distribución de dipolos en el ciclo de fluorescencia. b) Diagrama de Jablonski teniendo en cuenta el efecto del solvente.

El solvatocromismo es considerablemente más acentuado cuando ocurre una transferencia de carga intramolecular en el estado excitado (ESICT por sus siglas en inglés, Excited State Intramolecular Charge Transfer en la molécula), produciendo corrimientos de Stokes de hasta más de 190 nm (Figura 1.6.a).¹⁹ Este fenómeno suele darse en fluoróforos que presentan grupos dadores y aceptores de carga acoplados en su estructura, como los mostrados en la figura 1.6.c. Los estados excitados generados exhiben un marcado carácter de transferencia de carga, caracterizado por un aumento en el μ_E y, consecuentemente, en la variación del momento dipolar respecto al estado fundamental, $\Delta\mu_{E-G}$. Esta diferencia muestra una correlación positiva con el solvatocromismo, de modo que mayores $\Delta\mu_{E-G}$ se corresponden con una mayor sensibilidad del fluoróforo a los cambios en la polaridad del solvente.²⁰⁻²³

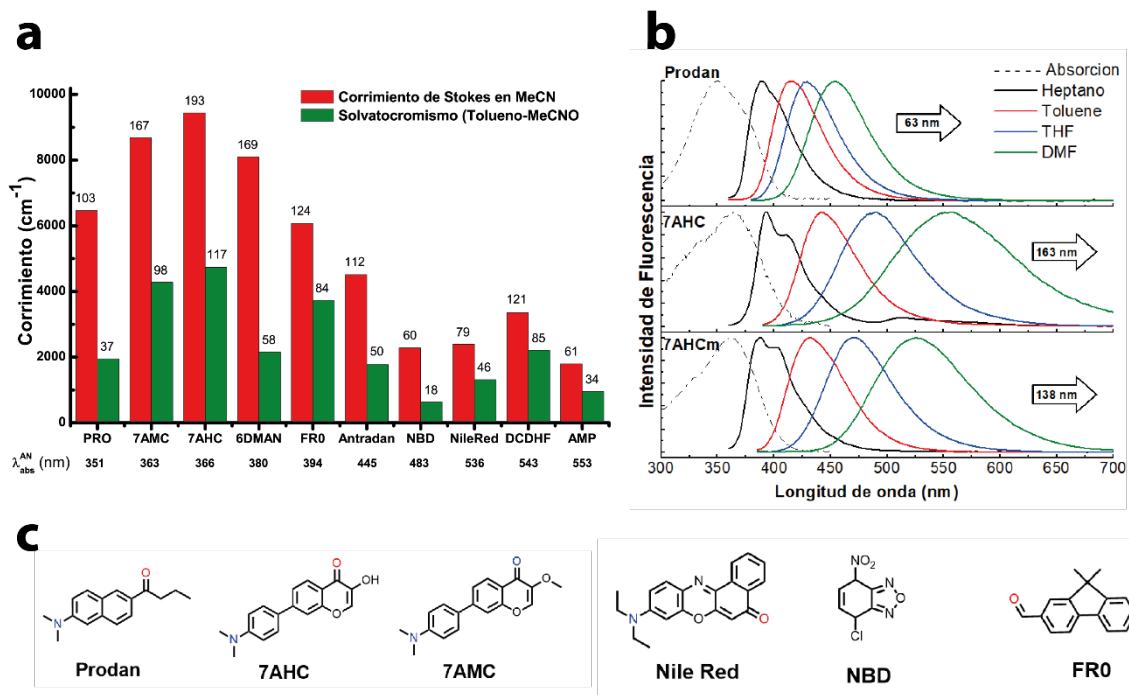


Figura 1.6 a) Solvatochromismo y corrimiento de Stokes en moléculas que presentan transferencia de carga. b) Espectros de fluorescencia para tres fluoróforos solvatoacrómicos (Tomada de referencia ¹⁹). c) Ejemplo de algunas moléculas solvatoacrómicas.

La realidad es que la fluorescencia es afectada no solo por la polaridad del solvente sino también por interacciones específicas del entorno, por cambios conformacionales/redistribuciones, interacciones soluto-soluto y demás. Es por esta sensibilidad al entorno que presentan muchos fluoróforos que son utilizados para caracterizar entornos biológicos con gran sensibilidad y precisión.^{24, 25}

1.2.3. Fluoróforos ESIPT

El proceso de transferencia de protón intramolecular en estado excitado (ESIPT por sus siglas en inglés, Excited state intramolecular proton transfer) consta de la transferencia de un protón entre un dador (suelen ser alcoholes y aminas) a un aceptor de hidrógeno (carbonilo o iminas) que se encuentran en la misma molécula. Este fenómeno fue reportado por primera vez por Kasha en 1979 y desde entonces hubo una revisión exhaustiva respecto a este fenómeno.^{23, 26-28}

El proceso de ESIPT puede plantearse como un esquema de cuatro estados que comienza con la excitación de la molécula (Figura 1.7). Para que la reacción de transferencia de protón ocurra, habitualmente tiene lugar

una redistribución de carga posterior a la excitación que aumenta la acidez de la especie donante de protón, y la basicidad de la aceptora. Es por esto por lo que se suele asociar además un proceso de transferencia de carga intramolecular acoplado (ESIPT-ESIPT).

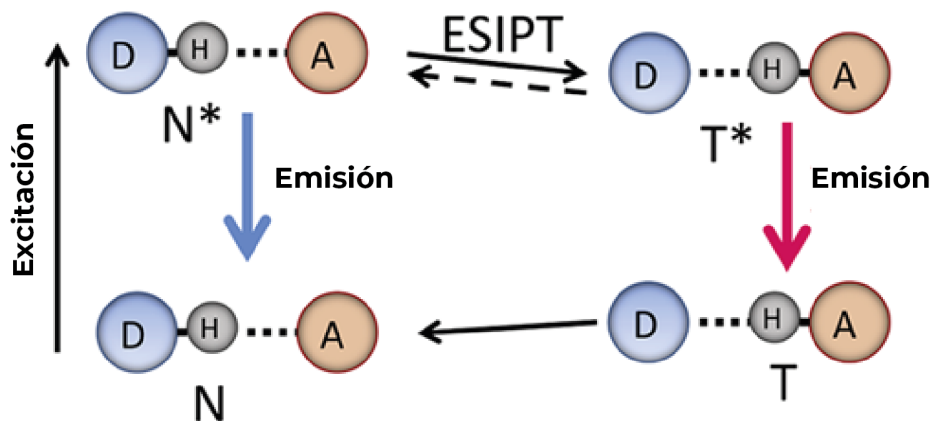


Figura 1.7. Ciclo del proceso ESIPT. Adaptado de Demchenko (2023).²⁹

La existencia de dos estados excitados llamados N^* y T^* por normal y tautomérico respectivamente puede dar lugar a dos bandas de emisión que poseen comportamientos diferentes. El tipo de espectro que se obtiene depende del régimen en el que se establecen ambos estados y las eventuales barreras energéticas que hay entre ellos. Los 4 casos más habituales se ilustran en la figura 1.8.a. En un extremo se encuentran los fluoróforos que muestran una ESIPT lenta o impedida. En este caso el espectro resulta en una sola banda, puesto que el estado T^* no se forma. En el otro extremo si la ESIPT es rápida o irreversible también solo se observa una banda correspondiente a la emisión desde el estado T^* . Finalmente hay dos escenarios intermedios: cuando existe un régimen cinético o un equilibrio dinámico entre ambos estados. En estos casos se observan dos bandas, que pueden variar en posición y relación entre ellas (ratio) al variar el entorno.

Las figuras 1.8.b y 1.8.c muestran dos ejemplos de moléculas que presentan ESIPT. El primer caso es el de diCN-HBO que presenta solvatocromismo en la banda T^* , mientras que la 3-hidroxicromona FE lo muestra en la banda N^* . La modificación estructural en ambos casos puede dar lugar a modificaciones en los comportamientos de fluorescencia de cada banda.^{23,30}

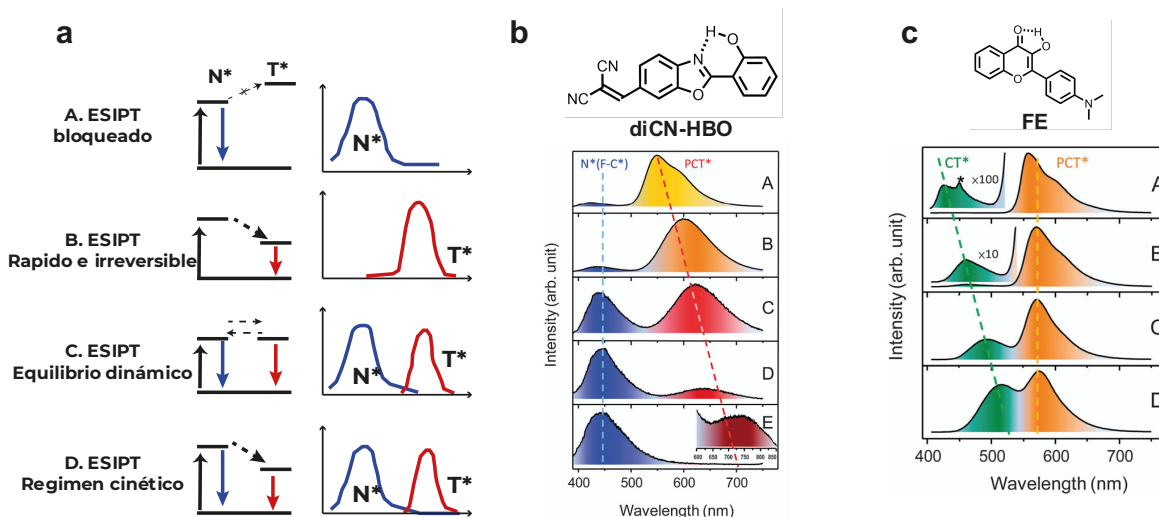


Figura 1.8. a) Regímenes habituales de moléculas que experimentan ES IPT. Se muestran los espectros de emisión al aumentar la polaridad de arriba abajo para b) diCN-HBO y c) FE.

Esto es relevante desde el punto de vista del diseño de sondas ES IPT porque en lugar de tener una sola banda de emisión, se tienen dos, con comportamientos diferentes, lo que habilita un parámetro más como es la relación de bandas, y por ende se tiene un método de calibración interno independiente de la concentración.²⁵ Es de gran interés investigar cómo la modificación estructural de los sustituyentes y del entorno modula el proceso ES IPT, con el fin de desarrollar fluoróforos con características específicas.

1.2.3.1. 3-Hidroxicromonas

Los derivados de la 3-hidroxicromona (3HC, Figura 1.9.a) son un ejemplo de fluoróforos que presentan ES ICT/ES IPT. La transferencia de protón es impulsada por un aumento en la acidez del grupo dador de protón (3-hidroxilo) y en la basicidad del grupo aceptor (4-carbonilo), debido a la redistribución de densidad electrónica en el estado excitado. Un derivado de 3-HC ampliamente estudiado es la 3-hidroxiflavona, 3HF. Determinaciones de espectroscopía ultra-rápida demostraron que la reacción ES IPT en 3HF ocurre en el orden de los femtosegundos en solventes no polares, secos y extremadamente puros. En este compuesto, el equilibrio tautomérico en estado excitado se encuentra desplazado hacia T* y no se observa emisión estacionaria desde N*, salvo en los casos de solventes próticos o algunos polares no-próticos.

La presencia de grupos dadores de electrones en 3HC modula fuertemente las propiedades espectroscópicas y el proceso ESIPT. Esto se debe principalmente a la generación de un estado de transferencia de carga intramolecular en el estado excitado correspondiente al estado N^* . La presencia del sustituyente *N,N*-dietilanilino en 3HC da lugar a la molécula **FE** en la que se incrementa el carácter de transferencia de carga en estado excitado. La separación de cargas producida por el proceso ESIPT le otorga un elevado momento dipolar al estado excitado, por lo que presenta fuertes interacciones con solventes polares. Este proceso tiene una consecuencia directa sobre la emisión. En solventes polares, el estado electrónico excitado se estabiliza en mayor proporción que el fundamental y como consecuencia la banda de emisión se desplaza a mayores longitudes de onda. El efecto sobre la absorción es menor, ya que los estados Franck Condon de S_1 siguen siendo de similar energía (solvatocromismo positivo). El incremento de I_{N^*}/I_{T^*} con la polaridad del solvente observado en **FE** es consistente con una mayor estabilización de N^* por interacciones dipolares con el medio (Figura 1.9.b).

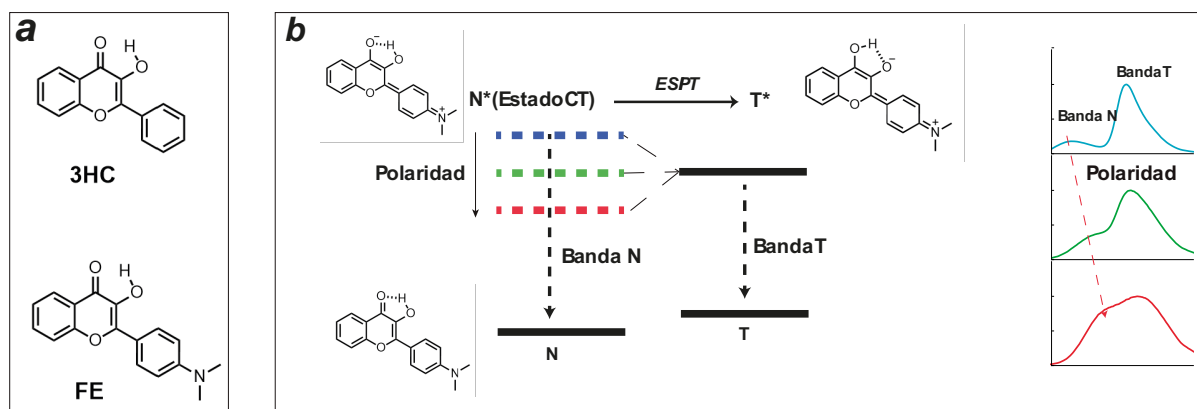


Figura 1.9. a) Estructuras de 3HC y FE. b) Ciclo de ESIPT y sensibilidad a la polaridad del solvente de FE.

A partir de estas observaciones, se puede ver que modulando el acoplamiento de los procesos de transferencia de carga y de protón en estado excitado es posible controlar la relación de intensidades I_{N^*}/I_{T^*} , así como también las posiciones de los máximos de emisión y los tiempos del proceso ESIPT.

1.2.4. Rotores

El término rotor molecular se usa comúnmente para describir una molécula fluorescente que tiene la capacidad de experimentar un

movimiento de torsión intramolecular en el estado excitado. Típicamente, un rotor molecular consiste en tres subunidades: una unidad dadora de electrones, una unidad aceptora de electrones y una unidad espaciadora compuesta habitualmente por fragmentos aromáticos.

Grabowski y colaboradores, en 1973³¹, propusieron por primera vez un modelo para este tipo de moléculas en el que se manifiestan dos estados excitados: un estado de transferencia de carga intramolecular por giro o torsión (TICT, por sus siglas en inglés, Twisted Intramolecular Charge Transfer) y un estado localmente excitado (LE), siendo este último el estado excitado inicial.³² El estado TICT, por otro lado, por ser un estado de transferencia de carga muestra un marcado solvatocromismo, aunque en algunas moléculas es un estado no emisor. Un punto clave para tener en cuenta es que la población de moléculas excitadas en un estado y en el otro dependen del grado de rotación intramolecular de la molécula, y la barrera energética que hay entre ambos. Experimentalmente se observa que la barrera se modifica con la polaridad del solvente y con la viscosidad del medio (Figura 1.10). Esta dinámica hace que este tipo de moléculas sean muy útiles para caracterizar entornos biológicos en los que hay múltiples cambios de viscosidad.³³

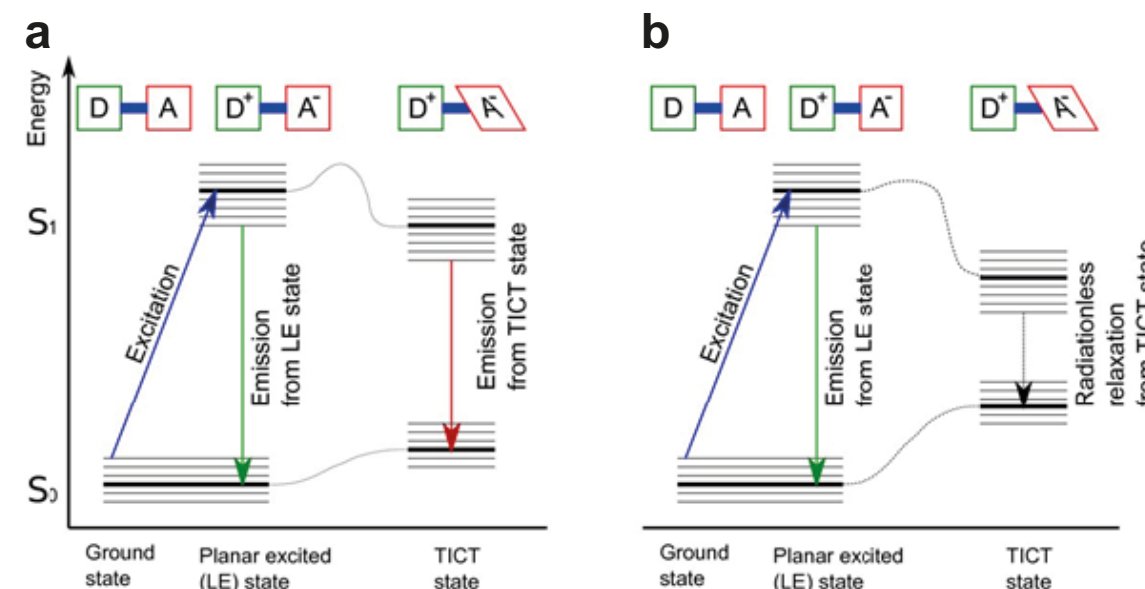


Figura 1.10. Diagramas del proceso de emisión de fluorescencia en rotadores. a) Rotadores con un estado TICT emisor b) Rotadores con un estado TICT no emisor. Figura tomada de referencia ³³.

En lo que respecta a la relación entre la viscosidad del medio y los rendimientos cuánticos de fluorescencia se han propuesto diversos modelos. Una relación útil es la expresada la denominada ecuación de Förster-Hoffmann (Ecuación 1.3), que vincula el rendimiento cuántico con la viscosidad η del bulk, donde C y x son constantes que dependen del solvente y del fluoróforo, respectivamente. Este modelo funciona bien en un amplio rango de viscosidades, pero presenta desviaciones en valores bajos de esta propiedad. Una forma alternativa de esta ecuación es la ecuación 1.4, en donde A y B son constantes experimentales, y k_R es la constante radiativa del fluoróforo, que es independiente a la viscosidad.

$$\log \Phi_F = C + x \cdot \log \eta \quad [1.3]$$

$$\Phi_F = \frac{k_R \eta}{A + B \eta^x} \quad [1.4]$$

Si bien este modelo es ampliamente aceptado en la bibliografía, la viscosidad no deja de ser una magnitud macroscópica. Es por esto por lo que en muchos casos es más adecuado relacionar el volumen libre en lugar de la densidad como un determinante importante del rendimiento cuántico. Loutfy y colaboradores³⁴ han propuesto un tratamiento que se basa en la relación empírica de Doolittle³⁵ entre la viscosidad y el volumen libre (Ecuación 1.5)

$$\eta = A \cdot \exp \left(B \frac{v_0}{v_f} \right) \quad [1.5]$$

En donde v_0 es el volumen ocupado, y v_f es el volumen libre. Loutfy y Arnold³⁶ proporcionan evidencia experimental de que el rendimiento cuántico de un fluoróforo sigue la relación de la ecuación 1.6 que se obtiene combinando las ecuaciones 1.4 y 1.5, donde $k_{NR,0}$ se interpreta como una constante intrínseca dependiente del fluoróforo, y x es la pendiente encontrada en gráficas de $\log \eta$ versus $1/v_f$, $k_{NR,0}$ es proporcional a la velocidad de reorientación intramolecular, a su vez depende de la difusividad rotacional de la molécula.

$$\Phi_F = \frac{k_R \eta}{k_{NR,0}} \cdot \exp \left(x \frac{v_0}{v_f} \right) \quad [1.6]$$

Así, la difusividad rotacional es junto al volumen libre la determinante más importante del rendimiento cuántico en rotores moleculares. Sin

embargo, cuando la tasa de rotación intramolecular se vuelve muy alta en solventes de baja viscosidad, otros efectos, como la formación de enlaces de hidrógeno, la formación de excímeros y la interacción polar-polar, ya no son despreciables y causan desviaciones significativas de los modelos establecidos que describen la relación entre el rendimiento cuántico y la viscosidad.

1.2.4.1. BODIPYS meso sustituidos

Los borodipirrometenos (BODIPYs por sus siglas en inglés, boron dipyrromethene, Figura 1.11.a) son una familia de fluoróforos ampliamente utilizados para todo tipo de aplicaciones biológicas puesto que presentan rendimientos cuánticos elevados y una marcada foto estabilidad.³⁷ Las propiedades de fluorescencia de estas moléculas son modificables haciendo variaciones relativamente sencillas en su estructura. Por ejemplo, aumentando el grado de sustitución en las unidades pirrólicas, la emisión de fluorescencia se desplaza al rojo (Figura 1.11.b).³⁸ Otro tipo de modificación relevante es la sustitución en la posición 8, o “meso”. En particular, la adición de un grupo fenilo en dicha posición genera una serie de BODIPYS que muestran una marcada sensibilidad por la viscosidad, es decir, son rotores moleculares (Figura 1.11.c). Esta sensibilidad a la viscosidad varía según el grado de sustitución de la molécula. Presuntamente cuanto más sustituido se encuentra el BODIPY se observa menor sensibilidad al entorno y presenta un mayor rendimiento cuántico.

Kee y colaboradores, en 2005,³⁹ fueron los primeros en considerar a los BODIPY meso sustituidos con fenilos como rotores. Los autores realizaron una caracterización completa, tanto experimental como teórica de los mismos. Una primera observación fue que cuando el BODIPY meso sustituido no tiene sustituyentes en la estructura base, los rendimientos cuánticos en tolueno eran bajos (0,06) al igual que los tiempos de vida que rondaban los 0,45 ns. Sin embargo, al aumentar el grado de sustitución en posición orto del fenilo, ambos valores aumentaban considerablemente, dando unos rendimientos cuánticos del orden de 0,6-0,9 y tiempos de vida de 5-6 ns (Figura 1.11.c). Este comportamiento fue atribuido al impedimento estérico que no permite la libre rotación del fenilo en meso.

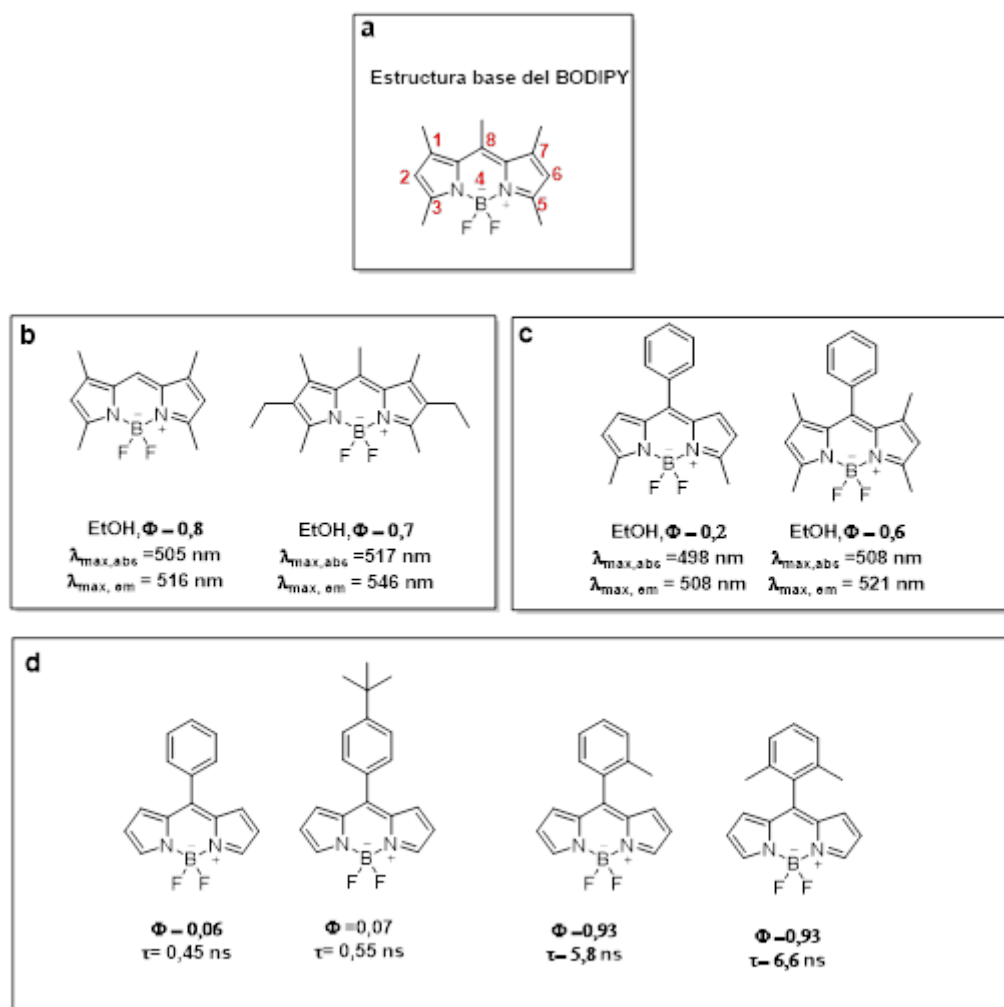


Figura 1.11. a) Estructura base del BODIPY con su respectiva numeración. b) Efecto del grado de sustitución en BODIPYs. c) BODIPYs meso sustituidos. d) Rendimientos cuánticos y tiempos de vida reportados en tolueno ³⁹.

Esta hipótesis fue confirmada realizando simulaciones computacionales en las que calcularon la superficie de energía potencial resultante de variar el ángulo diedro que comparte el sustituyente en meso con el esqueleto del BODIPY. Se observan dos escenarios distintos en base al grado de impedimento que tiene el anillo en meso. Por un lado, cuando la rotación no se encuentra impedida (Figura 1.12.b), el estado inicial excitado se relaja hacia una conformación de mínima energía en la que el ángulo diedro se encuentra a 180° (es decir en el plano del BODIPY) llamada conformación torcida (Figura 1.12.a). Este mínimo muestra una alta eficiencia en el decaimiento no radiativo al estado fundamental. Por otro lado, cuando la rotación se encuentra impedida (Figura 1.12.c), emerge una barrera energética para acceder a la conformación torcida, por ende, la relajación no

radiativa se encuentra impedida. Este comportamiento se siguió estudiando computacionalmente en diversos reportes ^{40, 41} y hoy se tiene una imagen un poco más clara, aunque, no distante de lo que reportó Kee en 2005.

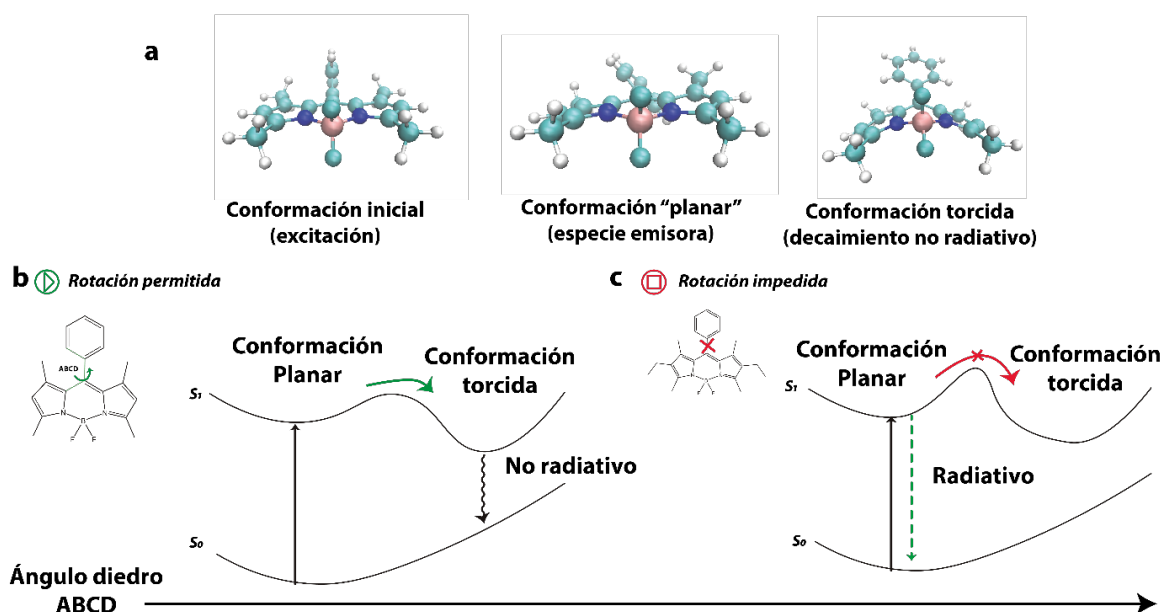


Figura 1.12. a) Conformaciones estables de BODIPYs meso sustituidos al variar el grado de rotación del anillo aromático. b y c) Superficie de energía esquemática resultante de variar el ángulo diedro ABCD.

Aunque este tipo de moléculas no se ajustan completamente al formalismo de los rotores, donde existe un estado localmente excitado y un estado de transferencia de carga TICT, la lógica subyacente es similar. La existencia de dos estados separados por una barrera energética que depende de la viscosidad (o volumen libre) del entorno se mantiene en ambos casos. Kuimova y colaboradores^{42, 43} realizaron una caracterización completa de cómo se relacionan estas moléculas con la viscosidad (Figura 1.13) determinando que cuanto más impedido se encuentra el BODIPY menor sensibilidad hay respecto al entorno, puesto que el impedimento conformacional se encuentra basalmente. Por otro lado, se han reportado este tipo de moléculas como sensores para sistemas proteicos, debido que al impedimento estérico del bolsillo hidrofóbico de estas macromoléculas pueden producir un aumento en la barrera entre el estado inicial radiativo y el no radiativo.⁴⁴⁻⁴⁶

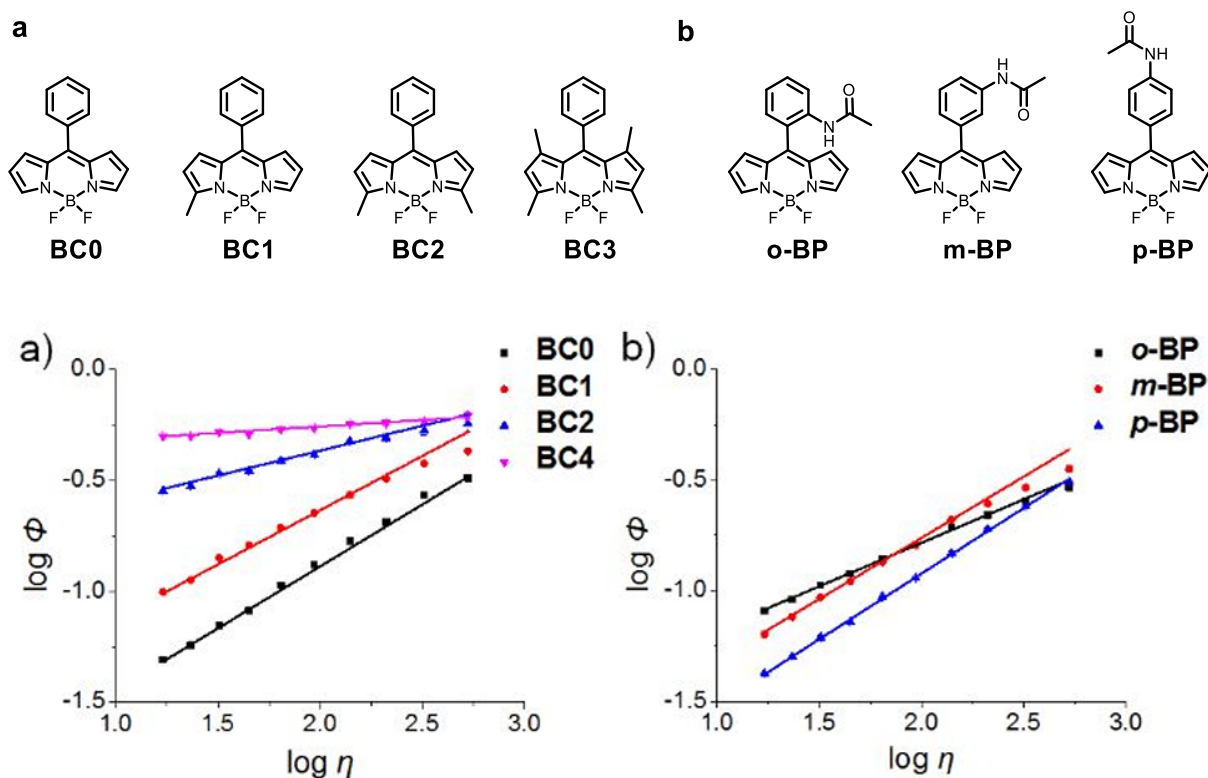


Figura 1.13 Relación entre rendimiento cuántico y viscosidad para BODIPYs meso sustituido con distintos grados de sustitución. Figura tomada de referencia 42.

En esta tesis se abordarán dos tipos de fluoróforos sensibles al entorno: fluoróforos solvatocrómicos que presentan una emisión dual en los que ocurre una reacción de transferencia de protón y de carga en el estado excitado (ESIPT y ESICT) y rotores moleculares en los que los cambios en sus propiedades de fluorescencia responden más a la viscosidad del entorno que con la polaridad de este.

1.3. Objetivos de la tesis

Como se describió en la sección 1.1.1 el HTS es una de las herramientas fundamentales para identificar pequeñas moléculas capaces de modular la actividad biológica frente a blancos terapéuticos específicos. El objetivo de este trabajo es desarrollar un método de fluorescencia que sea aplicable en HTS, que sea robusto, reproducible, confiable y aplicable a sistemas proteicos no enzimáticos.

En el capítulo 2 se abordará la síntesis de sondas fluorescentes específicas para las proteínas Anhidrasa Carbónica humana II y la proteína de unión a ácidos grasos 2. Se explorarán distintas alternativas para la

síntesis de los fluoróforos, utilizando tanto las vías clásicas como algunas implementaciones recientes de síntesis. Posteriormente, se mostrará la funcionalización de ligandos específicos de la proteína Anhidrasa Carbónica humana II para generar las sondas específicas. Finalmente, se tratará el acoplamiento entre los fluoróforos y los ligandos para crear las sondas fluorescentes.

En el capítulo 3 se describirán los materiales y métodos utilizados para llevar a cabo las determinaciones experimentales y las simulaciones computacionales que se presentan a lo largo de esta tesis.

En el capítulo 4 se presentará la metodología empleada para realizar las determinaciones de unión ligando-proteína y el desplazamiento por ligandos competitivos. Esta metodología será contrastada y validada con datos previamente reportados para el sistema proteico albúmina sérica humana, para luego ser aplicada a la Anhidrasa Carbónica humana II y la proteína de unión a ácidos grasos 2. Se realizarán análisis estructurales a partir de simulaciones computacionales.

Finalmente, el capítulo 5 abordará la problemática en la definición del radio de Onsager para calcular momentos dipolares en 3-hidroxicromonas que presentan transferencias de cargas con geometrías no lineales. Se utilizará un enfoque computacional para obtener información estructural y electrónica que explique los comportamientos experimentales observados.

1.4. Referencias

1. Singh N, Vayer P, Tanwar S, Poyet J-L, Tsaïoun K, Villoutreix BO. Drug discovery and development: introduction to the general public and patient groups. *Frontiers in Drug Discovery*. 2023;3.
2. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2004;1(4):337.
3. Janzen William P. Screening Technologies for Small Molecule Discovery: The State of the Art. *Chemistry & Biology*. 2014;21(9):1162.
4. Broach JR, Thorner J. High-throughput screening for drug discovery. *Nature*. 1996;384(6604):14.
5. Grygorenko OO. Enamine Ltd.: The Science and Business of Organic Chemistry and Beyond. *Eur J Org Chem*. 2021;2021(47):6474.

6. Sittampalam GS, Kahl SD, Janzen WP. High-throughput screening: advances in assay technologies. *Curr Opin Chem Biol.* 1997;1(3):384.
7. Fang X, Zheng Y, Duan Y, Liu Y, Zhong W. Recent Advances in Design of Fluorescence-Based Assays for High-Throughput Screening. *Anal Chem.* 2019;91(1):482.
8. Ranallo S, Rossetti M, Plaxco KW, Vallée-Bélisle A, Ricci F. A Modular, DNA-Based Beacon for Single-Step Fluorescence Detection of Antibodies and Other Proteins. *Angew Chem Int Ed.* 2015;54(45):13214.
9. Zheng XT, Ananthanarayanan A, Luo KQ, Chen P. Glowing Graphene Quantum Dots and Carbon Dots: Properties, Syntheses, and Biological Applications. *Small.* 2015;11(14):1620.
10. Gu W, Yan Y, Pei X, Zhang C, Ding C, Xian Y. Fluorescent black phosphorus quantum dots as label-free sensing probes for evaluation of acetylcholinesterase activity. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2017;250:601.
11. Maity D. Selected peptide-based fluorescent probes for biological applications. *Beilstein Journal of Organic Chemistry.* 2020;16:2971.
12. Klymchenko AS. Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications. *Acc Chem Res.* 2017;50(2):366.
13. Chen Y, Jiang H, Hao T, Zhang N, Li M, Wang X, et al. Fluorogenic Reactions in Chemical Biology: Seeing Chemistry in Cells. *Chemical & Biomedical Imaging.* 2023;1(7):590.
14. Wang Y, Li J, Feng L, Yu J, Zhang Y, Ye D, et al. Lysosome-Targeting Fluorogenic Probe for Cathepsin B Imaging in Living Cells. *Anal Chem.* 2016;88(24):12403.
15. Singh H, Tiwari K, Tiwari R, Pramanik SK, Das A. Small Molecule as Fluorescent Probes for Monitoring Intracellular Enzymatic Transformations. *Chem Rev.* 2019;119(22):11718.
16. Loving GS, Sainlos M, Imperiali B. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. *Trends Biotechnol.* 2010;28(2):73.

17. Zhuang Y-D, Chiang P-Y, Wang C-W, Tan K-T. Environment-Sensitive Fluorescent Turn-On Probes Targeting Hydrophobic Ligand-Binding Domains for Selective Protein Detection. *Angew Chem Int Ed*. 2013;52(31):8124.
18. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. NY: Springer New York; 2006.
19. Giordano L, Shvadchak VV, Fauerbach JA, Jares-Erijman EA, Jovin TM. Highly Solvatochromic 7-Aryl-3-hydroxychromones. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2012;3(8):1011.
20. Biradar DS, Siddlingeshwar B, Hanagodimath SM. Estimation of ground and excited state dipole moments of some laser dyes. *J Mol Struct*. 2008;875(1):108.
21. Kawski A, Bojarski P, Kukliński B. Estimation of ground- and excited-state dipole moments of Nile Red dye from solvatochromic effect on absorption and fluorescence spectra. *Chem Phys Lett*. 2008;463(4):410.
22. Pandey N, Gahlaut R, Arora P, Joshi NK, Joshi HC, Pant S. Study of dipole moments of some coumarin derivatives. *J Mol Struct*. 2014;1061:175.
23. Chou PT, Huang CH, Pu SC, Cheng YM, Liu YH, Wang Y, et al. Tuning excited-state charge/proton transfer coupled reaction via the dipolar functionality. *J Phys Chem A*. 2004;108(31):6452.
24. Klymchenko AS, Mely Y. Chapter Two - Fluorescent Environment-Sensitive Dyes as Reporters of Biomolecular Interactions. In: Morris MC, editor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 113: Academic Press; 2013. p. 35.
25. Demchenko AP. *Introduction to Fluorescence Sensing*. Switzerland: Springer Cham; 2020.
26. Sengupta PK, Kasha M. Excited state proton-transfer spectroscopy of 3-hydroxyflavone and quercetin. *Chem Phys Lett*. 1979;68(2):382.
27. Zhao J, Ji S, Chen Y, Guo H, Yang P. Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT): from principal photophysics to the development of new chromophores and applications in fluorescent molecular probes and luminescent materials. *Phys Chem Chem Phys*. 2012;14(25):8803.

28. Demchenko AP, Tang K-C, Chou P-T. Excited-state proton coupled charge transfer modulated by molecular structure and media polarization. *Chem Soc Rev.* 2013;42(3):1379.
29. Demchenko AP. Proton transfer reactions: From photochemistry to biochemistry and bioenergetics. *BBA Advances.* 2023;3:100085.
30. Tang KC, Chang MJ, Lin TY, Pan HA, Fang TC, Chen KY, et al. Fine tuning the energetics of excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT): white light generation in a single ESIPT system. *J Am Chem Soc.* 2011;133(44):17738.
31. Rotkiewicz K, Grellmann KH, Grabowski ZR. Reinterpretation of the anomalous fluorescence of p-n,n-dimethylamino-benzonitrile. *Chem Phys Lett.* 1973;19(3):315.
32. Lee S-C, Heo J, Woo HC, Lee J-A, Seo YH, Lee C-L, et al. Fluorescent Molecular Rotors for Viscosity Sensors. *Chemistry – A European Journal.* 2018;24(52):13706.
33. Haidekker MA, Theodorakis EA. Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors. *Journal of Biological Engineering.* 2010;4(1):11.
34. Loutfy RO, Teegarden DM. Effect of polymer chain tacticity on the fluorescence of molecular rotors. *Macromolecules.* 1983;16(3):452.
35. Doolittle AK. Studies in Newtonian Flow. II. The Dependence of the Viscosity of Liquids on Free-Space. *J Appl Phys.* 1951;22(12):1471.
36. Loutfy RO, Arnold BA. Effect of viscosity and temperature on torsional relaxation of molecular rotors. *The Journal of Physical Chemistry.* 1982;86(21):4205.
37. Hinkeldey B, Schmitt A, Jung G. Comparative Photostability Studies of BODIPY and Fluorescein Dyes by Using Fluorescence Correlation Spectroscopy. *ChemPhysChem.* 2008;9(14):2019.
38. Loudet A, Burgess K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem Rev.* 2007;107(11):4891.
39. Kee HL, Kirmaier C, Yu L, Thamyongkit P, Youngblood WJ, Calder ME, et al. Structural Control of the Photodynamics of Boron–Dipyrrin Complexes. *The Journal of Physical Chemistry B.* 2005;109(43):20433.

40. Liu X, Chi W, Qiao Q, Kokate SV, Cabrera EP, Xu Z, et al. Molecular Mechanism of Viscosity Sensitivity in BODIPY Rotors and Application to Motion-Based Fluorescent Sensors. *ACS Sensors*. 2020;5(3):731.
41. Prlj A, Vannay L, Corminboeuf C. Fluorescence Quenching in BODIPY Dyes: The Role of Intramolecular Interactions and Charge Transfer. *Helv Chim Acta*. 2017;100(6):e1700093.
42. Vyšniauskas A, López-Duarte I, Duchemin N, Vu T-T, Wu Y, Budynina EM, et al. Exploring viscosity, polarity and temperature sensitivity of BODIPY-based molecular rotors. *Phys Chem Chem Phys*. 2017;19(37):25252.
43. Kuimova MK, Yahioğlu G, Levitt JA, Sühling K. Molecular Rotor Measures Viscosity of Live Cells via Fluorescence Lifetime Imaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(21):6672.
44. Chambers JE, Kubánková M, Huber RG, López-Duarte I, Avezov E, Bond PJ, et al. An Optical Technique for Mapping Microviscosity Dynamics in Cellular Organelles. *ACS Nano*. 2018;12(5):4398.
45. Vodyanova OS, Kochergin BA, Usoltsev SD, Marfin YS, Rummyantsev EV, Aleksakhina EL, et al. BODIPY dyes in bio environment: Spectral characteristics and possibilities for practical application. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2018;350:44.
46. Paez-Perez M, Kuimova MK. Molecular Rotors: Fluorescent Sensors for Microviscosity and Conformation of Biomolecules. *Angew Chem Int Ed*. 2024;63(6):e202311233.

Capítulo 2

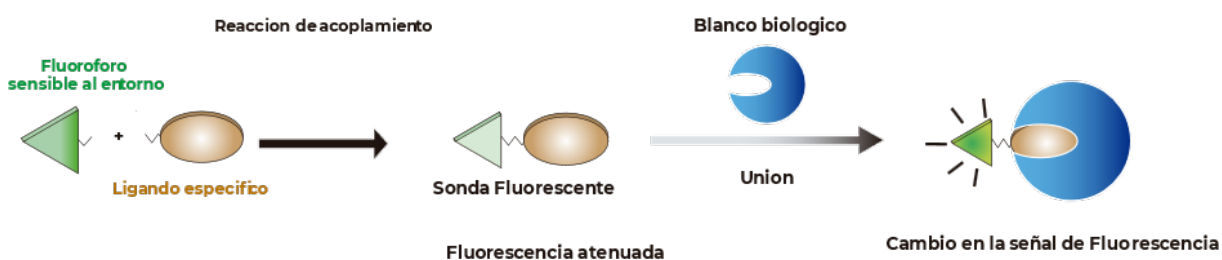
Síntesis de sondas

fluorescentes

sensibles al entorno

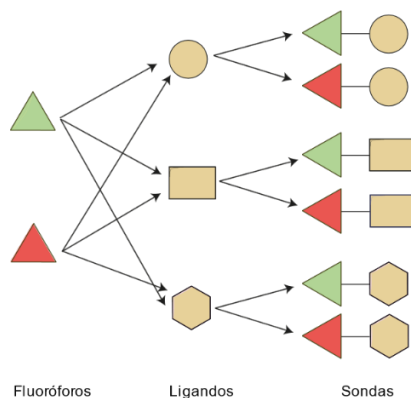
2.1. Diseño de sondas fluorescentes

Las sondas fluorescentes que se presentan a lo largo de esta tesis se encuentran formadas a partir de dos fragmentos unidos por un espaciador: un ligando específico del sistema biológico de interés y un fluoróforo sensible al entorno (Esquema 2.1). Este último es responsable de los cambios en la señal de fluorescencia cuando la sonda interactúa con el sistema a estudiar. Es importante que el espaciador que une al fluoróforo y al ligando sea lo más corto posible, para evitar que el primero quede expuesto a la solución acuosa y su respuesta de fluorescencia se vea mitigada.



Esquema 2.1. Síntesis de sondas y funcionamiento.

Se adopta un esquema de síntesis modular que permite emplear el mismo tipo de reacción de acoplamiento para generar sondas selectivas para varios sistemas biológicos utilizando un mismo fluoróforo, así como diversas sondas para un mismo sistema biológico variando el fluoróforo (Esquema 2.2). De esta manera se logra información diferente del evento de unión con cada sonda. La ventaja de este enfoque radica en la obtención de una diversidad de sondas, sin necesidad de desarrollar protocolos de reacción específicos para cada caso, lo que permite la sistematización de la metodología.



Esquema 2.2. Síntesis modular.

Para conectar los fragmentos (ligando y fluoróforo) se selecciona una reacción que sea compatible con la naturaleza de ambos y sea lo más amplia posible. Existen dos grupos de reacciones que suelen utilizarse ampliamente para este tipo de sondas: Reacciones que involucran la formación de un enlace peptídico, o reacciones de acoplamiento carbono-carbono. El uso de reacciones de formación de enlaces peptídicos suele modificar la estructura electrónica de los fluoróforos, por introducción de un grupo amino o amida directamente sobre el anillo aromático de estos.¹⁻³ Por otro lado, los espaciadores que se generan suelen ser considerablemente largos y un motivo adicional para no usar este tipo de reacción, radica en que el oxidrilo de posición 3 de las 3HCs es reactivo y puede reaccionar bajo las condiciones de acoplamiento peptídico utilizadas comúnmente. Es por estos motivos que se descarta la formación de enlaces peptídicos para acoplar directamente los fragmentos de la sonda.

Existe una amplia variedad de reacciones de acoplamiento carbono-carbono siendo las más comunes las representadas en la figura 2.1. La selección de la reacción utilizada se basa en un balance entre la disponibilidad de los reactivos, y la funcionalidad del producto. Por un lado, la reacción de Suzuki requiere el uso de ácidos borónicos que suelen ser sustratos costosos y poco comunes de encontrar en los drogueros. Lo mismo ocurre con las reacciones de Stille y Hiyama que usan sustratos basados en silicatos y complejo de estaño. Es por este motivo por lo que se descarta su uso. Por otro lado, la reacción de Heck es una alternativa viable sintéticamente, sin embargo, introduce un doble enlace en la sonda que podría reaccionar en el sitio de unión de la proteína. Mientras que, la reacción de Sonogashira, que consiste en acoplar un carbono sp terminal (alquino) y un sp^2 de un halogenuro de arilo (o vinilo), presenta varias ventajas. Los sustratos usados son accesibles tanto sintéticamente como comercialmente. Además, la inserción de un triple enlace no modifica apreciablemente las propiedades de fluorescencia de los fluoróforos y no presentan altas reactividades en entornos proteicos.

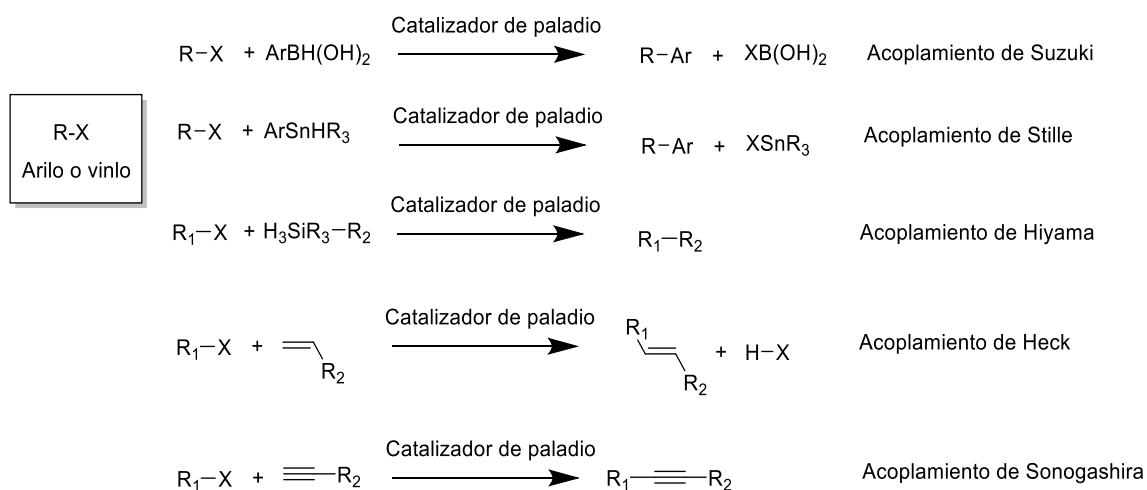


Figura 2.1 Reacciones de acoplamiento carbono-carbono catalizadas por paladio más comunes.

De esta manera, se propone la obtención de los fluoróforos halogenados, mientras se buscan ligandos que contengan un grupo alquino terminal. Esto está en línea con la sistemática planteada, ya que es compatible con la síntesis modular, hay disponibilidad de ligandos comerciales con grupos alquino terminal, y en ambas familias de fluoróforos se puede introducir un halogenuro de ariilo en regiones que no afectan significativamente sus propiedades de fluorescencia.

2.2. Síntesis de Fluoróforos

2.2.1. Síntesis de BODIPYs

La química de los pirroles para obtener BODIPYs es una consecuencia del extenso estudio en la síntesis de porfirinas, desarrollada durante el siglo pasado. Treibs y Kreuzer⁴, en 1968, fueron los primeros en poner el foco sobre estas moléculas fluorescentes. Si bien los autores no diseñaron una síntesis específica para su obtención, decidieron estudiar los entonces desconocidos BODIPYs que se formaban como complejos estables borados durante la acetilación de 2,4-dimetilpirrol en anhídrido acético a reflujo con trifluoruro de boro eterato (Figura 2.2).

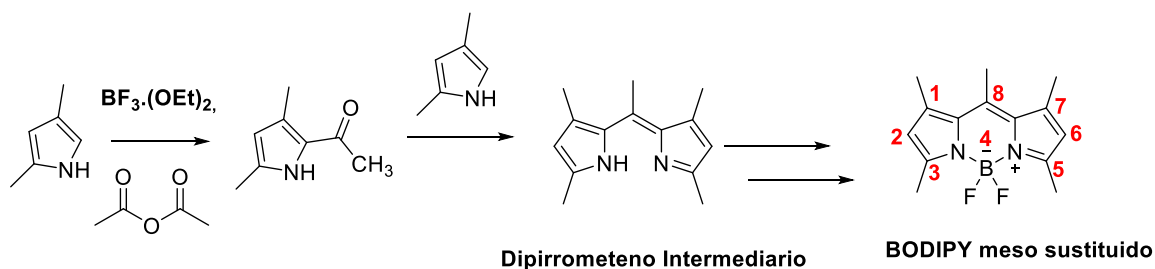


Figura 2.2 Reacción de Treibs y Kreuzer, BODIPYs como subproducto.

Una de las claves para obtener BODIPYs radica en el grado de sustitución del pirrol, puesto que, si la posición 2 y 5 se encuentran libres, la condensación se puede dar por ambos sitios, y se obtendrían compuestos porfirínicos.⁵

Actualmente, la síntesis de BODIPYs meso sustituidos (sustituidos en posición 8) conserva la misma lógica mostrada por Treibs y Kreuzer en su trabajo original. Esto implica realizar la condensación de dos moles de pirrol con moléculas que tengan un grupo acilo, ya sea derivados de ácido como los cloruros⁶ o anhídridos de ácido⁷ (Figura 2.3.a) o a partir de aldehídos (Figura 2.3.b). Posteriormente, el dipirrometeno resultante se compleja con trifluoruro de boro para obtener el BODIPY deseado.

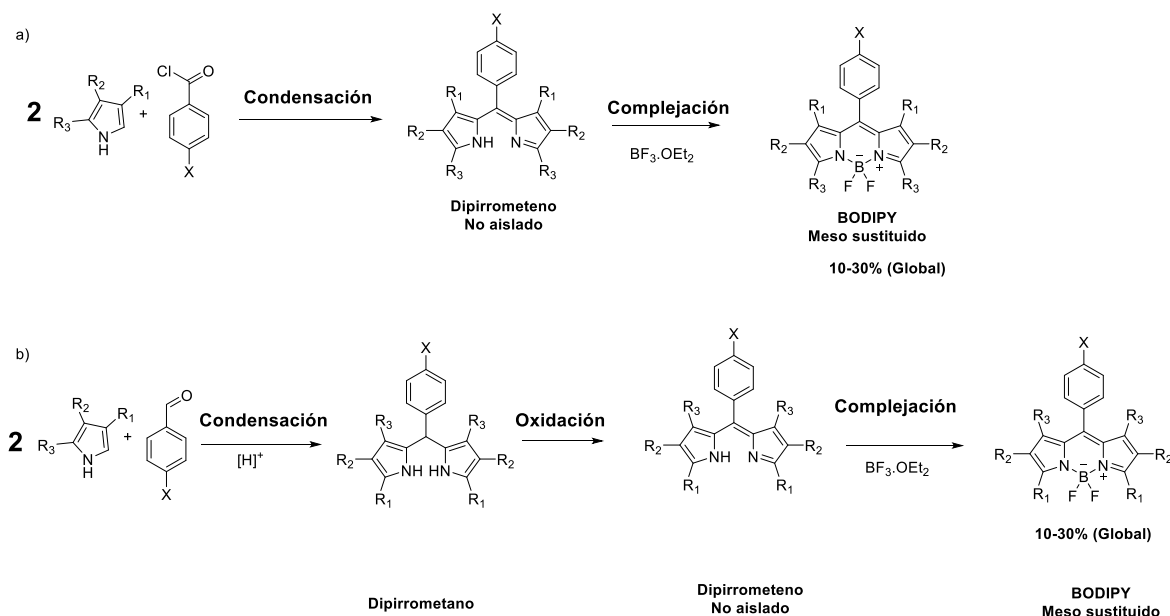


Figura 2.3. Esquema sintético de BODIPY a) partiendo de cloruro de ácido. b) partiendo de aldehído.

La ruta más corta y sencilla para la obtención de BODIPYs implica una reacción de condensación de un cloruro de ácido con dos equivalentes del pirrol. Esto da lugar a un intermediario inestable, el dipirrometeno, que es

complejado sin purificar con boro para obtener el BODIPY meso sustituido final, con rendimientos que suelen oscilar entre un 20 y 30 %.

De manera similar, pero añadiendo un paso oxidativo, estas moléculas se pueden obtener a partir de aldehídos aromáticos utilizando catálisis ácida. La condensación del aldehído con dos equivalentes de pirrol produce un dipirrometano, que se oxida (habitualmente con *p*-cloroanil o DDQ) para formar un dipirrometeno. La adición del paso oxidativo introduce complicaciones experimentales debido a los subproductos que pueden formarse a partir del agente oxidante, por lo que es habitual purificar el dipirrometeno antes de realizar el paso final de complejación para obtener de un crudo más limpio.⁸

2.2.1.1. Síntesis de Br-BDP (1)

La ruta sintética comienza con la condensación de dos equivalentes del 2,4-dimetil-3-etilpirrol con uno del 4-bromobenzaldehído y gotas de ácido trifluoroacético (catálisis ácida). Una vez comprobada mediante CCD la desaparición del pirrol y la obtención de una nueva mancha rosa, se avanza con la etapa oxidativa, en la que habitualmente se usa *p*-cloroanil como agente oxidante. Cuando la mancha rosa desaparece de la CCD, se pueden tomar dos caminos: purificar el dipirrometeno intermediario o continuar con el paso complejación sin purificar (condición "one-pot"). El primer enfoque tiene la ventaja de que se eliminan los subproductos que se generan en la etapa oxidativa. El paso de complejación del dipirrometeno se realiza con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ durante toda la noche. El producto es purificado por cromatografía flash líquida, y precipitado en éter etílico. El rendimiento es de un 25% global, respecto al aldehído.

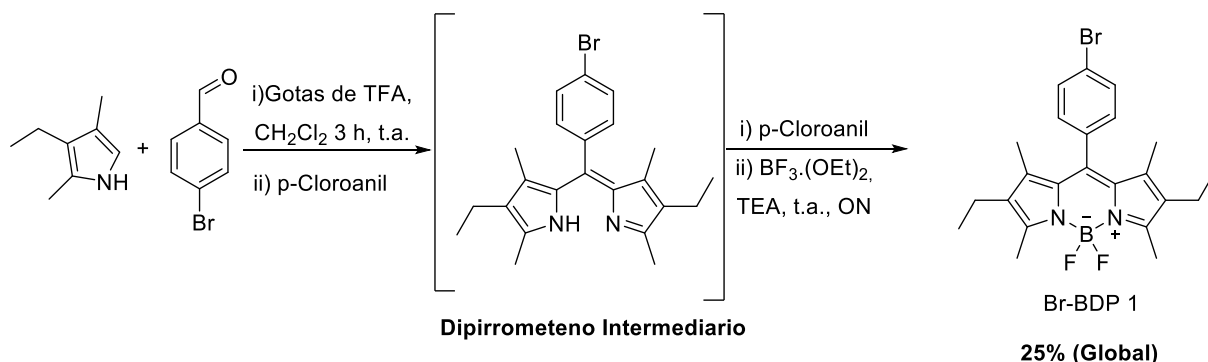


Figura 2.4. Síntesis del **Br-BDP 1** vía condensación de aldehído.

Se llevaron a cabo ambos enfoques de síntesis, es decir, con y sin purificación del intermediario dipirrometeno. Se observó que la purificación del intermediario no mejora los rendimientos, que rondan un 25% global y adiciona complicaciones experimentales. Dado que la purificación por cromatografía en columna utilizando sílica en fase normal presenta un marcado sangrado del dipirrometeno debido a su alta polaridad lo que resulta en una baja eficiencia de purificación, y un elevado consumo de solvente. Por lo tanto, en las síntesis posteriores se optó por el enfoque “one-pot”, metodología que está habitualmente reportada en bibliografía.^{9,10,11}

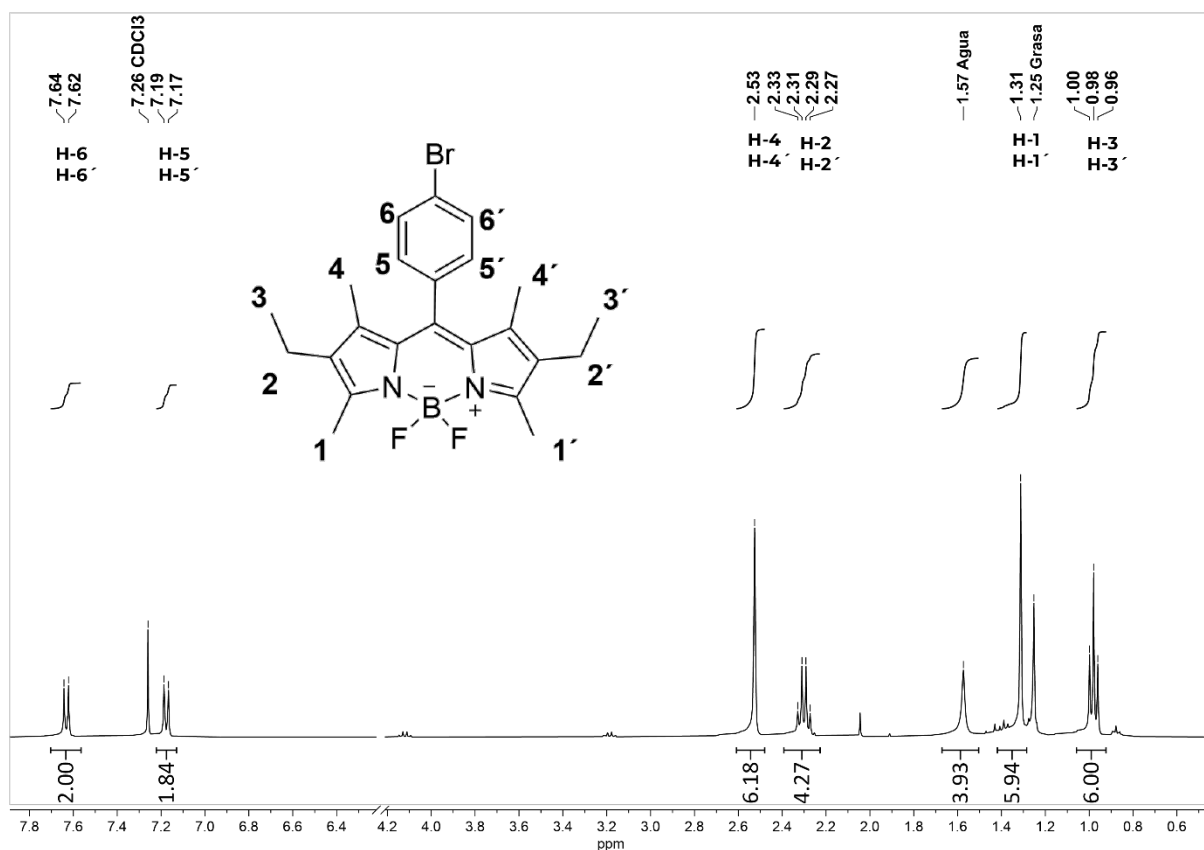


Figura 2.5. RMN ¹H (CDCl₃, 500MHz) del Br-BDP 1.

El espectro de RMN ¹H (Figura 2.5) muestra un patrón de desplazamientos alifáticos, típico para el cuerpo del BODIPY, de dos singletes de seis núcleos correspondientes a los metilos CH₃ (H-1/1') y (H-4/4') a desplazamientos de 1,31 y 2,53 ppm, respectivamente. Además, un triplete de seis núcleos, a δ 0,98 ppm correspondiente a dos metilos CH₃ (H-3/3'), que acoplan con un cuarteto de cuatro núcleos de dos metilenos CH₂ a δ 2,30 ppm (H-2/2') con una constante de acoplamiento de 7,6 Hz característico de compuestos alifáticos. Finalmente, se observan dos

dobletes que integran a dos protones cada uno en la zona de los protones aromáticos a δ 7,62 y 7,18 ppm correspondientes a los hidrógenos H-5/5' y H-6/6' concordante con un patrón de sustitución en *para*.

2.2.1.2. Síntesis de I-BDP (2)

La otra ruta explorada corresponde a la condensación de dos moléculas de pirrol con un cloruro de ácido (Figura 2.6). Esta reacción también se lleva a cabo en un esquema "one-pot", y consta de un paso menos que la ruta de la condensación del aldehído, puesto que se parte de un reactivo con un estado de oxidación superior y se obtiene directamente el dipirrometeno intermediario, que es inestable, y no se aísla.

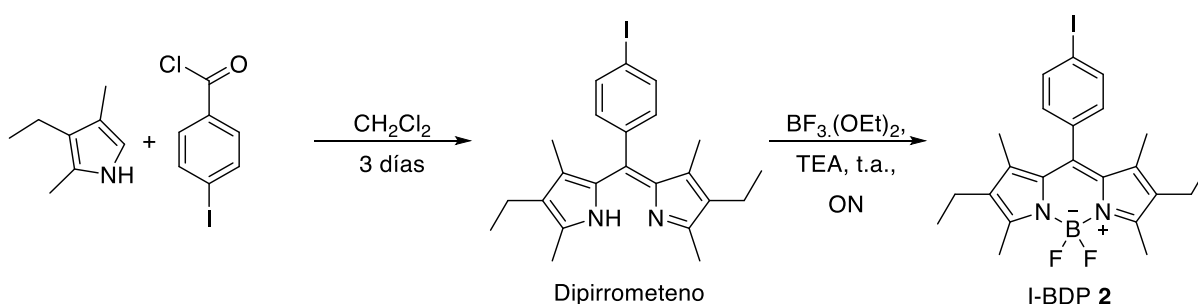


Figura 2.6. Síntesis del compuesto I-BDP 2.

La mayoría de los reportes en literatura parten del cloruro de ácido comercial. Es por esto por lo que se decide explorar también la síntesis del cloruro de ácido, puesto que es menos frecuente encontrar estos derivados en los drogueros.

Se sintetiza el cloruro de ácido correspondiente a partir del ácido 4-iodobenzoico, gotas de DMF y cloruro de tionilo (SOCl_2) usado como solvente a reflujo. Alternativamente, se puede seguir el mismo procedimiento, pero utilizando como agente clorante al cloruro de oxalilo ($\text{C}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$) en diclorometano (DCM) a temperatura ambiente (Figura 2.7). La cloración ocurre vía formación del reactivo de Vilsmeier, **4**. En el primer caso el exceso de cloruro de tionilo se remueve por destilación al vacío, obteniéndose un sólido amarillo pálido. En el segundo caso, el cloruro de oxalilo se remueve directamente por evaporación del crudo en evaporador rotatorio y se obtiene un sólido de las mismas características. El producto en ambos casos es lavado con tolueno y filtrado por un embudo (o lecho) de celite. Los rendimientos fueron 80% usando cloruro de tionilo y 88% usando cloruro de oxalilo.

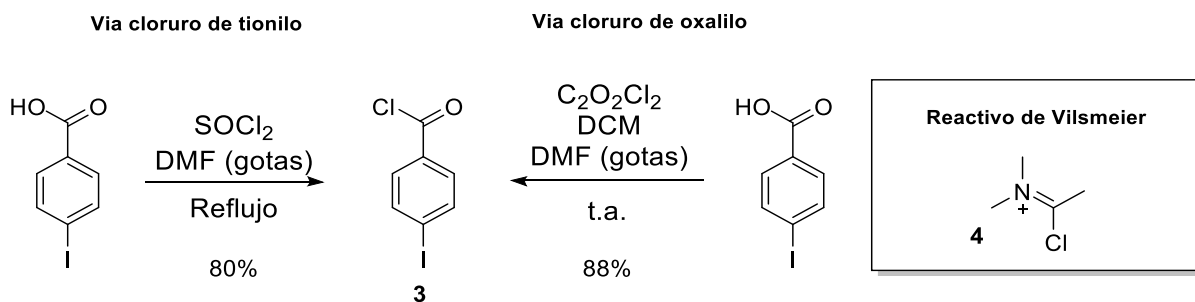


Figura 2.7. Síntesis de cloruro de ácido 4-iodobenzoico (**3**).

El cloruro de ácido obtenido por la vía del cloruro de tionilo se hace reaccionar directamente con el pirrol, sin purificación adicional. Los rendimientos de síntesis del producto I-BDP resultan muy bajos (< 5%), y se obtiene dos subproductos adicionales (Figura 2.8, compuestos **5** y **6**). Uno de los subproductos muestra una fluorescencia similar al producto buscado (**5**), mientras que el otro no es fluorescente (**6**), aunque se observa una alta intensidad bajo la luz UV en la CCD. Los rendimientos para ambos subproductos no fueron determinados.

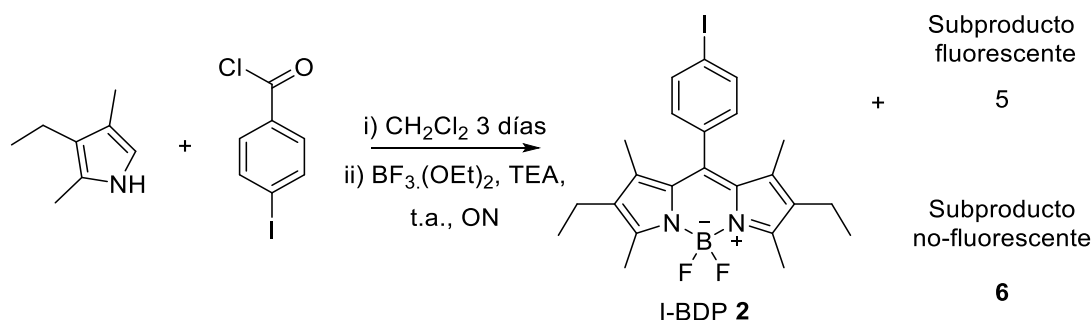


Figura 2.8. Obtención del I-BDP 2 y sus subproductos 5 y 6.

La ruta de síntesis usando el cloruro de ácido obtenido con cloruro de oxalilo es considerablemente más limpia, sin embargo, los rendimientos son similares a los obtenidos con el cloruro de ácido obtenido por la vía del SOCl_2 y si se obtienen los mismos subproductos que en la vía anterior.

Finalmente, al realizar la síntesis del BODIPY usando el cloruro de ácido comercial se obtiene 30% de rendimiento, acorde a los rendimientos reportados en bibliografía.¹² El espectro de RMN ^1H (Figura 2.9) muestra el mismo patrón de desplazamientos que el **Br-BDP**, aunque las señales aromáticas se acercan entre sí (Figura 2.5).

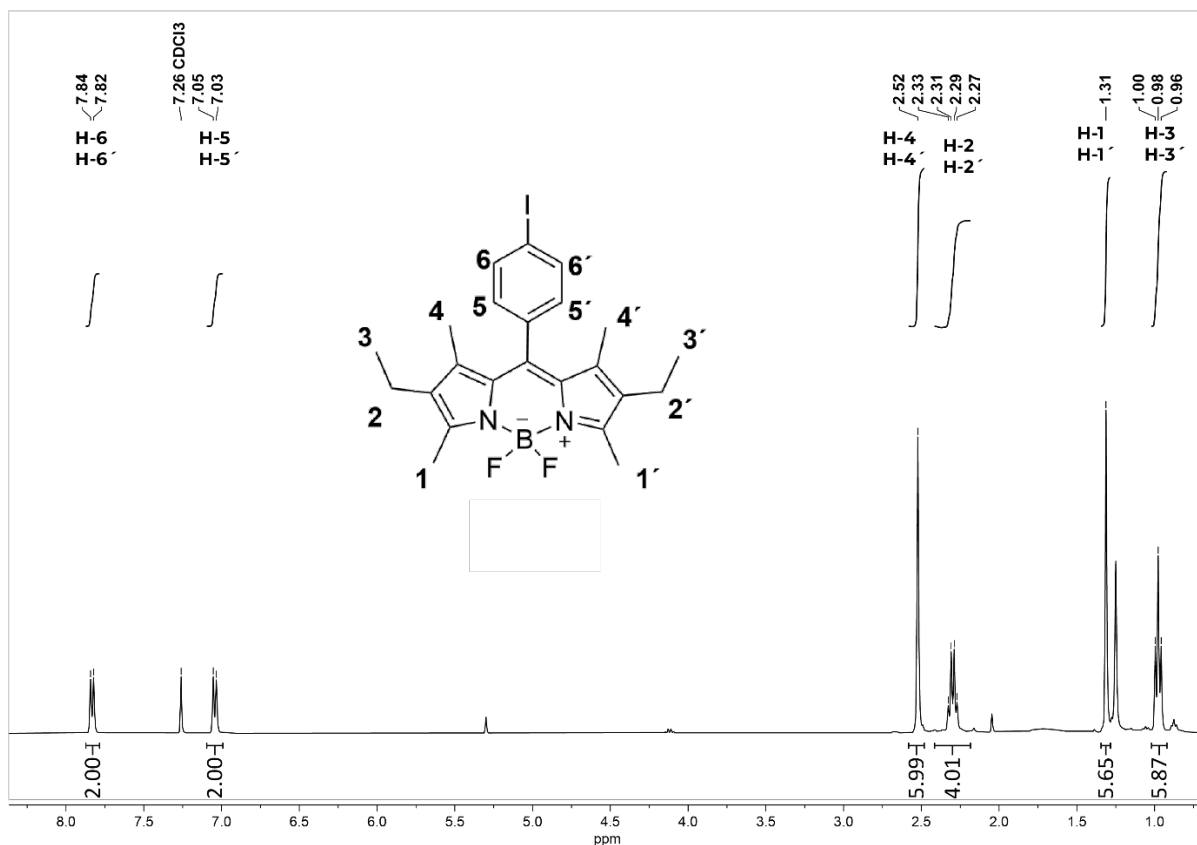


Figura 2.9. RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz) del I-BDP **2**.

Para determinar la identidad de los subproductos (**5** y **6**) se los analiza por RMN. Para el subproducto fluorescente **5** se espera que su estructura molecular contenga un motivo similar al del producto buscado (BODIPY) puesto que muestra una fluorescencia similar. En el espectro de RMN ^1H (Figura 2.10) se observa el mismo patrón de desplazamientos alifático, del BODIPY mostrado en las figuras 2.8 y 2.9. Por otro lado, no se observan los 4 protones aromáticos correspondientes al anillo situado en la posición meso del producto **I-BDP** (**2**). Mientras que, se observa un singlete en 6,94 ppm que integra para un hidrógeno. De esta manera, se propone que el espectro de RMN puede ser asignado un BODIPY no sustituido en meso (**H-BDP**),

coincidiendo su espectro y desplazamientos con los reportados en bibliografía para esta molécula.¹³

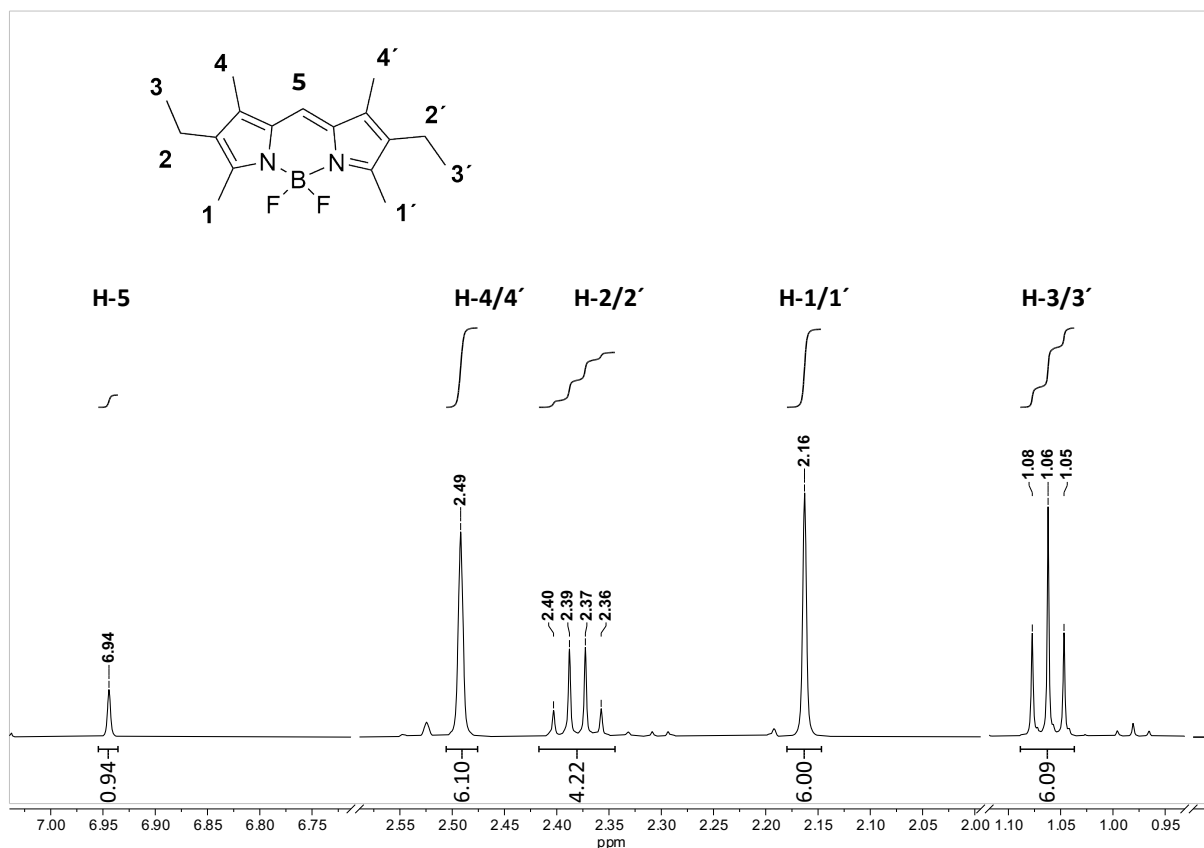


Figura 2.10. RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz) del compuesto **5**.

En el espectro de RMN ^1H del producto **6** (Figura 2.11) se puede identificar un patrón de señales en la zona alifática a dos singletes de los metilos CH_3 H-1 y H-4 a 1,91 ppm y 2,25 ppm, y un metilo acoplado a un metileno correspondiente al residuo etilo (CH_3 a 1,05 ppm y CH_2 en 2,38 ppm). Además, se observan dos dobletes en la zona de los protones aromáticos a δ 7,80 y 7,36 ppm correspondientes a los hidrógenos H-5/5' y H-6/6' con patrón de sustitución en *para*. Estas señales se encuentran en una relación de integración 1:1 respecto de los protones alifáticos por lo que se deduce que existe una sola unidad pirrólica respecto a una unidad aromática, y no dos como se esperaría en un BODIPY. Se propone que el subproducto **6** obtenido es el producto de la condensación de solo un equivalente de pirrol con el derivado de ácido, para dar la cetona correspondiente. Los desplazamientos observados coinciden con los reportados en bibliografía y existen reportes en los que se determina que este tipo de cetonas pueden obtenerse como subproductos de manera basal al utilizar esta ruta de síntesis.¹⁴



Figura 2.11. RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz) del compuesto **6**.

Como resultado del análisis de los espectros, podemos concluir que los subproductos son el BODIPY sin sustituir en la posición meso (**H-BDP**), y el intermediario correspondiente a la condensación con un solo equivalente de pirrol (Figura 2.12).

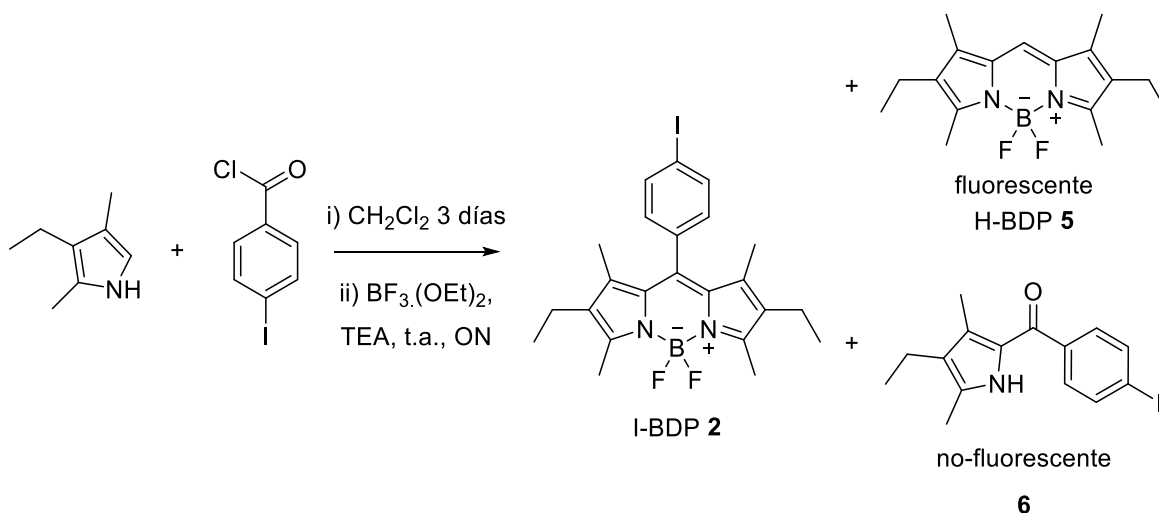


Figura 2.12. Síntesis de **I-BDP 2** con sus subproductos identificados.

La presencia del subproducto **H-BDP** es mencionada en el trabajo de Sobral.¹³ Los autores mencionan que se obtiene un porcentaje pequeño (5%)

de este compuesto y que su formación se encuentra asociada al uso de diclorometano como solvente. En nuestro caso no fue posible determinar un rendimiento cuantitativo de cada subproducto, por lo que se decidió repetir la síntesis para determinar si la cantidad obtenida es la basal. Para eso, se utilizó el cloruro de ácido sintetizado en el laboratorio (**3**) y 2,4-dimetilpirrol, debido a la mayor disponibilidad de este pirrol respecto al 2,4-dimetil-3-etilpirrol (Figura 2.13).

Al realizar esta síntesis se observa el mismo comportamiento que con **I-BDP 2**, obteniéndose un rendimiento de 6 % del **I-BDP 7**, 20 % del subproducto fluorescente (**H-BDP 8**) y 4 % del subproducto no fluorescente (**9**). Para el caso del **H-BDP 8**, el rendimiento es 4 veces mayor al 5% que se obtiene basalmente según lo reportado por Sobral. De esta manera se puede concluir que no es el diclorometano usado como solvente el que induce la formación del subproducto **H-BDP (5 y 8)**.

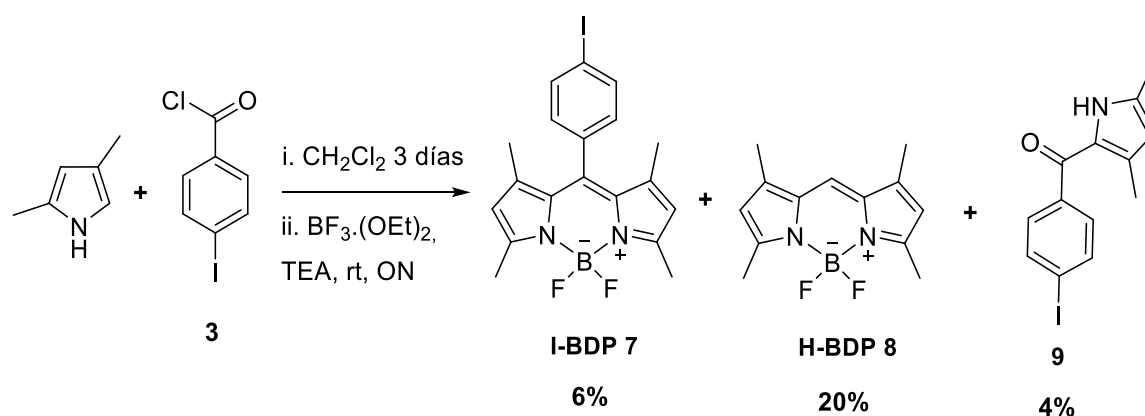


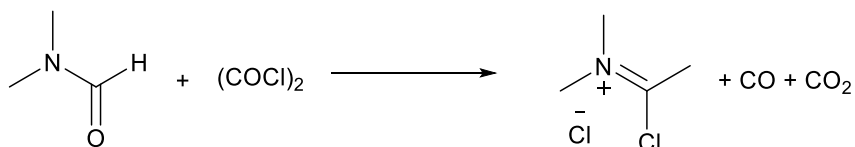
Figura 2.13. Síntesis de **I-BDP 7** con sus subproductos identificados.

Si por otro lado consideramos que, en la síntesis con el cloruro de ácido comercial, este comportamiento no se replica, se propone que, en la síntesis del cloruro de ácido, se introduce una especie que propicia la obtención de los subproductos **5** y **8** por sobre la de los **I-BDP 2** y **7**. Por otro lado, la presencia del intermediario mono sustituido en cantidades comparables respecto al producto buscado, nos indica la falta de disponibilidad de pirrol en la mezcla de reacción para producir el segundo ataque que da lugar al dipirrometeno intermediario.

Tras una investigación bibliográfica, se encuentra que Warashina y colaboradores¹⁵ reportan al reactivo de Vilsmeier como un formilador regioselectivo para la posición 2 en pirroles (Figura 2.14.b). En el trabajo citado, el reactivo se obtiene como un sólido blanco, mezclando DMF con

cloruro de oxalilo/tionilo a temperatura ambiente (Figura 2.14, a). Reportes similares se encuentran en la literatura clásica asociada a la química de los pirroles y porfirinas.⁵ Estas condiciones son similares a las usadas en la síntesis para el cloruro de ácido (Figura 2.7).

a) Formación reactivo de Vilsmeier



Reactivo de Vilsmeier
(Sólido blanco)

b) Formilación regioselectiva del pirrol a partir del reactivo de Vilsmeier publicada por Warashina

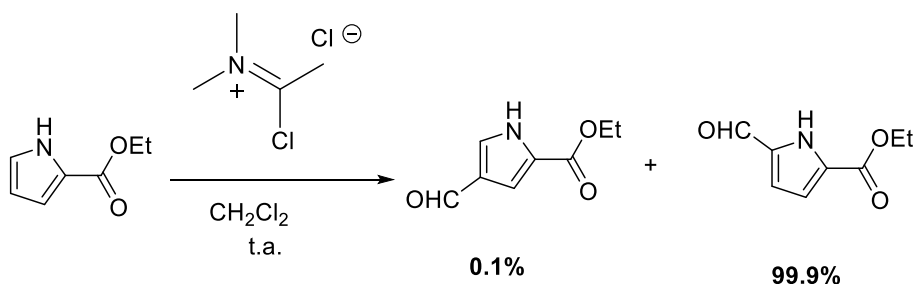


Figura 2.14. a) Formación del reactivo de Vilsmeier. B) Formilación regioselectiva de pirroles reportada por Sobral.

Por otro lado, Burgess¹⁶ reporta en 2008 la síntesis de BODIPYS no sustituidos en la posición meso (similares a **H-BDP**) a partir de pirroles formilados (Figura 2.15), y demuestra que la reacción es catalizada por la presencia de reactivos del tipo Vilsmeier dando rendimientos superiores a 90%.

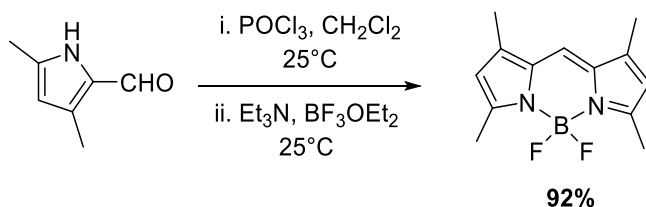


Figura 2.15. Síntesis de BODIPYS no sustituidos a partir de pirroles formilados propuesta por Burgess.¹⁶

De esta manera, se postula que, al realizar la síntesis de cloruro de ácido, se genera el reactivo de Vilsmeier que induce la formilación del pirrol y subsiguiente formación del **H-BDP**. Esta hipótesis es confirmada por el

hecho de que se forma más **H-BDP** que lo esperado (observación en concordancia con el trabajo de Burgess), y la presencia del intermediario monosustituido (**6 y 9**), refuerza la idea de que el pirrol es consumido por una vía alternativa a la del **I-BDP** (Figura 2.16).

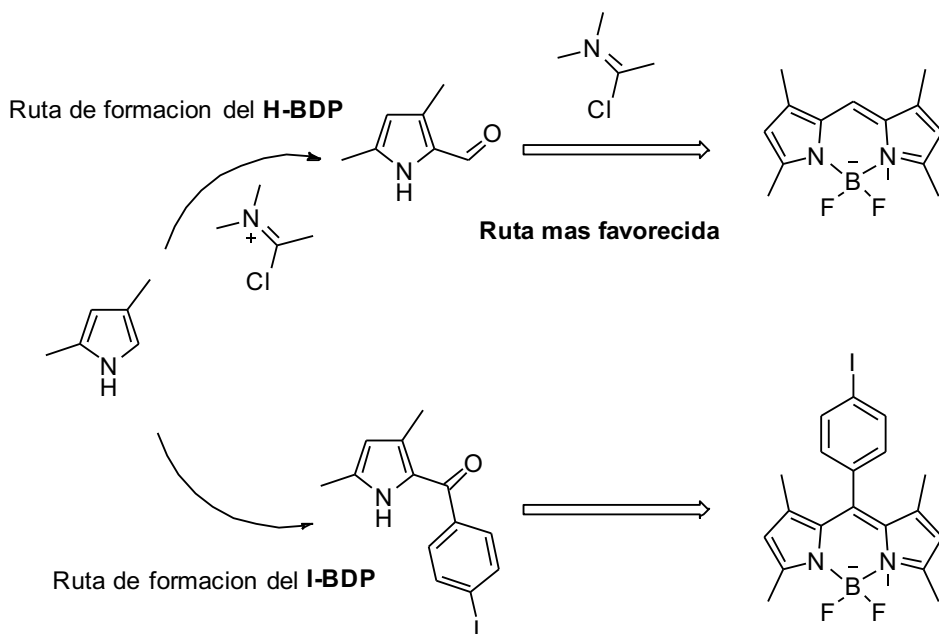


Figura 2.16. Rutas propuestas por las cuales el reactivo pirrólico se consume.

Esto explicaría porque no se encuentran reportes de esta síntesis usando el cloruro de ácido precursor obtenido en el laboratorio. Una alternativa para explorar prospectivamente consiste en obtener el cloruro de ácido con una mayor pureza realizando una destilación al vacío, técnica utilizada habitualmente para purificar este tipo de compuestos.¹⁷ Esta metodología es adecuada para escalas más grandes que las trabajadas en esta tesis.

En conclusión, se pudieron obtener BODIPYS sustitutos en la posición meso con ioduros y bromuros de arilo *para* sustituidos. Se exploraron dos de las vías de síntesis clásicas para estos compuestos, y se indagó en el hecho de que sintetizar cloruros de ácido en baja escala para llevar a cabo la síntesis no resulta efectiva frente al uso del reactivo comercial.

2.2.2. Síntesis de 3-hidroxicromonas

2.2.2.1. Introducción

La segunda familia de fluoróforos seleccionados son las 3-hidroxicromonas (3HCs). Estas moléculas pertenecen al grupo de los flavonoides, y más específicamente a las flavonas. Esta familia de moléculas se encuentra en la naturaleza, predominantemente en el reino vegetal y son ampliamente estudiadas por presentar una marcada actividad terapéutica. La flavona (2-fenil-4H-chromon-4-ona) es la estructura básica de este grupo de moléculas y por la cual lleva su nombre. A nivel estructural son cromonas (cromen-4-onas) con un anillo aromático en la posición 2. Por otro lado, los flavonoles o 3-hidroxicromonas son flavonas derivatizadas con un grupo oxidrilo en el carbono 3. Cabe destacar que el nombre 3-hidroxicromona es ampliamente utilizado en literatura, pero la denominación correcta es 3-hidroxiavonona. Sin embargo, a lo largo de esta tesis se adoptará el nombre 3-hidroxicromona (3HCs) para referirse a ellas. En la Figura 2.17 se muestra además de su estructura básica, la numeración adoptada de los átomos más importantes, así como el rotulo que llevada cada uno de los tres anillos. Esta información será usada intensivamente en las siguientes secciones.

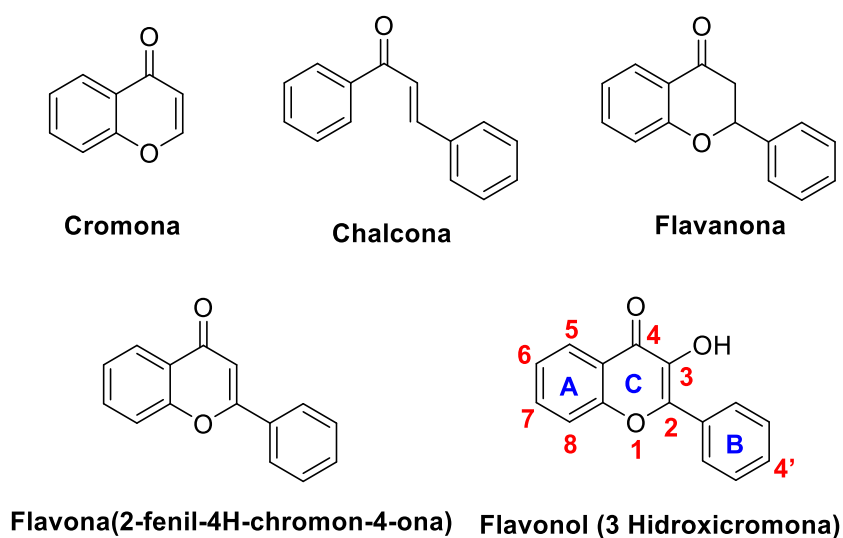


Figura 2.17. Estructuras de algunos flavanoides

Estas moléculas muestran dos bandas de emisión de fluorescencia. Este fenómeno se explica por la existencia de una reacción de transferencia de protón del oxidrilo 3 al carbonilo 4 en estado excitado (ESIPT, capítulo 1.2.3). Por otro lado, las propiedades de emisión de fluorescencia pueden

modularse por modificación estructural. La inserción de grupos dadores de electrones en la posición 2 genera moléculas que presentan un marcado solvatocromismo mientras que la fuerza del grupo dador se correlaciona con la sensibilidad del fluoróforo.¹⁸ Cuando los grupos dadores son más fuertes se generan moléculas con mayor solvatocromismo. Este comportamiento fotofísico vuelve a las 3HCs sustituidas excelentes candidatas para dar lugar a sondas fluorescentes sensibles al entorno. (Ver capítulos 1.1.2 y 1.1.5).

Desde el punto de vista sintético los flavonoles, las flavonas y las flavanonas comparten como precursor común a las chalconas. Estas se suelen sintetizar a partir de una condensación de Claisen-Schmidt entre una hidroxiacetofenona y un aldehído (Figura 2.18). En particular el anillo aromático de la acetofenona es lo que representa el anillo A mientras que el aldehído el B. Una vez obtenida la chalcona lo que determina que especie se forma es el paso de ciclación llevado a cabo.

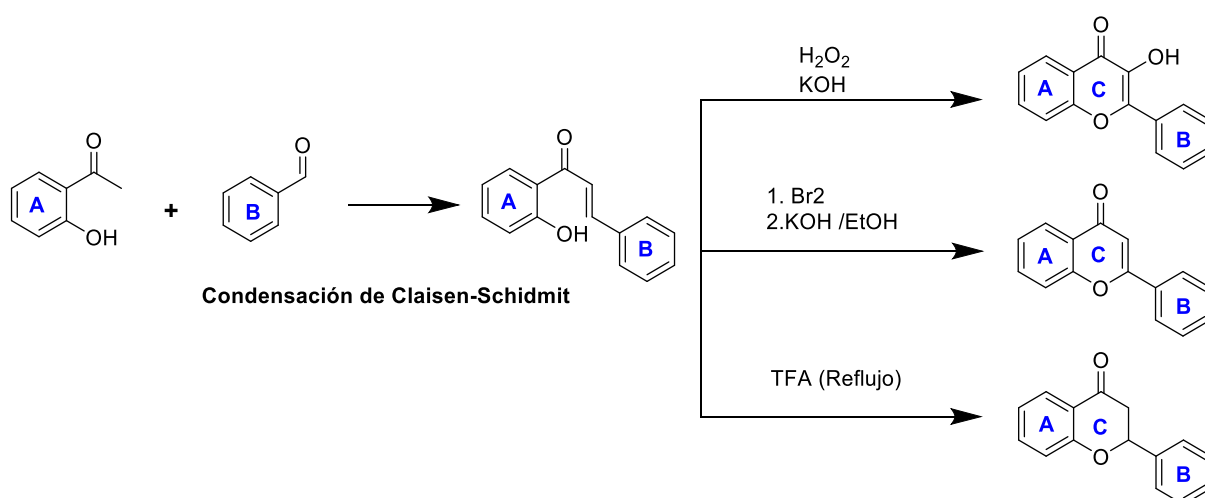


Figura 2.18. Ruta para obtener las distintas flavonas. Las chalconas se muestran como precursor común

En esta tesis se propone el uso de 3HCs como uno de los fluoróforos seleccionados para la síntesis de sondas fluorescentes sensibles al entorno. Se sintetizaron 3HCs sustituidas en la posición 4' con un grupo dador dimetilamino por ser el grupo dador más fuerte disponible mientras que se eligen dos halogenuros en la posición 7 para testear la reactividad de cada uno frente a la reacción de Sonogashira.

2.2.2.2. Rutas sintéticas precursoras

En la siguiente sección se realizará una descripción de algunas de las técnicas y/o métodos de síntesis para flavonas y 3HCs. Se comenzará describiendo el método precursor, y luego se hará hincapié en la síntesis de Algar-Flynn-Oyamada junto a todas sus variaciones.

Método de von Kostanecki

El método de Von Kostanecki (Figura 2.19) fue desarrollado a finales del siglo XIX siendo una de las primeras técnicas reportadas para la síntesis de flavonas.¹⁸ De manera general, esta metodología consta de dos pasos. Una condensación de Claisen-Schmidt entre un aldehído y una o-acetofenona obteniendo una chalcona, que posteriormente es sometida a una bromación/deshidrobromación en solución alcohólica básica, dando finalmente la flavona.

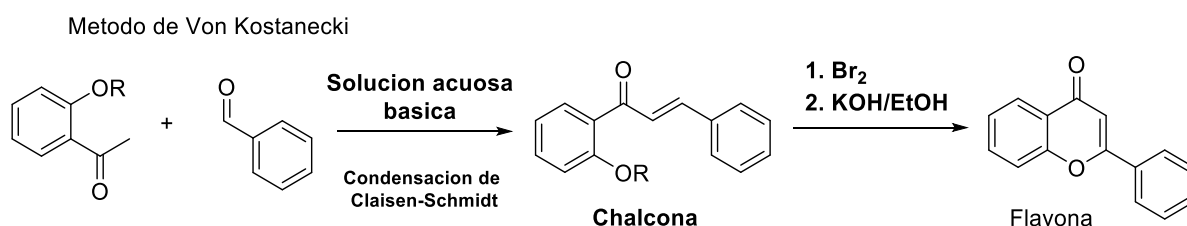


Figura 2.19. Síntesis de flavona por el método von Kostanecki.

La lógica de obtener la chalcona intermediaria a partir de una condensación es transversal a la mayor parte de las metodologías desarrolladas a posteriori.

Método de Karl von Auwers

Karl von Auwers sintetizó por primera vez la 3-hidroxiavona en 1908 (Figura 2.20).¹⁹ Para llevar a cabo esta síntesis, el autor realizó la bromación de una avona, seguido de una deshidrobromación con KOH en solución alcohólica, procedimiento similar al de von Kostanecki pero sin partir de una chalcona.

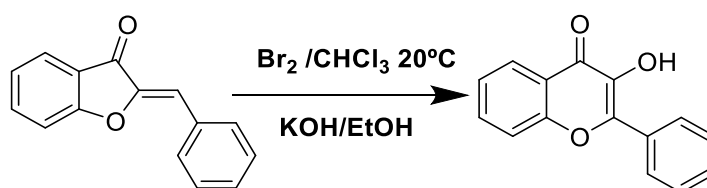


Figura 2.20. Síntesis de 3-hidroxiavona por el método de von Auwers.

Notablemente en el transcurso de la reacción se propone la formación de una chalcona hidroxilada, que luego se cicla para dar las 3-hidroxyflavona (Figura 2.21)

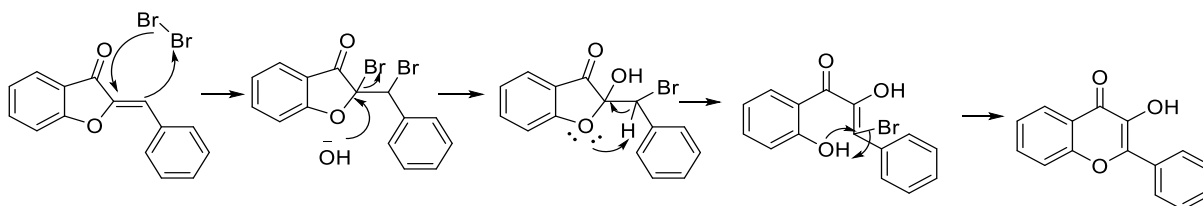


Figura 2.21. Mecanismo propuesto para el método de von Auwers.

Método de Algar-Flynn-Oyamada

Una alternativa para obtener las 3-hidroxicromonas es la reacción de Algar-Flynn-Oyamada (AFO) reportada en 1934. Esta reacción consta de la ciclación oxidativa de una chalcona producida por peróxido de hidrogeno en medio básico (Figura 2.22). En la reacción original se utilizaba una solución alcohólica de hidróxido de potasio en caliente, metodología común a los dos enfoques descritos previamente.

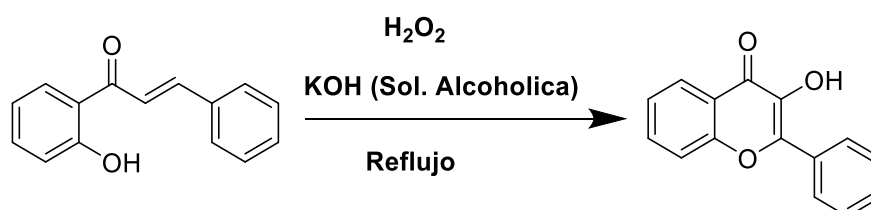


Figura 2.22. Reacción de Algar-Flynn-Oyamada.

El mecanismo de esta reacción ha sido discutido a lo largo de los años y actualmente no hay un consenso absoluto sobre el mismo (Figura 2.23). Se postula que la chalcona se convierte en una flavanona, pero hay dos propuestas sobre cuál es el mecanismo de este paso.

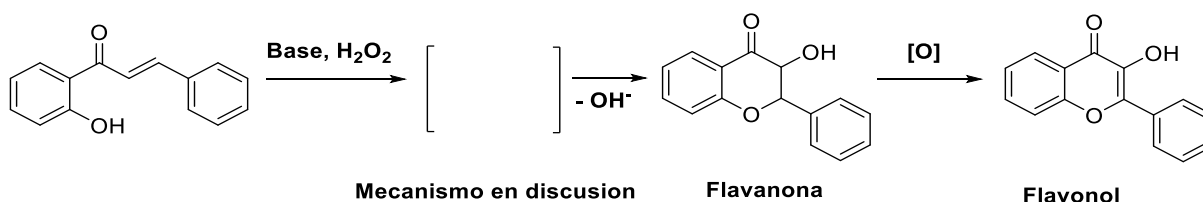


Figura 2.23. Mecanismo sin resolver de la reacción AFO.

Inicialmente, Algar y Flynn²⁰ propusieron la formación de un epóxido etilénico que podía tomar dos caminos: Un ataque del oxidrilo en posición 2

al carbono alfa para dar una aurona o un ataque al carbono beta para dar la flavanona:

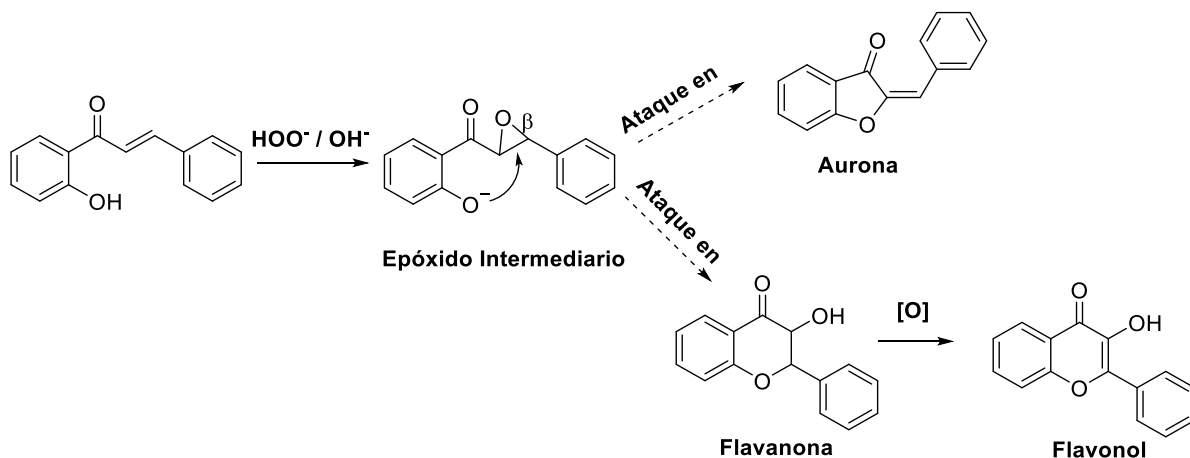
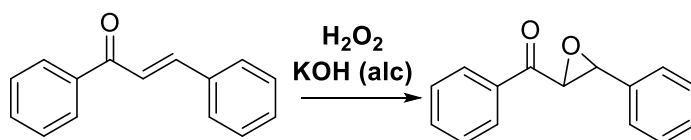


Figura 2.24. Mecanismo propuesto inicialmente para la reacción AFO.

Esta propuesta fue fundamentada a partir de un reporte de Baker y Robinson²¹ en el que previamente sintetizaron un epóxido similar a partir de una chalcona no hidroxilada bajo las mismas condiciones de reacción (Figura 2.25). Al tratar de reproducir la generación del epóxido intermediario a partir de la hidroxichalcona correspondiente, Algar y Flynn no tuvieron éxito y por ende su propuesta no tuvo un sustento empírico.

Epoxido obtenido por Baker & Robinson (1932)



Intento de Algar & Flynn (1934)

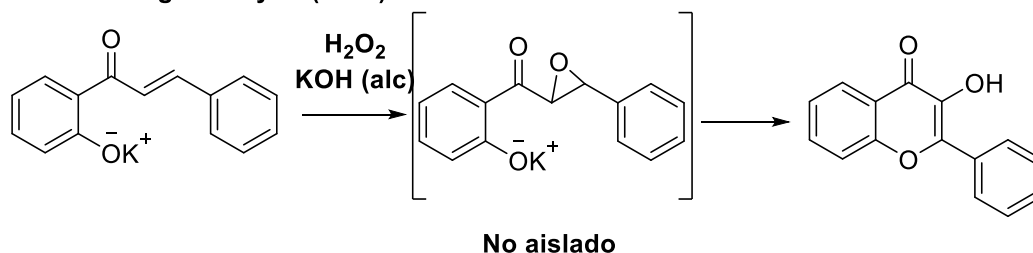


Figura 2.25. Formación del epóxido obtenido por Baker & Robinson (Arriba). Intento fallido de Algar y Flynn (Abajo).

En 1996 Patonay²² logra obtener y detectar el epóxido intermediario, utilizando dimetildioxirano como agente oxidante en lugar de las condiciones utilizadas en la reacción de AFO (Figura 2.26). En este trabajo se

demuestra que puede suceder tanto el ataque en α para dar la aurona como en β para dar la flavanona, y que este último está favorecido cuando los sustituyentes R_1 y R_2 en el carbono β , estabilizan la carga parcialmente positiva de este (es decir, con grupos dadores).

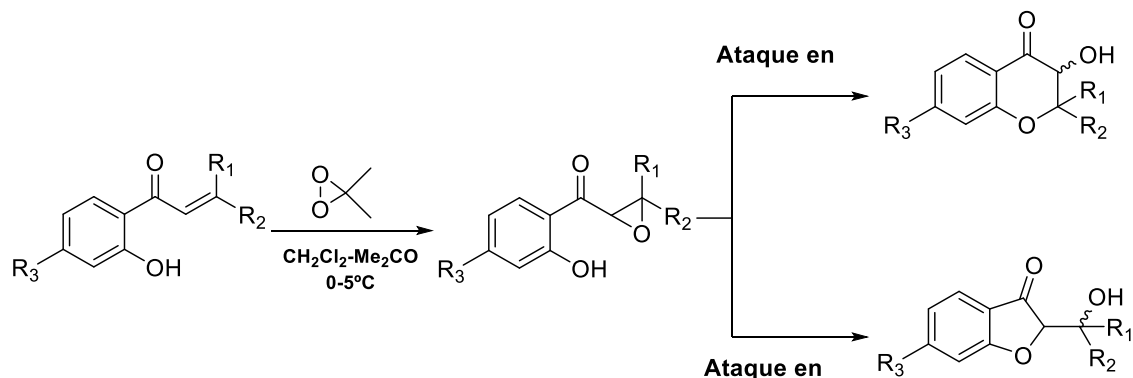


Figura 2.26. Obtención del epóxido intermediario obtenido por Patonay usando condiciones de reacción distintas a las AFO.

En contrapartida a la propuesta de Algar y Flynn, en 1965 Dean y Podimuang²³ desestimaron la formación del epóxido intermediario fundamentando que, en un medio fuertemente básico, el oxidrilo de la chalcona se encuentra desprotonado, y la formación del epóxido se tendría que dar por interacción de dos partículas cargadas negativamente como lo son la chalcona y el anión hidrogeno peróxido, algo desfavorable energéticamente según los autores. El nuevo mecanismo propuesto se basa en una ciclación intramolecular concertada para dar el anión flavanona, que luego es oxidado por el peróxido de hidrogeno para dar la flavanona (Figura 2.27). Finalmente, los autores consideran que se puede formar el intermediario epóxido en chalconas que presentan sustituyentes como metilo o metoxi en el carbono 5, lo que da lugar a auronas.

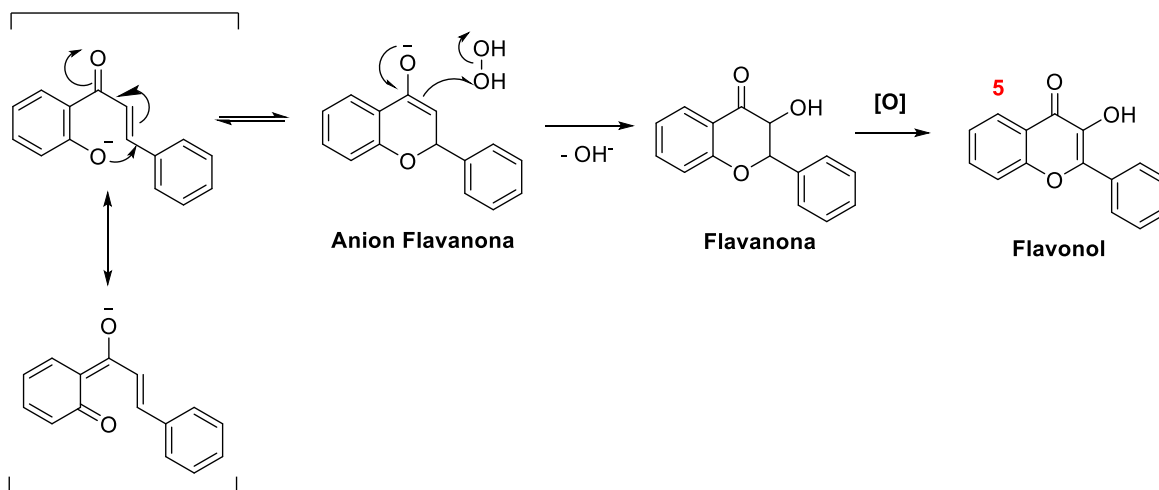


Figura 2.27. Mecanismo de AFO propuesto por Dean y Podimuang.

La realidad es que ninguna de las dos hipótesis se pudo comprobar experimentalmente hasta el momento. Con el aumento del poder de cómputo, en los últimos veinte años, se han realizado simulaciones computacionales para tratar de clarificar este dilema. Nuevamente, se encontraron resultados contrapuestos que apoyan las dos posturas sin llegar a un consenso.²⁴

Finalmente, Xianyan Shen et al., en 2017,²⁵ prueban sistemáticamente diversas condiciones de síntesis para la reacción AFO. A partir de este trabajo, se pueden extraer algunas reglas de reactividad para la formación de diversas 3HCs:

- Si hay sustituyentes en el carbono 5 que interaccionen estéricamente con el carbonilo (y no necesariamente electrónicamente) hay una predominancia a que se obtenga la aurona.
- La formación de flavanonas es propiciada por grupos dadores de electrones en el carbono 4' del anillo B, y en la posición 7 del anillo A, mientras que grupos sustractores en esta última posición aumenta el rendimiento de las auronas.

Independientemente del mecanismo preciso por el cual se da la reacción, esta serie de reglas se pueden usar para racionalizar los rendimientos de las reacciones AFO.

Para finalizar es importante destacar que desde el punto de vista experimental la reacción AFO suele presentar variaciones en cuanto a los rendimientos, que van de bajos a moderados. Una hipótesis es que a menudo se forman mezclas de reacción complejas debido a que las

flavanonas intermediarias precipitan en solución impactando directamente sobre el rendimiento y haciendo que el aislamiento del producto sea complejo.²⁶

2.2.2.3. Protocolos actuales

Protocolo clásico

Diversas condiciones experimentales han surgido para la reacción AFO. Actualmente la implementación más frecuente es “one pot” como las reportadas por Klymchenko,¹⁸ en donde la condensación que da lugar a la chalcona se realiza en tándem con la etapa oxidativa (Figura 2.28), en la que se utiliza H₂O₂ y metóxido de sodio a reflujo, durante un período corto de tiempo (unos pocos minutos). Este enfoque tiene la problemática de que la etapa oxidativa puede descontrolarse, generándose así diversos subproductos de oxidación y reduciendo la reproductividad de los rendimientos.

Otro enfoque extendido que utiliza la misma lógica, pero aplicando condiciones de reacción más suaves, en donde la etapa oxidativa se da a temperatura ambiente usando una solución acuosa de hidróxido de sodio y H₂O₂ a temperatura ambiente.²⁷ Esta alternativa es más controlada, aunque requiere prolongados tiempos de reacción.

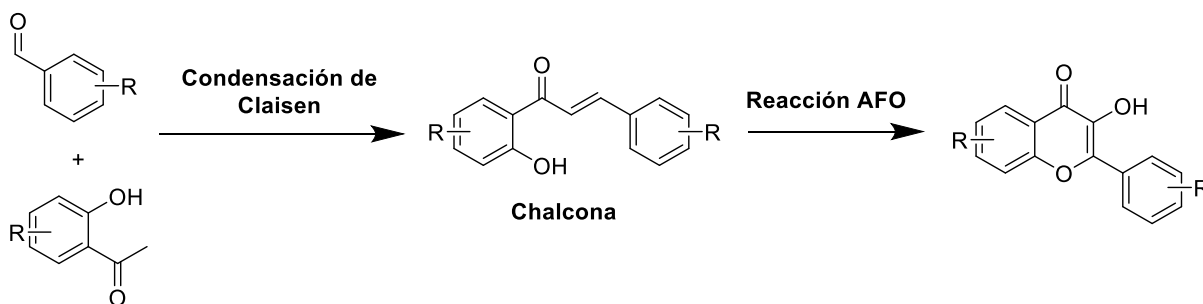


Figura 2.28. Esquema general para la formación de 3HCs usando la reacción AFO en su versión “one-pot”.

Protocolo basado en pirrolidina

Una alternativa novedosa es la reportada por Wei Xiong et al., en 2020.³ Los autores desarrollaron una síntesis oxidativa aeróbica “one-pot” a partir de 2-hidroxiacetofenona y benzaldehído en presencia de pirrolidina en agua bajo condición atmosférica que no requiere ningún reactivo agregado que oficie de oxidante (Figura 2.29).

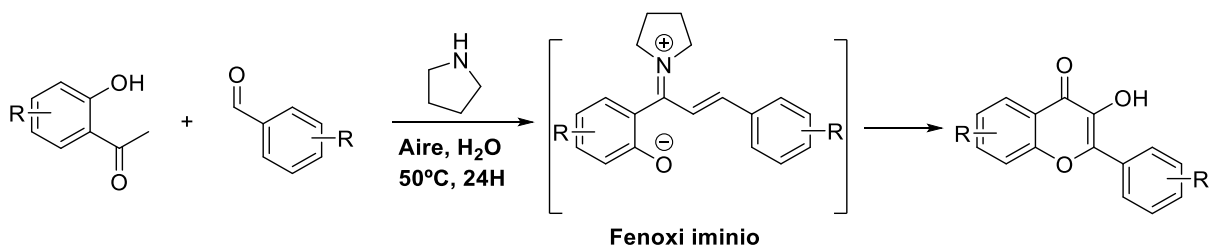


Figura 2.29. Síntesis de 3HCs usando pirrolidina.

Los autores proponen un mecanismo en el que la pirrolidina genera un zwitterion fenoxi iminio que luego es oxidado por el oxígeno singulete presente en el aire (Figura 2.30). Esto genera una cascada de oxidaciones que finaliza con una hidrólisis obteniendo el flavonol correspondiente.

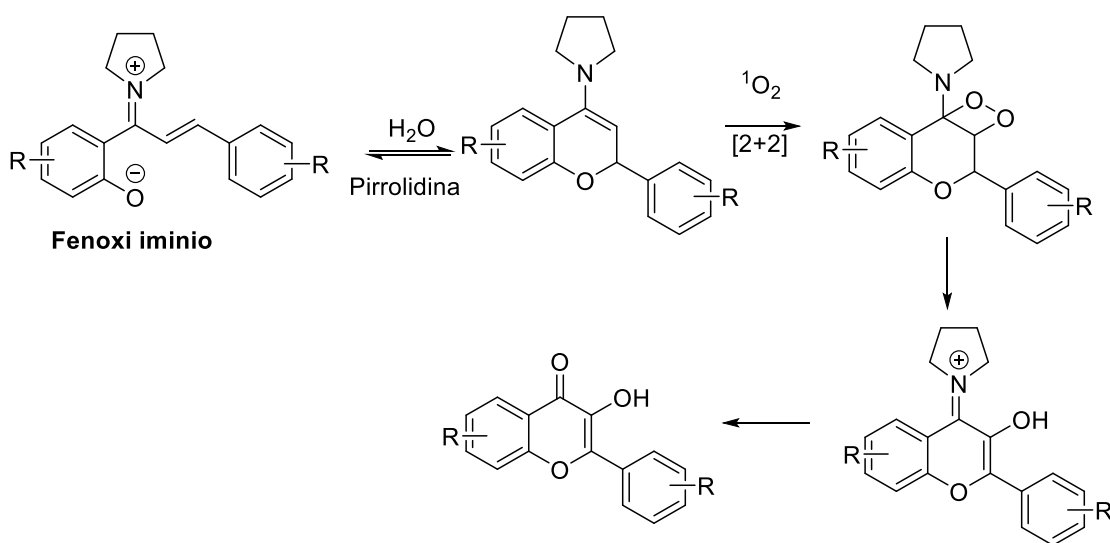


Figura 2.30. Mecanismo propuesto para la síntesis de 3HCs usando pirrolidina.

Protocolo usando catalizadores de transferencia de fase

Dada la naturaleza heterogénea de la mezcla de reacción, Nhu et al.²⁶ proponen la utilización de un catalizador de transferencia de fase (Figura 2.31) como un enfoque alternativo para mejorar la solubilidad del sustrato y de los intermediarios. En este caso parten de la chalcona y se solubiliza en una mezcla de etanol/dioxano en partes iguales. El medio básico es aportado por una solución acuosa al 5% de NaOH (12 equivalentes) y H₂O₂ como agente oxidante. El catalizador de transferencia de fase usado es una sal de amonio cuaternario, y tiene como objetivo solubilizar los intermediarios de reacción insolubles que se forman durante la formación de la 3HC. Los rendimientos reportados por el autor aumentan respecto a la

técnica convencional, siendo mayores a 50% en general. Los tiempos de reacción oscilan entre las 2 y 48 horas.

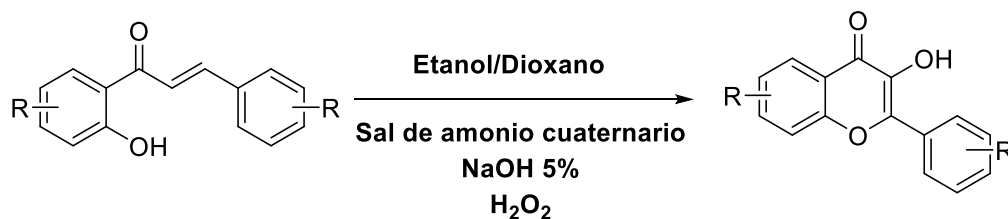


Figura 2.31. Síntesis de 3HCs usando catalizadores de transferencia de fase.

2.2.2.4. Síntesis de Br-3HC

La ruta sintética tradicional para obtener **Br-3HC**, comienza por la obtención de la acetofenona **10** mediante un reordenamiento de Fries a partir de 3-bromofenol y cloruro de acetilo. El producto de esta reacción es sometido a una condensación de Claisen con 4-dimetilaminobenzaldehído obteniéndose la chalcona **11** intermediaria, que es usada sin aislar en la reacción de AFO para obtener la **Br-3HC** correspondiente (Figura 2.32). En las siguientes secciones se detallará cada una de estas reacciones y las variantes exploradas.

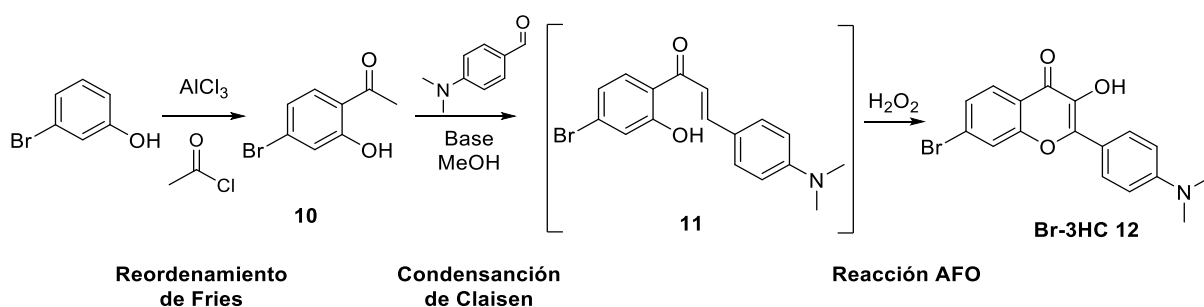


Figura 2.32. Síntesis de **Br-3HC** a partir de 3-bromofenol.

La reacción de reordenamiento de Fries, consta del reordenamiento del grupo acilo de un acetato de fenilo a un anillo aromático para dar acetofenonas y es catalizada por ácidos de Brønsted o de Lewis como HF, AlCl₃, BF₃, TiCl₄ o SnCl₄. Los ácidos se utilizan en exceso estequiométrico, especialmente los ácidos de Lewis, ya que forman complejos con reactivos y productos.

Cuando se utiliza AlCl₃, como ácido de Lewis, el mecanismo involucra la complejación del oxígeno fenólico con el tricloruro de aluminio, lo que

permite la formación de un carbocatión acilo (Figura 2.33).²⁸ Este último ataca al anillo aromático, tanto en posición *orto* como en *para*, dando una mezcla de isómeros.

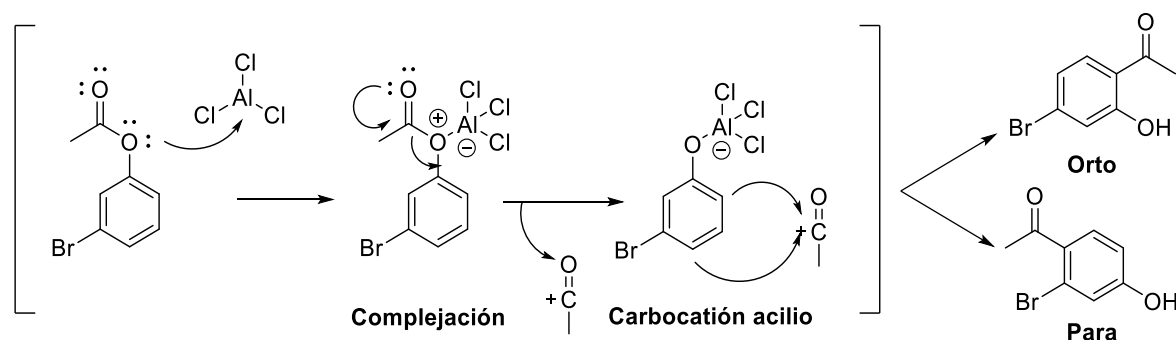


Figura 2.33. Mecanismo de reordenamiento de Fries.

La proporción de los isómeros puede ser modulada ajustando las condiciones experimentales.^{29, 30} La formación del isómero *orto* se ve favorecida a mayores temperaturas, menores tiempos de reacción y solventes no polares.

Se exploran dos procedimientos sintéticos para obtener la acetofenona **10** a partir de 3-bromofenol. El primer procedimiento consta de dos pasos, que son obtener el éster fenólico **13** y luego llevar a cabo el reordenamiento de Fries (Figura 2.34). Mientras que el segundo procedimiento puede realizarse “one-pot”. Para este caso el éster fenólico se genera *in situ* y se realiza el reordenamiento en un solo paso experimental (Figura 2.35).

En primera instancia se realiza la acilación del oxidrilo fenólico del 3-bromofenol con anhídrido acético a temperatura ambiente. El éster fenólico obtenido es purificado por cromatografía en columna, obteniéndose un aceite amarillo pálido en un 80% de rendimiento. El aceite es mezclado con AlCl_3 a $150\text{ }^\circ\text{C}$ obteniéndose la acetofenona **10** en un 65% de rendimiento. El rendimiento global de la reacción es de 52%.

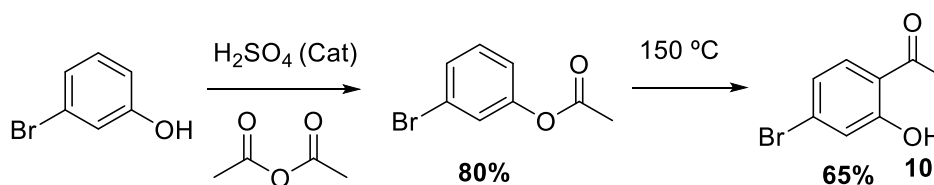


Figura 2.34. Síntesis de la acetofenona **10** de dos pasos.

Como alternativa se utiliza un protocolo previamente explorado en el grupo de investigación, en donde se realiza el reordenamiento en un solo paso ("one pot").³¹ Para esto se agita 3-bromofenol con cloruro de etanoilo en 1,2-dicloroetano a temperatura ambiente por 15 minutos. En esta primera instancia, se produce la acilación del oxidrilo fenólico *in situ*. Luego se adiciona AlCl_3 que actúa como ácido de Lewis y se lleva la mezcla de reacción a reflujo (84 °C) durante toda la noche. El isómero *orto* se obtiene con un rendimiento del 56 % luego de purificar por cromatografía en columna.

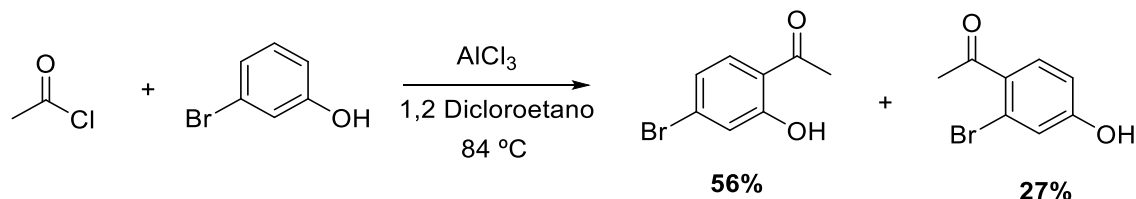


Figura 2.35. síntesis de la acetofenona **10** de un paso.

La elección del 1,2-dicloroetano sobre el diclorometano se encuentra relacionada con el hecho que permite mayores temperaturas de reacción, y es menos polar, por lo que estas condiciones experimentales aumentan la proporción del isómero *orto*.

Se observa que, en términos de rendimiento globales, esta reacción "one pot" (Rto = 56%) es comparable a la reacción en dos pasos (Rto = 52%) pero simplifica la ruta al reducir un paso de síntesis y purificación.

El espectro de RMN protónico de la acetofenona **10** (Figura 2.36) muestra el patrón de acoplamiento esperado para los protones aromáticos de esta molécula. La señal ubicada en 7,05 ppm se desdobla como dos dobletes ($J = 1,9$ y $8,5$ Hz) con valores típicos de acoplamiento orto y meta en anillos aromáticos congruente con los esperados para el H-5. Estas constantes de acoplamiento ($J = 8,5$ Hz) se ven reflejadas en el doblete de 7,57 ppm asignado al H-6 y el doblete a 7,18 ppm ($J = 1,9$ Hz) asignado al H-3. Por otro lado, los desplazamientos son congruentes con las asignaciones. Asimismo, se observa un singlete a 2,61 ppm correspondiente al CH_3 de la cetona y otro a 12,34 ppm que integra para un solo protón, correspondiente al OH del fenol.

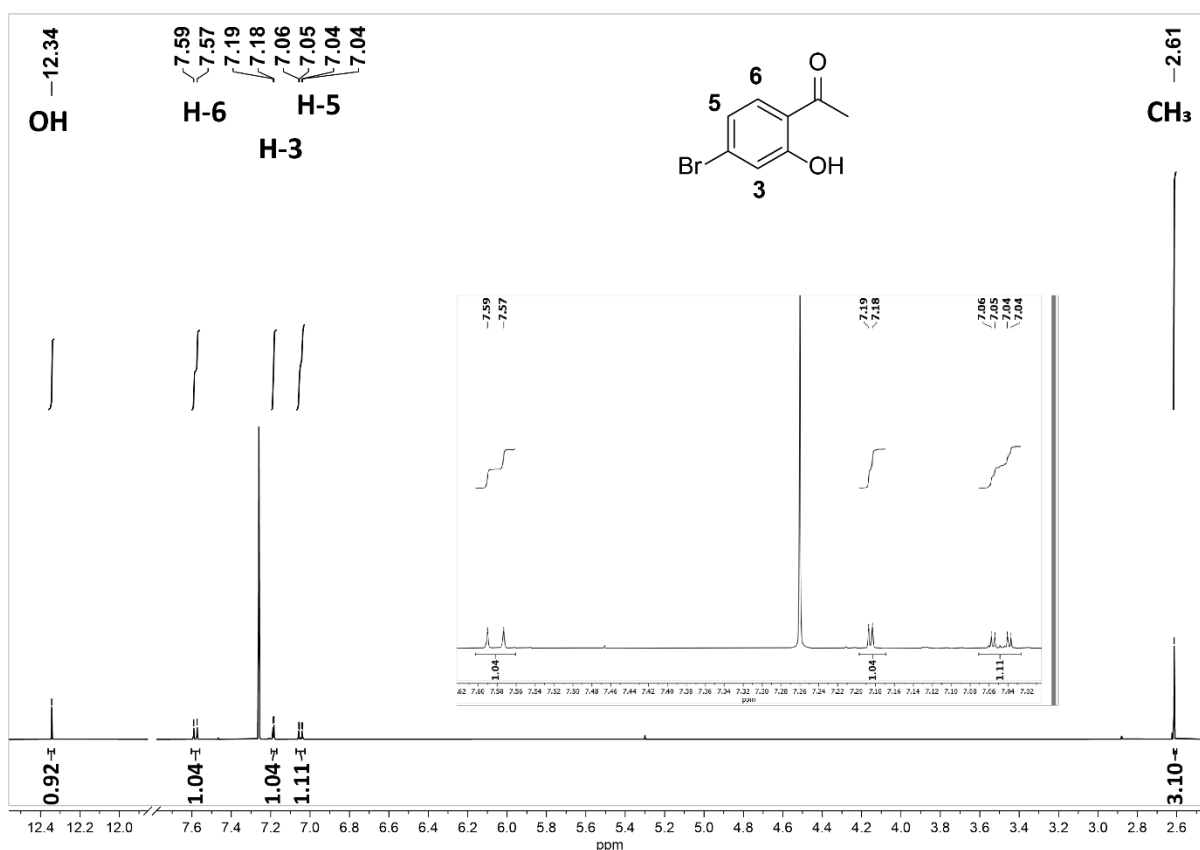


Figura 2.36. Espectro RMN-¹H (CDCl₃, 500 MHz) de la acetofenona **10**.

Una vez obtenida la acetofenona **10**, se sintetiza la **Br-3HC** correspondiente siguiendo la ruta “one-pot”: En primer lugar, se realiza una condensación de Claisen (Figura 2.27, a) en la que se obtiene la chalcona intermediaria **11** que es sometida sin aislar a una reacción de AFO (Figura 2.37.b).

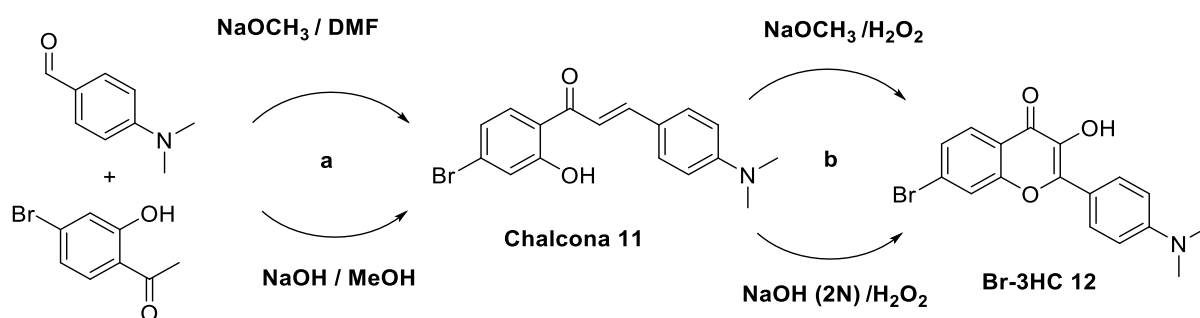


Figura 2.37. Esquema de síntesis de 3-HC en condiciones suaves (abajo) y fuertes (arriba).

Para la síntesis de **Br-3HC** se exploraron las dos condiciones de reacción más reportadas en literatura. Por un lado, una condición agresiva que utiliza metóxido de sodio como base, en DMF, para realizar la

condensación de Claisen. Esto da como resultado la chalcona intermediaria **11** que se somete sin purificar a la reacción de AFO con más metóxido de sodio y H_2O_2 a reflujo durante unos minutos. El producto final se obtiene con un 20% de rendimiento. Sin embargo, esta condición de síntesis resulta poco reproducible ya que si se excede el tiempo de reflujo se generan muchos subproductos que disminuyen aún más el rendimiento.

Por otro lado, una condición más suave, que utiliza hidróxido de sodio como base para la condensación y el solvente de reacción es metanol. Posteriormente, el paso oxidativo se realiza con una solución acuosa de hidróxido de sodio y H_2O_2 a temperatura ambiente hasta desaparición de los reactivos monitoreada por CCD. Los tiempos de este paso son variables y van desde 5 hasta 14 horas. El rendimiento obtenido es de 30% y es reproducible en repetidos intentos, por lo que se selecciona este método para la síntesis de este tipo de compuestos.

El *work-up* es similar en ambos casos y consta de neutralizar el crudo de reacción llevándolo a $pH = 4$, en frío. De esta forma, se obtiene un precipitado naranja que es filtrado y lavado con agua fría sin requerir un paso adicional de purificación.

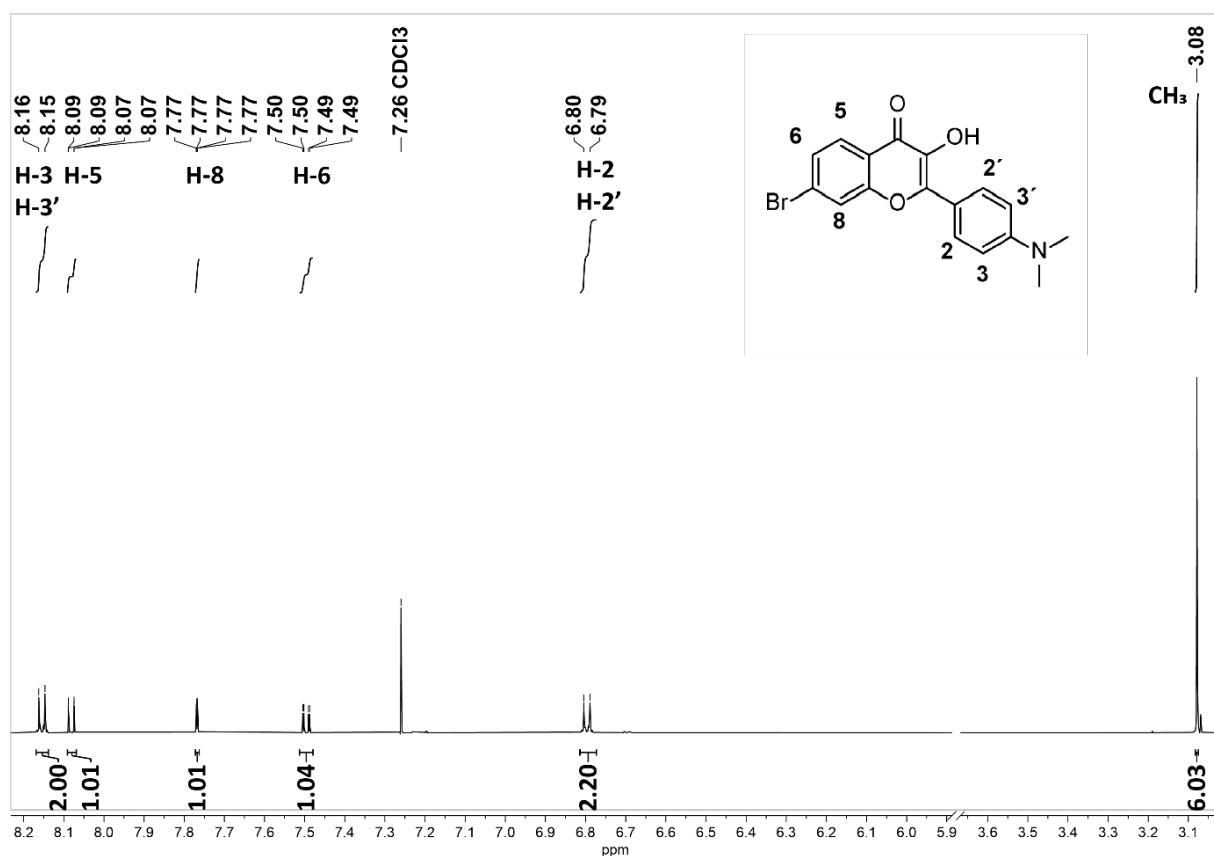


Figura 2.38. Espectro $RMN-^1H$ ($CDCl_3$, x00 MHz) de **Br-3HC**.

El espectro de RMN protónico (Figura 2.38) muestra un patrón de sustitución similar al del reactivo acetofenona **10** (señales ubicadas en 7,49; 7,77 y 8,07 ppm correspondiente a H-6, H-5 e H-8). En este caso la herramienta de deconvolución de picos integrada en el software de análisis *Mestre Nova* permite identificar que las señales correspondientes a H-5 y H-8 son dobletes de dobletes, y la segunda constante de acoplamiento $J = 0.38$ Hz corresponde al acoplamiento de protones aromáticos *para*. Por otro lado, se suman dos señales aromáticas que integran a dos protones cada una (7,49 y 8,15 ppm), correspondientes al anillo B. Estas señales tienen un patrón de acoplamiento característico de anillos aromáticos *para* sustituidos (dos dobletes con $J = 8,7$ Hz). Se confirma también la existencia de dos metilos equivalentes como un singulete en 3,08 ppm que integra para 6 protones, con un desplazamiento congruente con los de un N,N-dimetilanilino.

Como alternativa, se explora la ruta que implementa el uso de pirrolidina como base para obtener 3HCs a partir de acetofenonas y aldehídos (Figura 2.39). Esta alternativa se presenta como más simple y reporta buenos rendimientos comparado con la vía clásica.

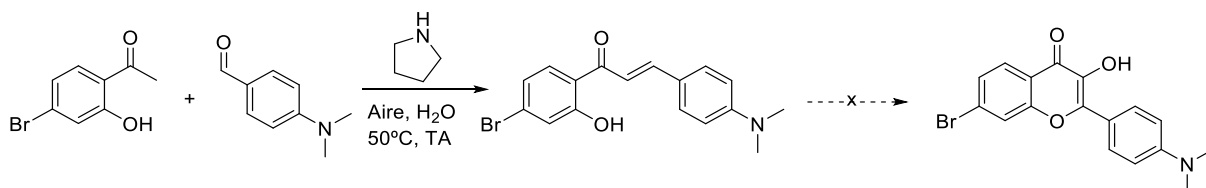


Figura 2.39 Síntesis de **Br-3HC** usando pirrolidina.

Se mezcla la acetofenona **10** con 4-dimetilamino benzaldehído en agua y se adiciona pirrolidina. La reacción se lleva a 50 °C durante 48 horas. Al monitorear la reacción por CCD se observa la formación de la chalcona **11** sin notar avances en el paso oxidativo para dar el producto buscado. El intermediario chalcona es aislado mostrando un 35 % de rendimiento.

Si bien en bibliografía, los autores reportan que se obtienen 3HCs como producto en un 80% de rendimiento, luego de varios intentos donde sólo se genera la chalcona, se concluye que, para esta combinación de reactivos en particular, la reacción no avanza en el paso oxidativo.

Al analizar el espectro de RMN ¹H (Figura 2.40) se observa que las señales en 7,04 (dd), 7,19 (d) y 7,76 (d) que muestran el mismo patrón de desdoblamiento que la acetofenona **10**, correspondientes a los protones H-

6, H-8 y H-5 respectivamente. Por otro lado, las señales ubicadas en 6,69 y 7,57 ppm son las únicas de la zona aromática que corresponden a dos protones equivalentes y que muestran igual constante de acoplamiento ($J = 8,7$ Hz) correspondiente al anillo aromático B *para* sustituido. Finalmente, se observan dos señales correspondientes a los protones H-3 y H-2 ubicadas en 7,36 y 7,93 ppm que muestran constante de acoplamiento de $J = 15$ Hz congruente a acoplamiento entre protones *trans* de alquenos.

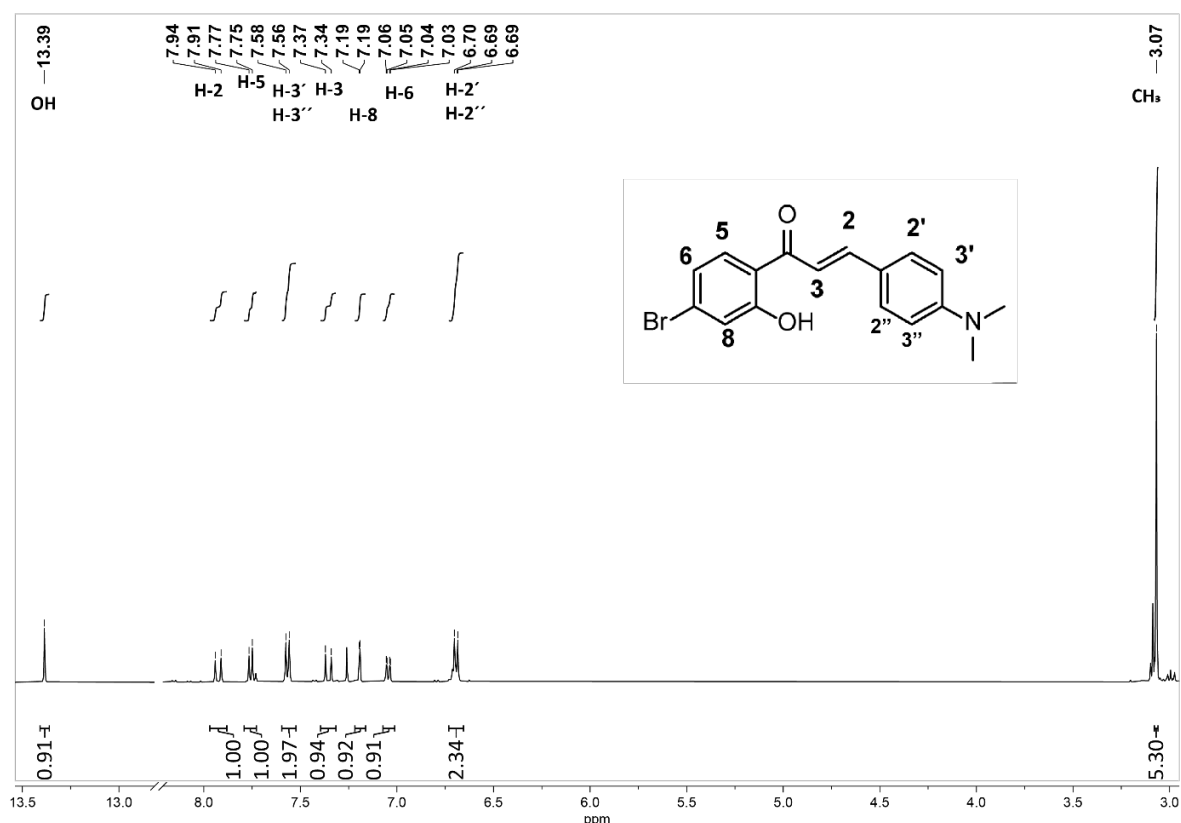


Figura 2.40. Espectro RMN- ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de chalcona **11**.

2.2.2.5. Síntesis de I-3HC

Se plantea la síntesis de **I-3HC** dado que los ioduros de arilo muestran un mejor desempeño en la reacción de acoplamiento de Sonogashira (ver capítulo 2.3.2.2) que los bromuros de arilo. Para llevar a cabo esta síntesis se repite la sistemática utilizada para la obtención de **Br-3HC**.

En primer lugar, se realiza el reordenamiento de Fries de un solo paso, usando 3-iodofenol (Figura 3.40), obteniéndose un 50% de rendimiento para el isómero orto (acetofenona **13**) y 30 % del para.

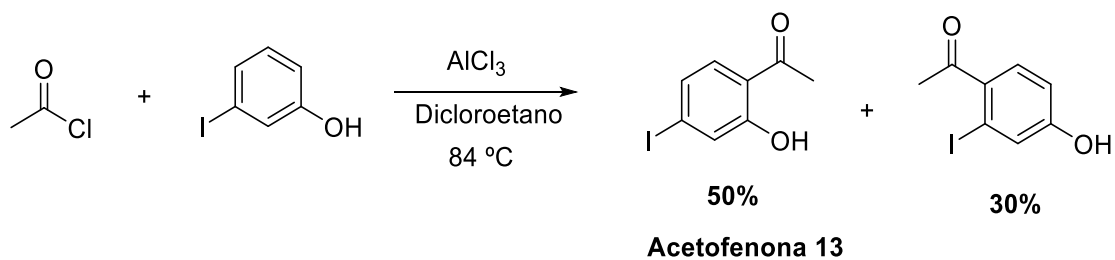


Figura 2.41. Síntesis de la acetofenona **13** vía reordenamiento de Fries en un paso.

El espectro de RMN protónico de la acetofenona **13** (Figura 3.41) muestra un patrón de desplazamientos distinto al de la acetofenona **10**.

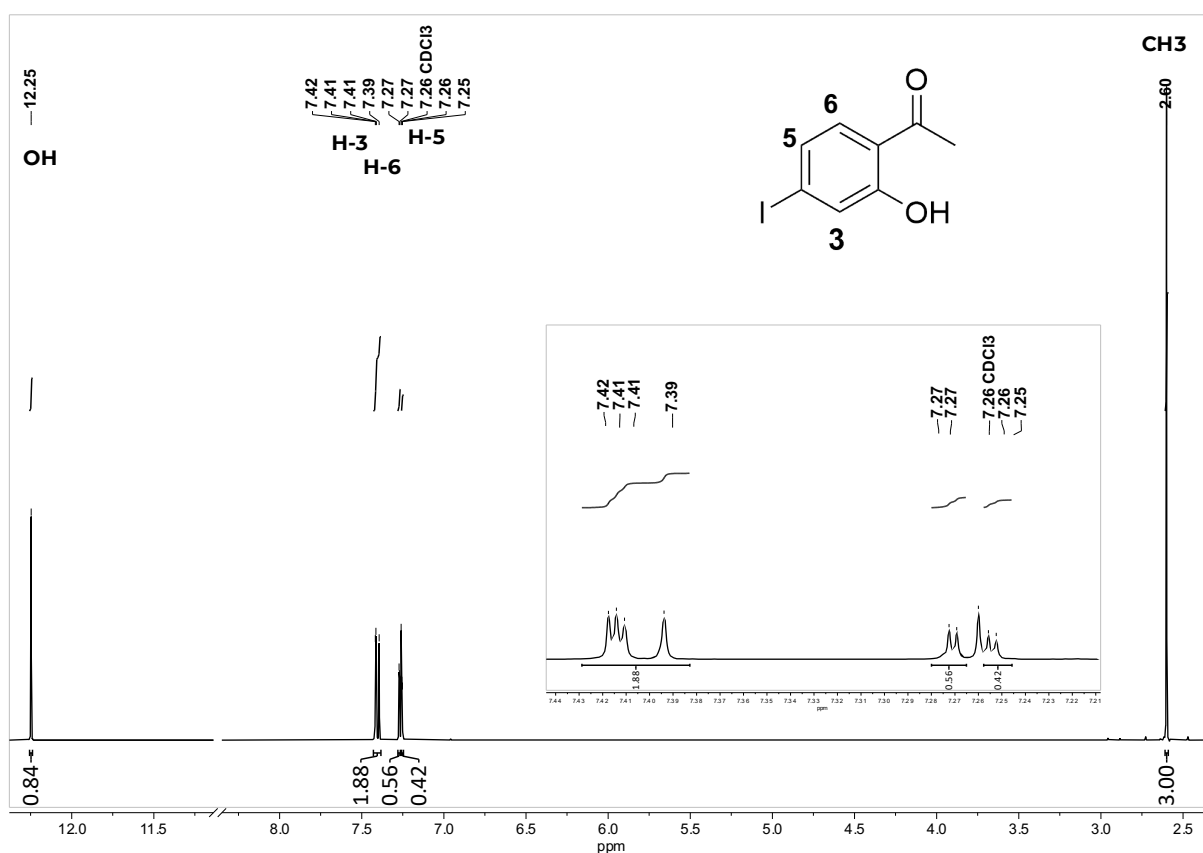


Figura 2.42. Espectro RMN-¹H (CDCl₃, 500 MHz) de acetofenona **13**.

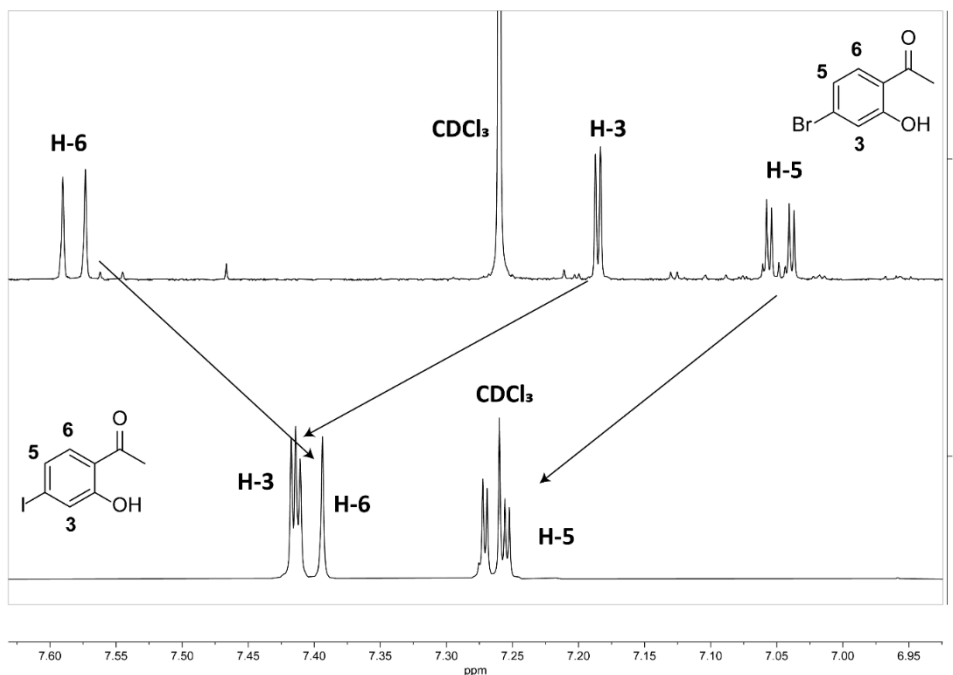


Figura 2.43. Comparación de las señales de RMN-¹H entre la acetofenona **10** (arriba) y la **13** (abajo).

Las señales correspondientes a los hidrógenos H-6 y H-3 se invierten en la acetofenona **13**, de tal manera que la primera señal se desplaza a campos más altos y la segunda a campos más bajos respecto a las señales equivalentes en la acetofenona **10** (Figura 2.43). Los singletes en 2,66 ppm correspondiente al CH₃ de la cetona y 12,25, correspondiente al OH se mantienen igual.

Al llevar a cabo la síntesis de la **I-3HC 15** con la acetofenona **13** y 4-dimetilamino benzaldehído utilizando la vía clásica “suave” se obtienen rendimientos muy bajos (5%) y muchos productos de descomposición. La síntesis se prueba en repetidas ocasiones sin éxito.

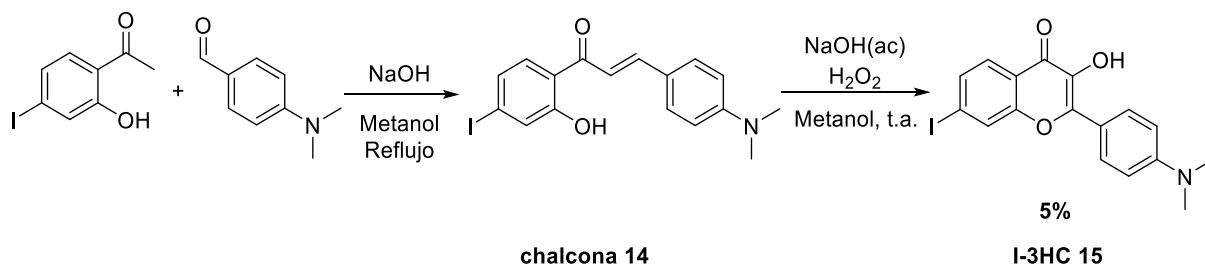


Figura 2.44 Síntesis de **I-3HC**.

El análisis del espectro de RMN protónico (Figura 2.45) es similar al de **Br-3HC**, salvo por la inversión en los protones H-8 y H-5 heredado de la **acetofenona 13**. Las señales a δ 6,81 y 8,16 ppm que integran para dos

protones cada uno, corresponden a los protones H-2/2' y H-3/3' del anillo aromático B de la cromona.

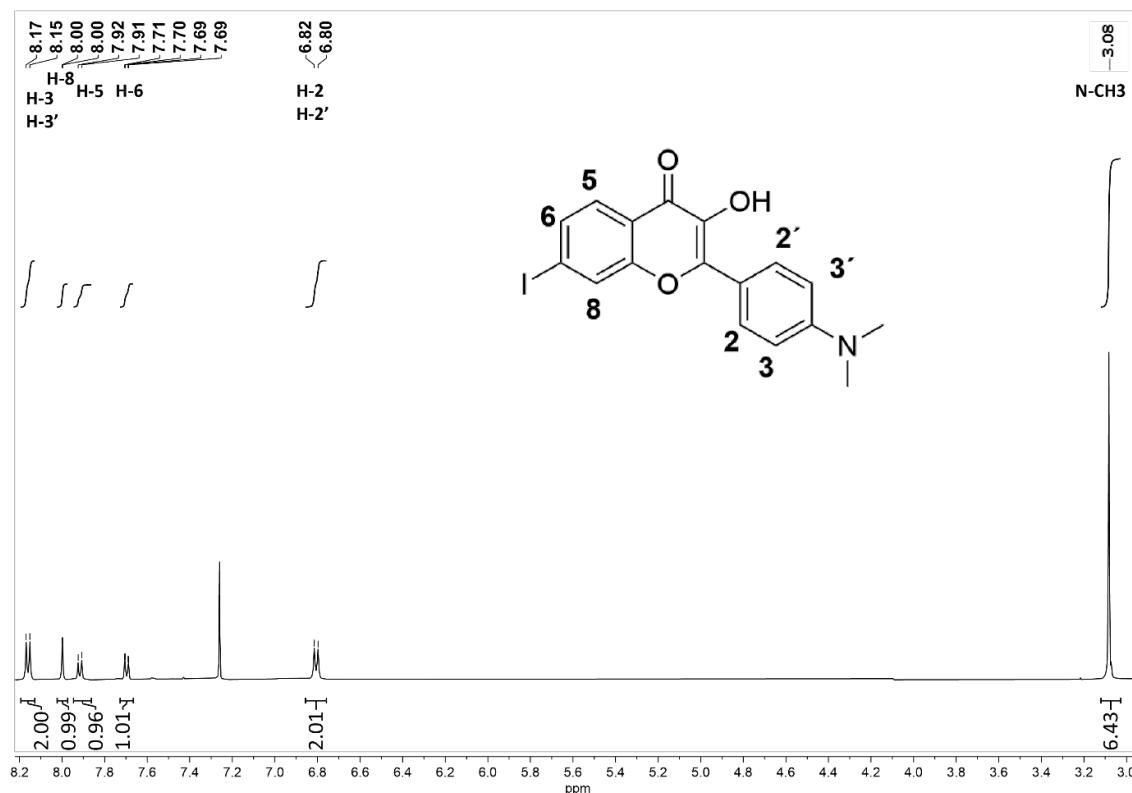
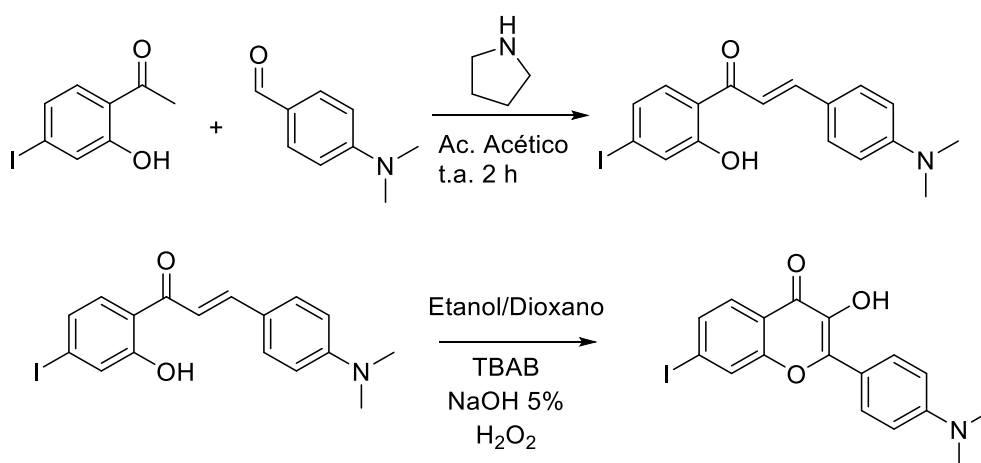


Figura 2.45. Espectro RMN-¹H (CDCl₃, 500 MHz) de **I-3HC**.

Como alternativa a la ruta clásica de síntesis, se propone sintetizar la chalcona usando una ruta de la pirrolidina/ácido acético, y luego el paso oxidativo se realiza por oxidación con sales de amonio cuaternario como catalizadores de fase. (Figura 2.46)



* TBAB = Bromuro de tetrabutil amonio

Figura 2.46. Ruta alternativa para la síntesis de **I-3HC**.

Se mezcla la acetofenona **13** obtenida previamente con 4-dimetilaminobenzaldehído y se adiciona una mezcla de pirrolidina/ácido

acético en agua a 0 °C. La reacción se lleva a temperatura ambiente y se agita durante 2 horas. Se obtiene la chalcona **14** con un rendimiento del 20 % luego de purificar por cromatografía en columna.

Para obtener la I-3HC se mezcla la chalcona antes obtenida con H₂O₂ en una mezcla de dioxano/etanol 1:1 y se adiciona NaOH 5% junto con el catalizador de transferencia de fase. La reacción se agita durante 48 horas hasta chequear desaparición del reactivo por CCD. Al llevar a cabo el work-up el producto que inicialmente se veía en la CCD, se descompone paulatinamente y solo se obtienen trazas.

2.3. Síntesis de sondas

2.3.1. Reacción de Sonogashira:

La formación de enlaces carbono-carbono llevada a cabo por acoplamiento de un carbono *sp* terminal y un *sp*² de un halogenuro de arilo (o vinilo) catalizada por paladio, es comúnmente denominado “Acoplamiento de Sonogashira” en honor a Kenkichi Sonogashira que, junto a colaboradores, estudiaron esta reacción en la década de 1970.³² El reporte original usaba sales de cobre(I) como co-catalizador y aminas como base (Figura 2.47).

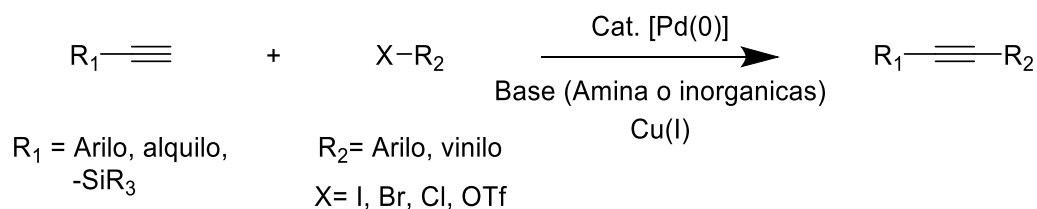


Figura 2.47. Reacción de Sonogashira.

El uso de sales de cobre(I) como co-catalizador aumenta la efectividad de la reacción, pero trae consigo la generación de productos indeseables como el homoacoplamiento de los alquinos, e impone condiciones experimentales muy controladas como una estricta exclusión de oxígeno en la mezcla de reacción. Es por esto que Heck y Cassar exploraron el acoplamiento usando condiciones libres de cobre.^{33, 34} En los reportes de estos autores se muestra que los rendimientos son aceptables si se aumenta la temperatura de reacción respecto a los acoplamientos que utilizan cobre.

Este tipo de reacción se sigue optimizando hasta el día de hoy ya que existe una dependencia marcada respecto los sustratos usados, y se han

desarrollado una amplia variedad de protocolos, variando los ligandos del catalizador, la base y el solvente, para optimizar según sea cada caso.³⁵

El mecanismo de esta reacción aún no está completamente develado, siendo el ciclo del cobre el menos estudiado. Actualmente se acepta la idea de que ocurre un ciclo típico de formación de enlaces C-C, donde el primer paso es una adición oxidativa (AO), seguido de transmetalación (TM) y finalmente, una eliminación reductiva (ER) (Figura 2.48, a). El paso de TM no ocurre cuando la reacción transcurre en ausencia de cobre. (Figura 2.48, b)

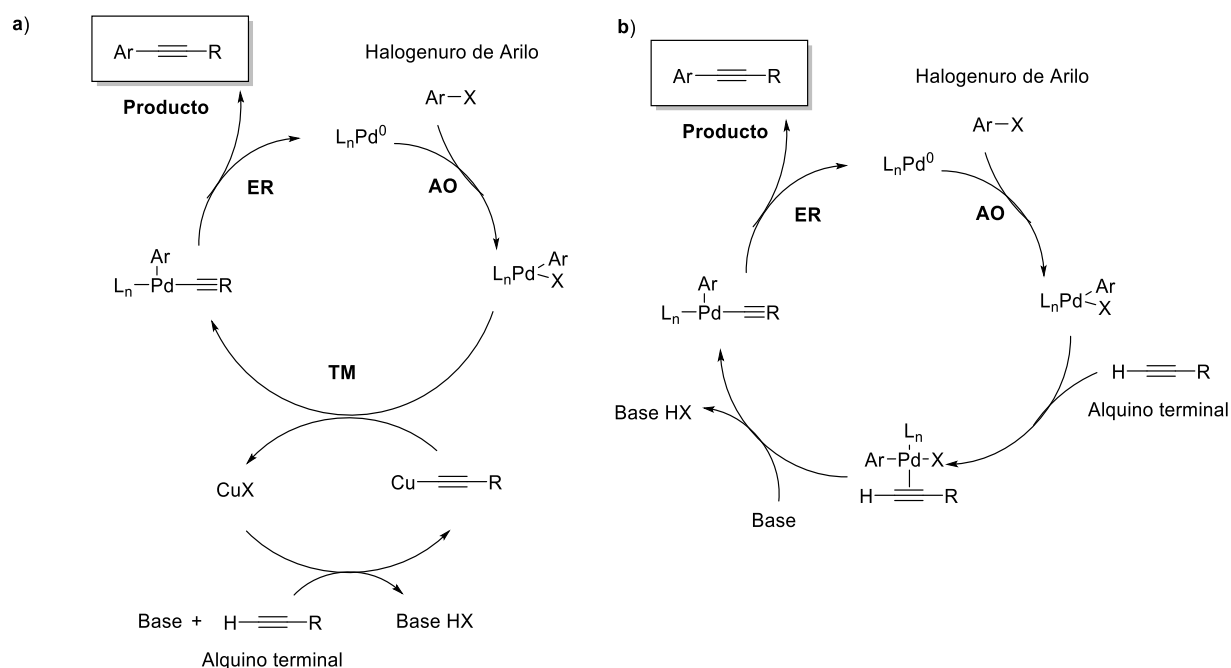


Figura 2.48. Mecanismos propuestos para la reacción de Sonogashira. a) Usando cobre como co-catalizador, b) condición libre de cobre.

El paladio se puede encontrar en dos estados de oxidación: 0 y +2. El ciclo comienza con una AO que requiere la existencia de $\text{Pd}(0)$. Esta especie reducida se puede adicionar directamente ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, etc) o bien se adicionan sales de $\text{Pd}(II)$ como $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ que se reducen *in situ* en las condiciones de reacción. Se considera que este paso es el limitante, y la identidad del halógeno en el sustrato tiene un rol clave: Los ioduros son más reactivos que los bromuros, y estos que los cloruros.

En paralelo, ocurre el ciclo del cobre que, si bien aún no se conoce en detalle, la hipótesis aceptada es que en un primer paso el alquino es desprotonado por la base, que suele ser una amina. Luego la especie formada se coordina con el cobre y se produce la TM hacia el paladio. El ciclo

principal finaliza con una RE, obteniéndose el producto y recuperando el catalizador de paladio (0) para reiniciar el ciclo.

El mecanismo de la versión libre de cobre es aún menos conocido, pero estudios recientes sugieren que el mecanismo es similar al descrito antes, siendo el ciclo del cobre llevado a cabo por otra molécula de paladio.³⁶

En esta sección, se estudiará la implementación de la reacción de Sonogashira en la generación de sondas fluorescentes acoplando los BODIPYS y 3HC halogenados descritos en la sección anterior, con ligandos específicos de proteínas. Los ligandos deberán estar apropiadamente funcionalizados con grupos alquinos, lo que permitirá su acoplamiento con los fluoróforos.

2.3.2. Sondas selectivas para Anhidrasa Carbónica humana 2

El primer sistema proteico seleccionado como modelo es la Anhidrasa Carbónica humana 2 (hCAII). Esta proteína se encuentra ampliamente caracterizada y se conocen una diversidad de moléculas pequeñas que interactúan con su bolsillo hidrofóbico.³⁷ Es estable y no requiere condiciones experimentales complejas para su manipulación. Por otro lado, se dispone del plásmido para sintetizarla, y las condiciones de expresión en bacterias *Escherichia Coli* recombinantes son estándar para su producción.

Las benzosulfonamidas son unas de las familias de ligandos más caracterizados para este sistema y para las cuales se conoce mejor el mecanismo de interacción con los sitios de unión de diversas hCA. El grupo sulfonamida es la función responsable de que se produzca la unión a la proteína³⁸, y por ende quien aporta la selectividad de este tipo de ligando. Es por este motivo, que se seleccionan como ligandos para la generación de sondas específicas de hCAII.

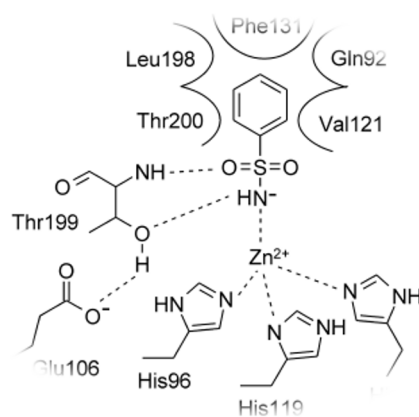


Figura 2.49. Interacción de las benzosulfonamidas con los residuos del sitio de unión en hCAII.

Se plantean generar tres ligandos distintos, una amida, un éster y una amina (Figura 2.50) como linker para incorporar el grupo alquino al ligando. La amina se diferencia por tener un espaciador más largo y con mayor libertad conformacional, los que nos permitirá estudiar que ocurre cuando el fluoróforo se aleja del bolsillo hidrofóbico. Por otro lado, los ligandos son funcionalizados de tal manera de no afectar la zona de la sulfonamida que es la región de la molécula que da especificidad por el sistema proteico.

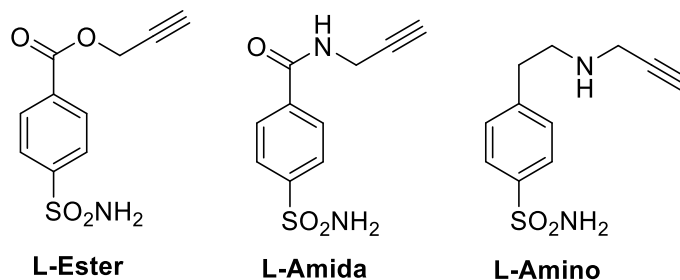


Figura 2.50. Ligandos propuestos para hCAII.

2.3.2.1. Síntesis de ligandos funcionalizados

Derivados de ácido

Para obtener los ligandos que son derivados de ácido (éster y amida) se utiliza el enfoque clásico para este tipo de moléculas: Una sustitución nucleofílica a un acilo. Esta reacción consiste en dos etapas, en donde en primer lugar se produce una adición de un nucleófilo al acilo y posteriormente se produce la eliminación del grupo saliente (Figura 2.51, a). Para que la reacción sea efectiva, tiene que existir unido al carbono carbonílico, un buen grupo saliente. Es por esto que se suelen utilizar derivados de ácidos, como los cloruros y anhídridos (Figura 2.51, b), o en otro

caso se buscan estrategias de activación del oxidrilo ácido, para transformarlo a este en un buen grupo saliente y favorecer la sustitución (Figura 2.52.a).³⁹ Las carbodiimidas son los activantes más extensamente utilizados para este fin, y la elección de un agente u otro depende de las condiciones experimentales, puesto que generan ureas como subproductos (Figura 2.52.b) y la solubilidad de estas dependen de la carbodiimida que les da origen. Por ejemplo: el subproducto generado al utilizar DCC es comunmente insoluble en la mayoría de los solventes y a pesar de poder ser filtrados suelen quedar trazas, mientras que las urea proveniente del EDCI son muy solubles en agua y se eliminan con un work-up acuoso simple.

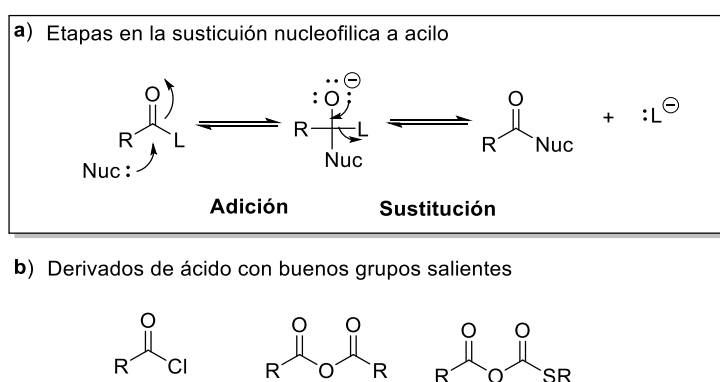


Figura 2.51 a) Etapas en la sustitución nucleofílica a acilo para dar derivados de ácido. b) Derivados de ácido con buenos grupos salientes.

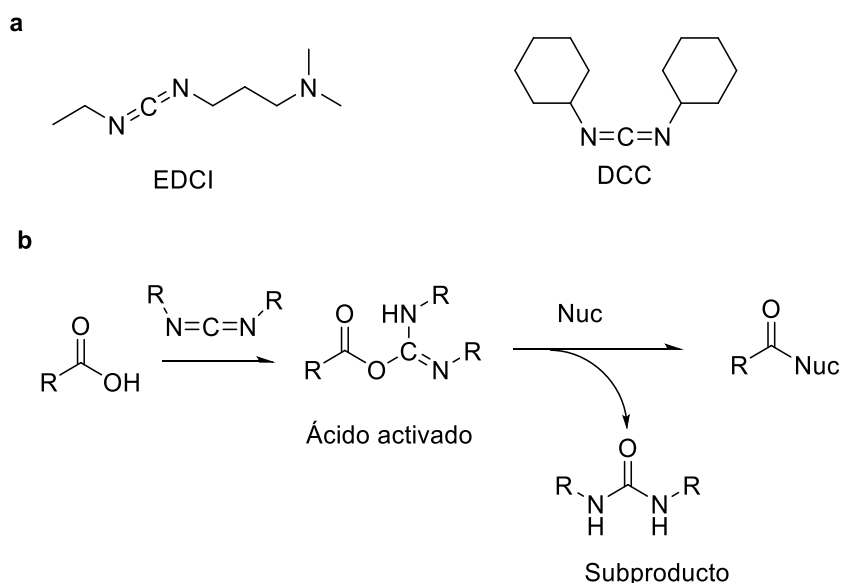
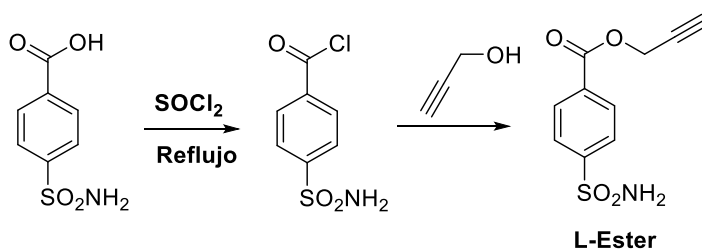


Figura 2.52 a) Estructura de los agentes activantes EDCI y DCC. b) Vía de activación producida por los activantes en la sustitución nucleofílica a acilo. Se muestra la urea que se obtiene como subproducto.

En este caso la sustitución se realiza con propargil alcohol y propargil amina para dar los derivados de ácido, éster y amida respectivamente. Para esto, se exploran dos rutas distintas de activación del carboxilo. Por un lado, se activó el ácido 4-sulfamoilbenzoico por formación del derivado clorado con cloruro de tionilo a reflujo (Figura 2.53, ruta A) y por otro lado usando EDCI como agente acoplante (Figura 2.53, ruta B). La diferencia clave es que la ruta A requiere dos pasos y condiciones de reacción más agresivas que la ruta B que se realiza en un paso único. La ruta A es explorada en la síntesis del **L-Éster**, mientras que la B para ambos derivados, **L-Éster** y **L-Amida**.

Ruta A



Ruta B

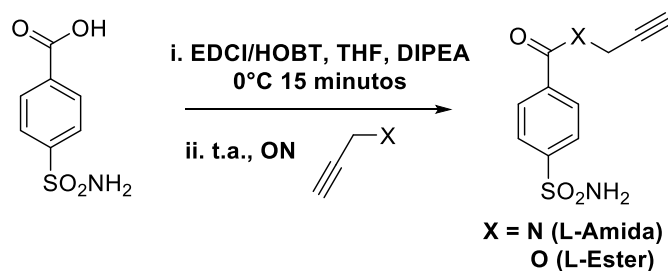


Figura 2.53. Obtención de derivados por a) formación de cloruro de ácido, B) usando agentes acoplantes típicos de la síntesis de péptidos.

Para sintetizar el cloruro de ácido se parte del ácido 4-sulfamoilbenzoico que es reflujaado en SOCl_2 a 100°C durante toda la noche. Se usan gotas de DMF para catalizar la reacción. Luego se realiza una destilación al vacío para remover el exceso de cloruro de tionilo y se obtiene un sólido amarillo pálido. Para eliminar las trazas de cloruro de tionilo que pueden haber quedado, se realizan múltiples destilaciones azeotrópicas en rotavap usando tolueno.⁴⁰

El producto se utiliza sin purificación adicional en el paso de derivatización, que se lleva a cabo disolviendo el cloruro obtenido en propargil alcohol. La reacción se agita durante toda la noche, y luego de este periodo de tiempo, se realiza una cromatografía flash en columna, usando

Ciclohexano/Acetato de etilo en una relación 60:40 respectivamente como fase móvil, obteniéndose un 52% de rendimiento del producto buscado.

El espectro de RMN protónico del ligando **L-Éster** (Figura 2.54) muestra el patrón de acoplamiento *para* esperado para los protones aromáticos de esta molécula. La señal ubicada en 8,15 ppm es un doblete ($J = 8,11$ Hz) que tiene la misma constante de acoplamiento que la señal aromática ubicada en 7,98 ppm, asignándose a los protones H-2/2' y H-1/1' respectivamente.

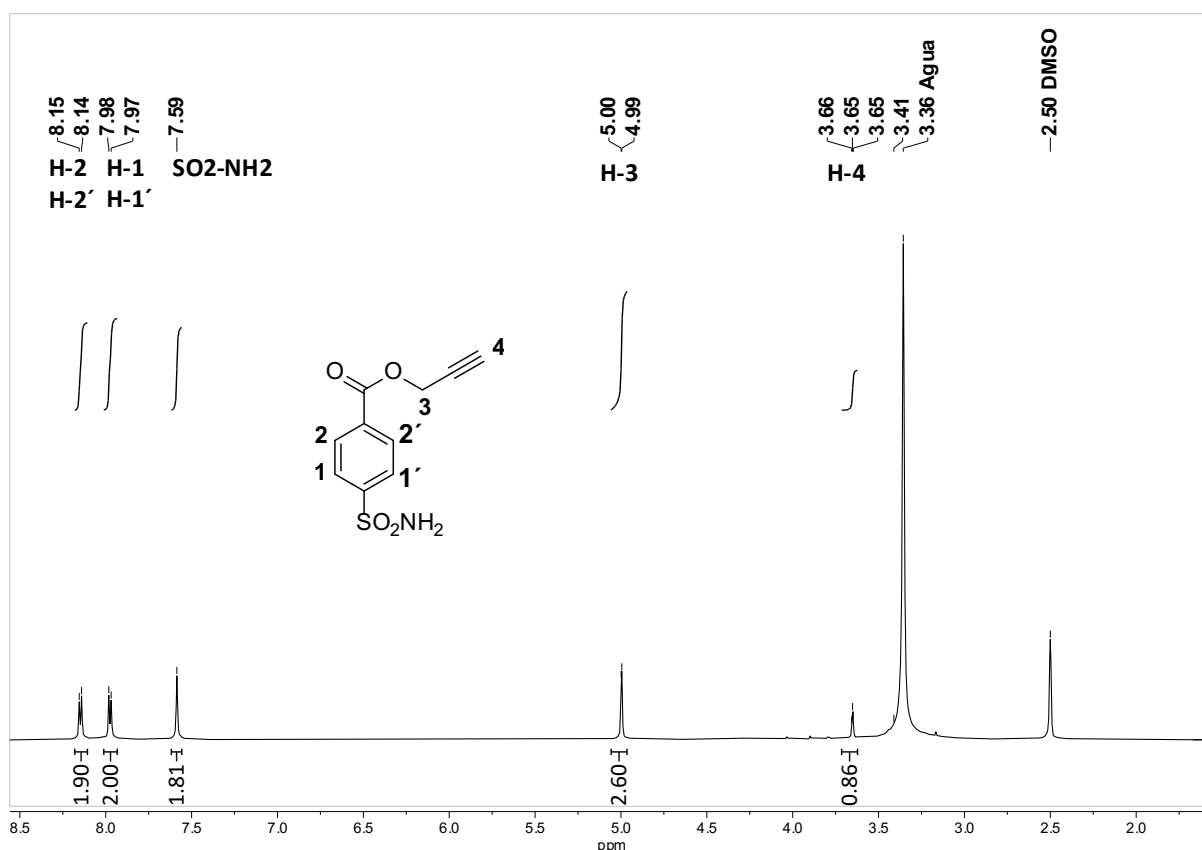


Figura 2.54. RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 500MHz) del ligando **L-Éster**.

Si bien la multiplicidad de las señales en 5,00 ppm y 3,66 ppm no se resuelven claramente en el espectro, con la ayuda de las deconvoluciones espectrales que aporta el software de análisis *Mestre Nova*, se puede determinar que la primera es un doblete y la segunda un triplete de constante de acoplamiento similar ($J = 2,7$ Hz). Esto es congruente con un acoplamiento entre el protón alquínico terminal H-4, con los hidrógenos del metileno CH_2 (H-3).

El acoplamiento usando agentes activantes de ácidos carboxílicos se lleva a cabo mezclando en THF el ácido 4-sulfamoilbenzoico, junto con

HOBt, y DIPEA. La mezcla es llevada a 0 °C y se adiciona EDCI. Luego de 15 minutos se adiciona el propargilo (alcohol o amina según corresponda) y mantiene la reacción a temperatura ambiente durante toda la noche. Se realiza un work-up acuoso en donde los subproductos del EDCI son solubilizados, y el producto buscado precipita. Este es el motivo por el cual no se usa DCC, puesto que los subproductos de este precipitan en la misma condición que el producto buscado. Se realiza una extracción de la fase acuosa con acetato de etilo obteniendo más producto precipitado. Los sólidos obtenidos son agitados en éter etílico, y filtrados sin necesidad de una purificación posterior. De esta manera obtenemos el producto **L-Amida** y **L-Éster** en un 70 y 80 % de rendimiento respectivamente.

El espectro de RMN protónico del ligando **L-Amida** (Figura 2.55) muestra el mismo comportamiento que del ligando **L-Éster** con la diferencia que ahora la señal correspondiente para los hidrógenos del metileno CH₂ (H-3) muestra un patrón de desdoblamiento de doble dobletes. Las constantes de acoplamiento indican que acopla con la señal en 3,15 ppm correspondiente al H-4 alquínico, pero también con la señal el 9,14 ppm, que corresponde al protón N-H del grupo amida.⁴¹

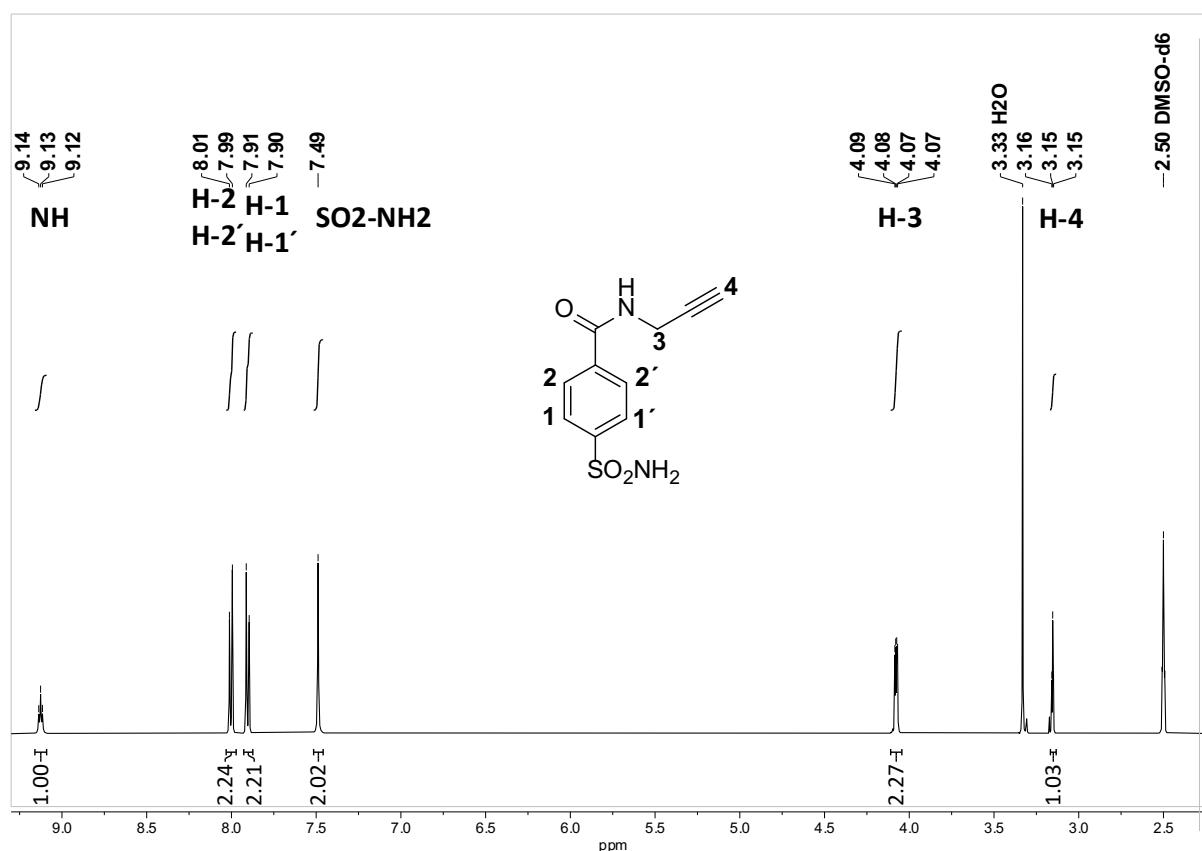


Figura 2.55 RMN ¹H (DMSO-d₆, 500MHz) del ligando **L-Amida**.

Derivados amino con espaciador largo

El ligando **L-Amina** se sintetiza partiendo del reactivo 4-aminoetilbenzosulfonamida. El enfoque adoptado consiste en tosilar el alcohol propargílico para luego llevar a cabo una sustitución nucleofílica con el reactivo antes mencionado (Figura 2.56).

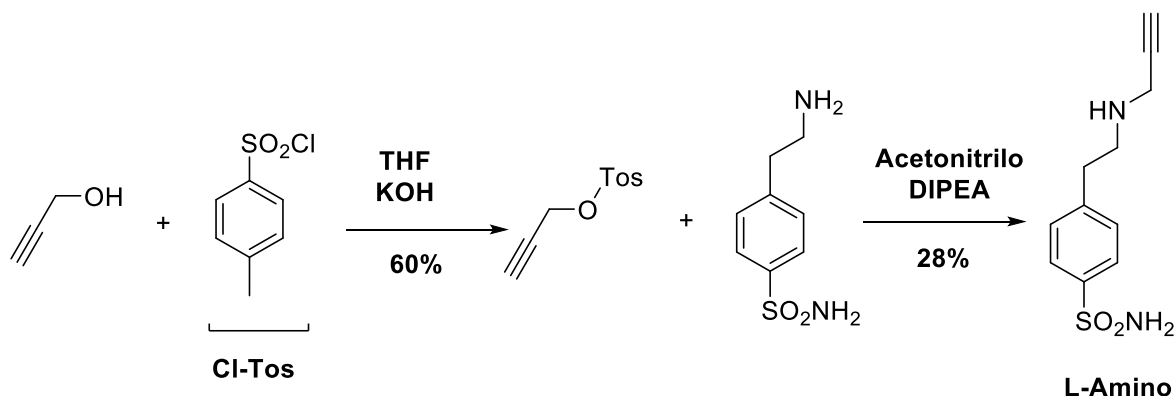


Figura 2.56. Ruta de síntesis del ligando **L-Amina**.

En primer lugar, se realiza el tosilato, disolviendo cloruro de tosilo en THF seco a 0°C , entonces se adiciona el alcohol propargílico. Luego de unos minutos se adiciona hidróxido de potasio y se mantiene la temperatura en 0°C durante media hora. La reacción se lleva a temperatura ambiente durante tres horas y es finalizada adicionando agua. Se lleva a cabo una extracción con éter, y tras purificar por cromatografía líquida en columna, se obtiene un 60% de rendimiento del alcohol tosilado.

El espectro de RMN protónico de la molécula **propargil-tosilato** (Figura 2.57) muestra el patrón de desplazamientos y desdoblamiento esperados para los protones aromáticos *para* sustituidos que indican la presencia del grupo tosilato. Por otro lado, también se observa las señales del hidrógeno alquínico H-4 y los hidrógenos metilénicos CH_2 (H-3) con un comportamiento similar al observado en los ligandos **L-Éster** y **L-Amida**, donde el protón alquínico acopla con el metileno.

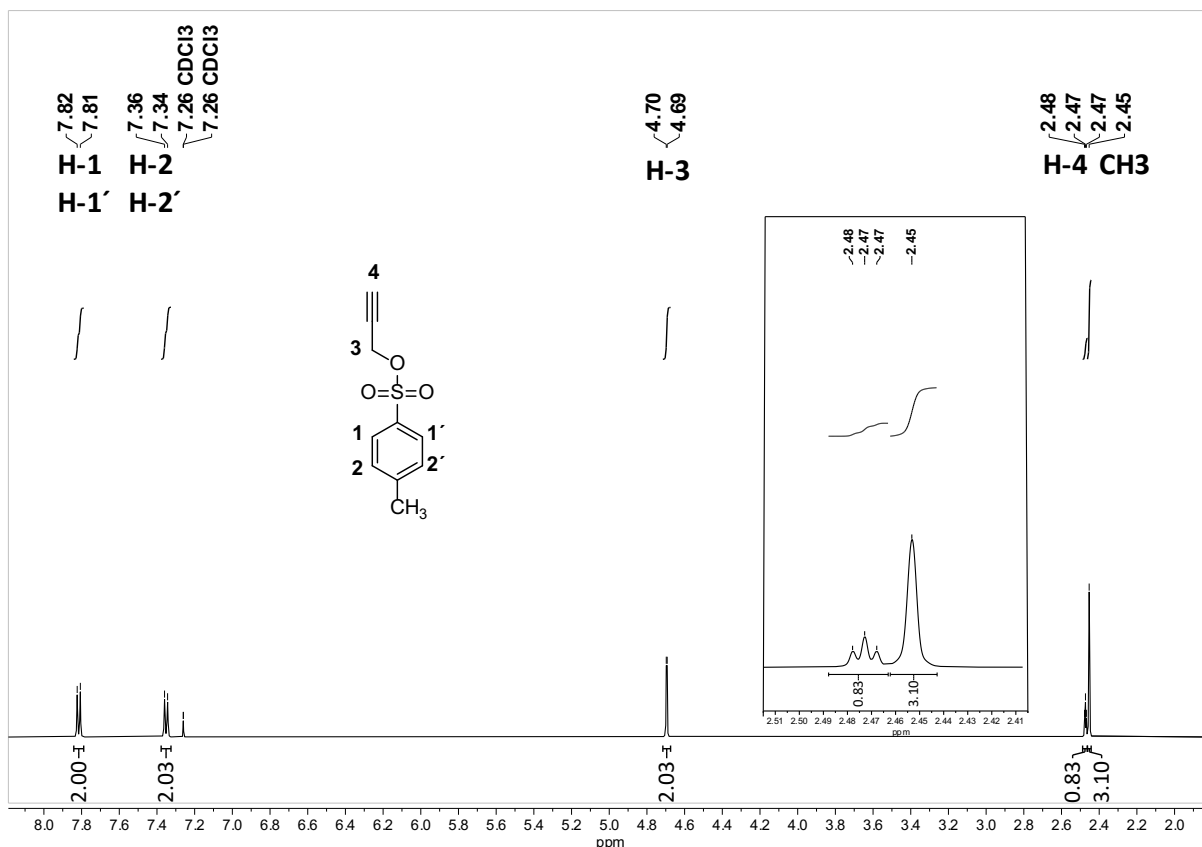


Figura 2.57 RMN ^1H (CDCl_3 , 500MHz) del compuesto **propargil-tosilato**.

El segundo paso de sustitución nucleofílica se realiza mezclando la 4-aminoetilbenzosulfonamida y el tosilato en acetonitrilo y se adicionan gotas de DMF hasta disolución de los reactivos. Luego se adiciona DIPEA y se agita durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego del work-up y purificación por cromatografía en columna obtenemos el producto con un rendimiento del 28 %.

El espectro de RMN protónico del ligando **L-Amina** (Figura 2.58) muestra el mismo comportamiento que para los ligandos **L-Éster** y **L-Amida** respecto a los protones aromáticos H-1/1' y H-2/2' junto con los protones involucrados en el grupo CH₂ del propargilo H-5 y H-6. Los protones H-3 y H-4 se identifican como un multiplete que integra para cuatro protones (2+2) en la zona de 2,76-2,80 ppm y muestra un patrón de desdoblamiento complejo.

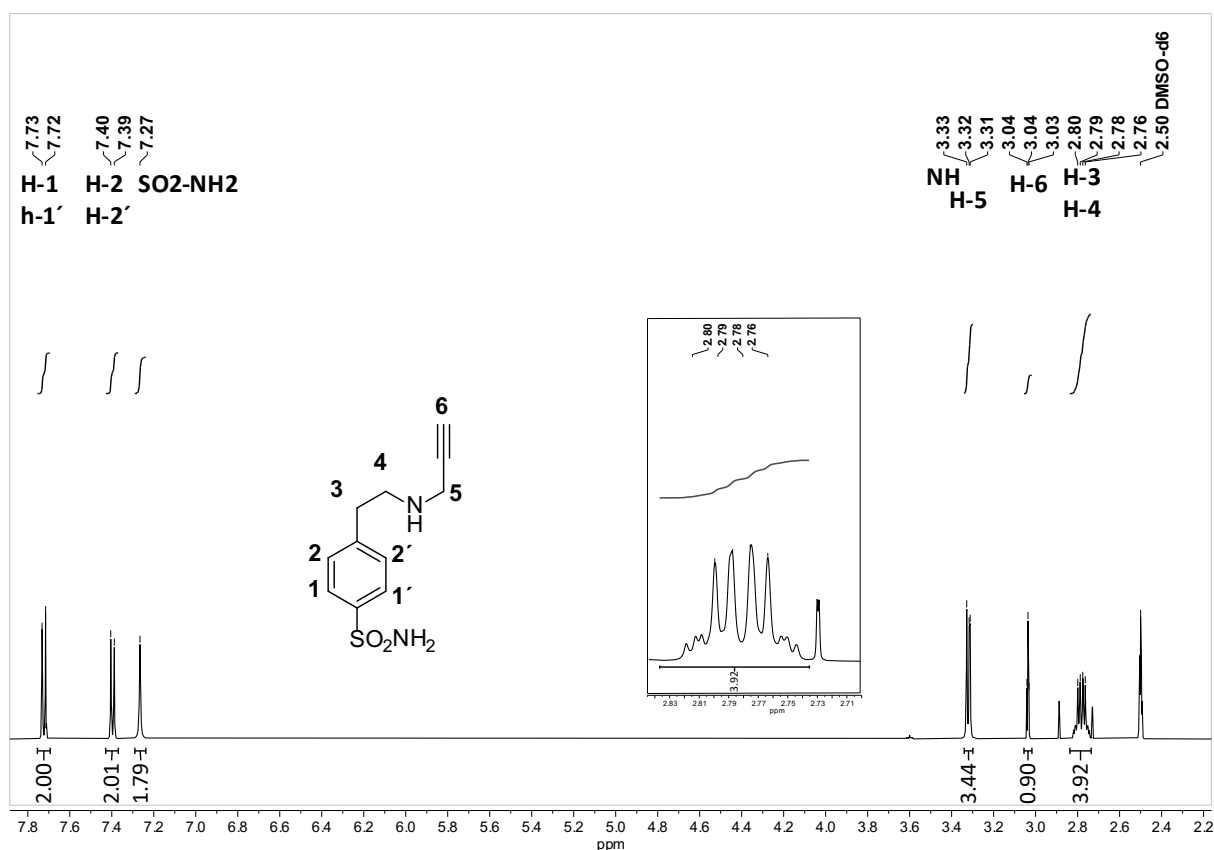


Figura 2.58. RMN ^1H (DMSO-d_6 , 500MHz) del ligando **L-Amino**.

2.3.2.2. Sondas derivadas de hCAII-BDP

Una vez obtenidos los ligandos funcionalizados se realiza la reacción de Sonogashira para obtener las sondas selectivas de hCAII usando como fluoróforos los BODIPYs precursores obtenidos en el capítulo 2.2 (**Br-BDP (1)** y **I-BDP (2)**)

Partiendo de I-BDP (2)

Para llevar a cabo este acoplamiento, se toma como referencia los protocolos reportados en bibliografía para ioduros de arilo (Figura 2.59.A).³⁵ En un vial cónico purgado con N_2 y sellado se mezcla el I-BDP, el ligando a acoplar y $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$. Paralelamente se burbujea N_2 en una mezcla de trietilamina/ dimetilformamida (TEA/DMF) 1:1. Finalmente se adiciona CuI al vial cónico y se traspasa con una jeringa o cánula la mezcla TEA/DMF. La reacción se sumerge en un baño a 80 °C durante dos horas. Se usa este protocolo general para las tres sondas sintetizadas a partir del **I-BDP**.

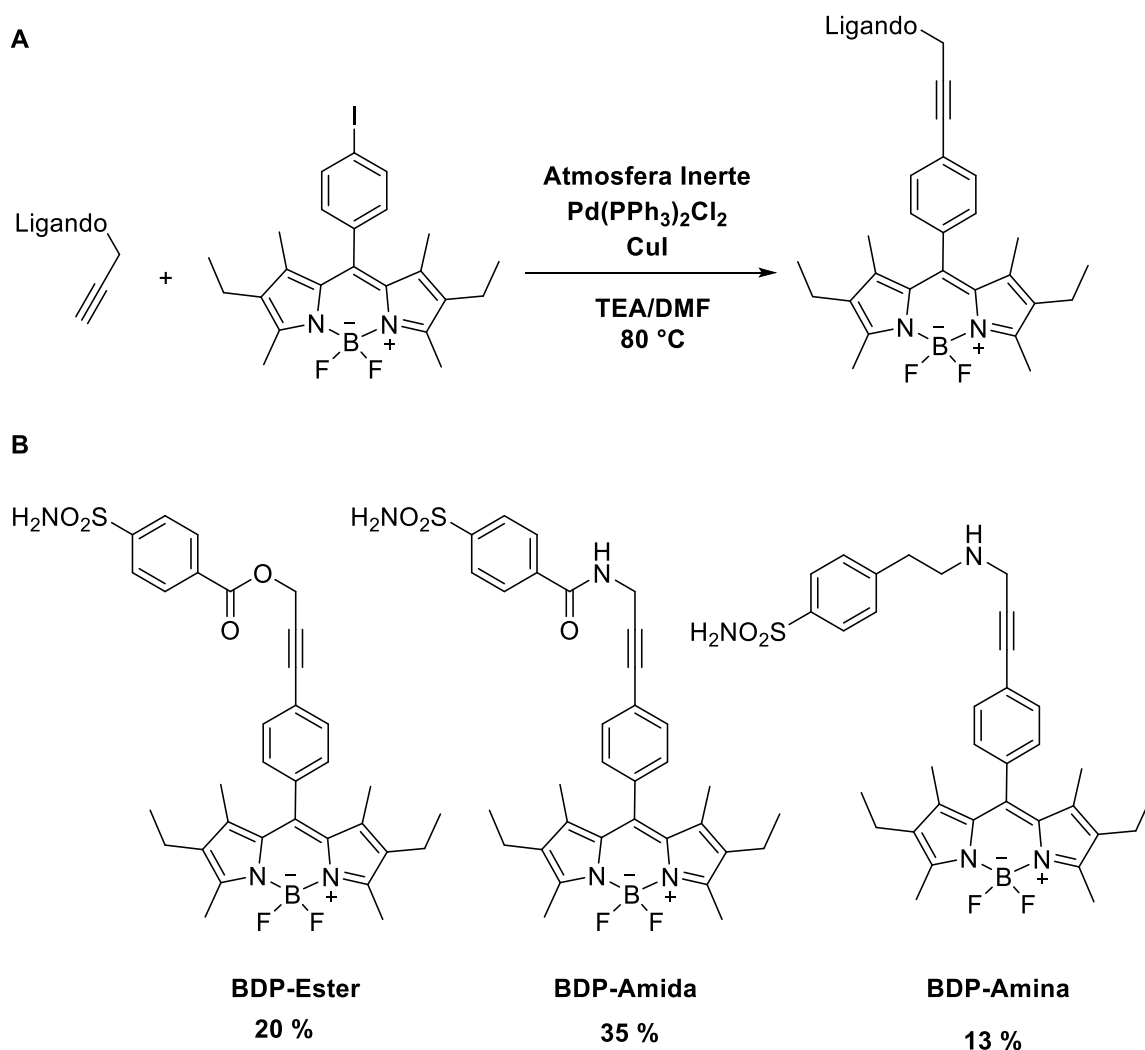


Figura 2.59 A) Condiciones de los acoplamientos de Sonogashira entre **I-BDP** y los ligandos de hCAII; B) Sondas derivadas de BODIPYs selectivas para hCAII.

Para la síntesis de la sonda **BDP-Amida** se usa el protocolo general descrito arriba, y como work-up se evapora el crudo de reacción y se lo filtra por un lecho de celite. El crudo obtenido es insoluble en los distintos solventes orgánicos utilizados, y muy polar por lo que se realiza una primer cromatografía flash en fase reversa, usando un gradiente de elución que va de Metanol/Agua 1:1 a 90% de metanol. Luego se realizan varias cromatografías en capa delgada preparativa con una fase móvil compuesta de Diclorometano/Metanol 92:8 para obtener finalmente el producto en un 35% de rendimiento.

El espectro de RMN protónico de la sonda **BDP-Amida** (Figura 2.60) muestra el comportamiento esperado para los protones aromáticos H-9/9' y H-8/8' del ligando **L-Amida** (8,03 y 7,93 ppm; $J = 8,7$ Hz) y los

correspondientes al bencilo de la posición meso del BODIPY, H-6/6' y H-5/5' (7,62 y 7,37 ppm; $J = 8,5$ Hz). La señal diagnóstica para la identificación de la sonda es la ubicada en 4,38 ppm asignada al metileno H-7. Esta señal en el ligando **L-Amida** es un doblete puesto que acopla con el protón alquínico terminal y con el correspondiente a la amida. En este caso, la multiplicidad del H-7 es solo un doblete con una constante de acoplamiento $J = 5,47$ Hz congruente con un acoplamiento $\text{CH}_2\text{-NH}$ sin mostrar acoplamiento con un protón alquínico terminal dado que el alquino ha reaccionado con el anillo aromático del BODIPY.

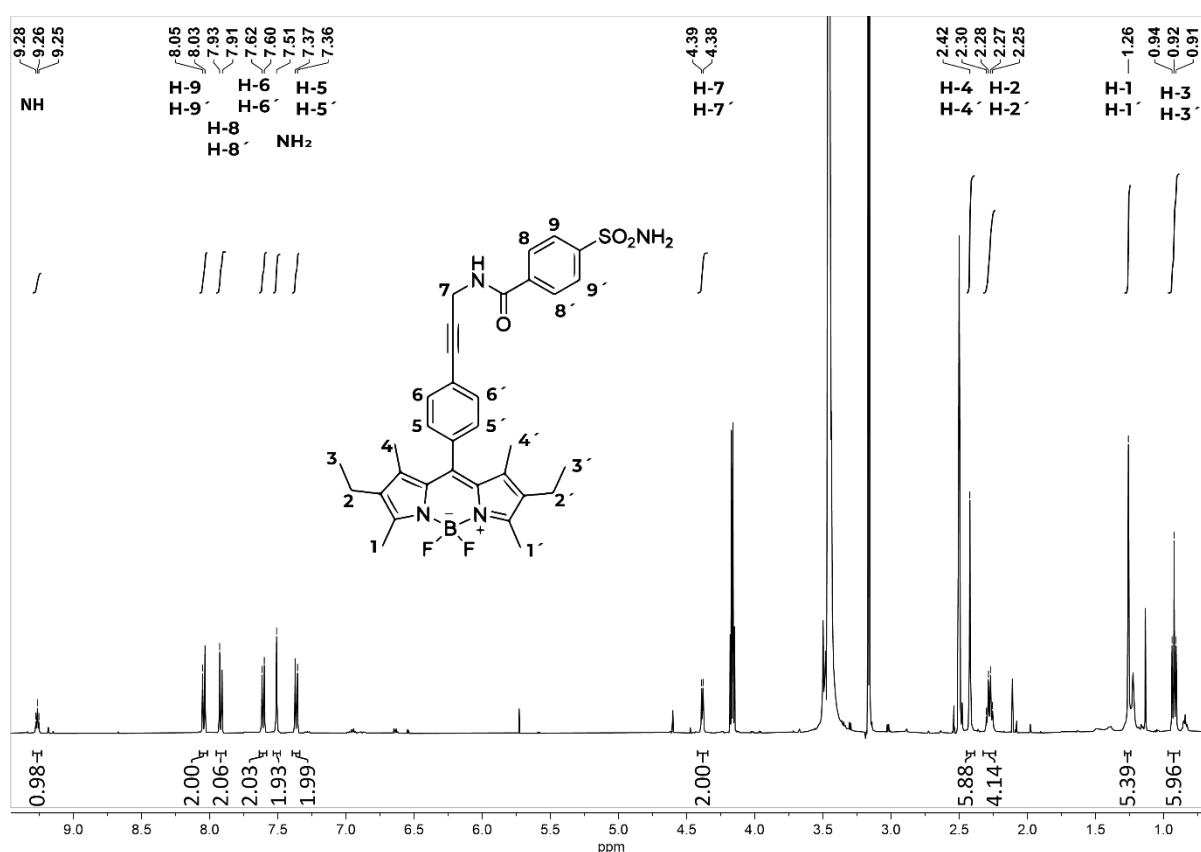


Figura 2.60. RMN^{1H} ($\text{DMSO-}d_6$, 500MHz) de la sonda **BDP-Amida**.

Las señales alifáticas correspondientes a la estructura del BODIPY tienen el comportamiento esperado y son similares a las del **I-BDP** (Figura 2.9).

La síntesis del **BDP-Éster** es similar a la de **BDP-Amida**, sin embargo, la purificación se lleva a cabo realizando múltiples cromatografías en capa delgada preparativa sin pasar previamente por una fase reversa. Se obtiene un 20% de rendimiento del producto buscado.

Cabe destacar que los productos obtenidos son considerablemente insolubles en la mayoría de los solventes orgánicos, pero también en agua y

en las purificaciones se produce una marcada difusión de productos fluorescentes tanto en la columna cromatográfica como en la CCD preparativa, incluso adicionando ácidos o bases al solvente de corrida.

El acoplamiento entre el ligando **L-Amina** y el fluoróforo **I-BDP** se realiza de la misma manera que sus dos análogos descritos antes, y la purificación se realiza mediante cromatografía flash en fase normal usando un gradiente de Diclorometano/Metanol de 0 a 10% del solvente más polar obteniendo un 13% de rendimiento en el producto deseado.

Por otro lado, se explora una alternativa de síntesis (Figura 2.61) que consiste en acoplar primero el alcohol propargílico al **I-BDP** dando lugar al compuesto BDP-Propargilo **16** y luego realizar la tosilación de este para obtener el compuesto BDP-Ts **17**. Seguidamente, se realiza la sustitución nucleofílica usando el reactivo 4-aminoetilbenzosulfonamida:

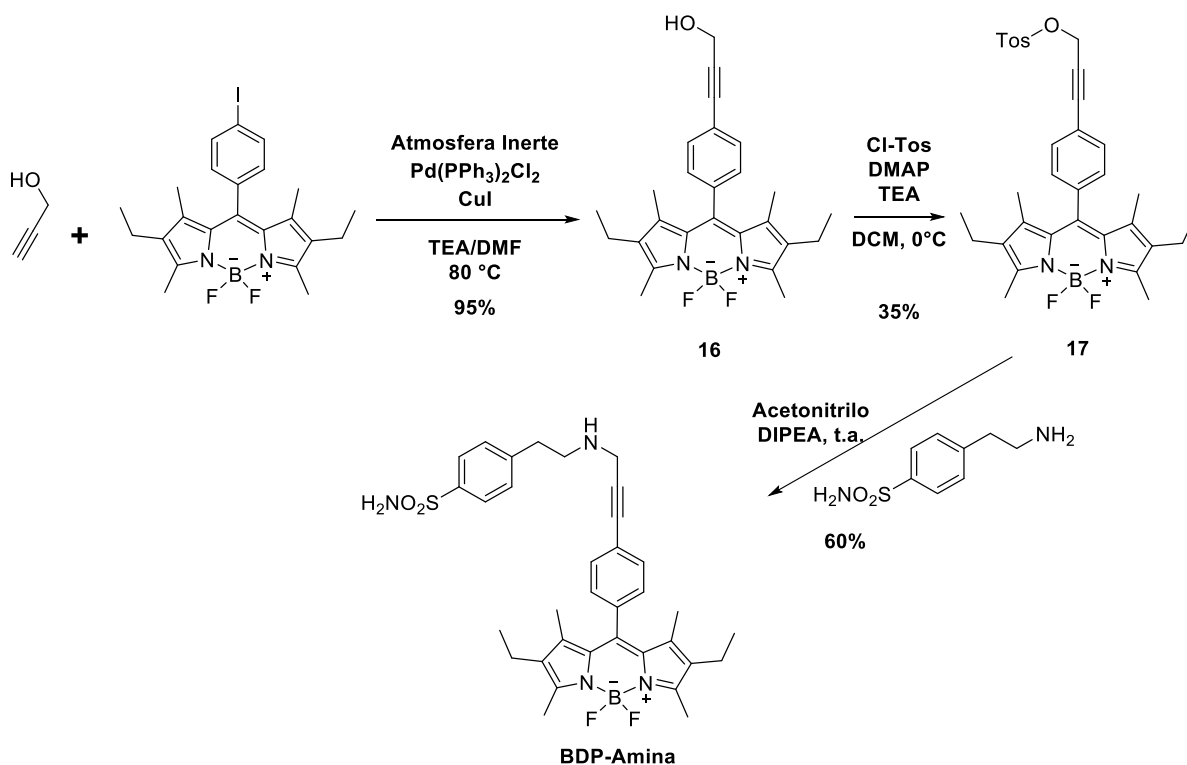


Figura 2.61. Ruta alternativa para la síntesis de la sonda **BDP-Amina**.

El acople entre el alcohol propargílico y el **I-BDP** obteniéndose un 95 % de rendimiento del producto BDP-Propargilo **16**. Posteriormente se lleva a cabo la tosilación de este, agitando a 0°C en DCM seco y adicionando a la mezcla, cloruro de tosilo, TEA y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) por dos horas. Luego de purificar por cromatografía líquida se obtiene el producto BDP-Ts **17** en un 35 % de rendimiento

Finalmente se realiza la sustitución nucleofílica mezclando la 4-Aminoetilbenzosulfonamida y el BDP-Ts **17** en acetonitrilo. Se adicionan gotas de DMF hasta disolución de los reactivos y luego se adiciona DIPEA. La mezcla se agita durante toda la noche a temperatura ambiente dando un rendimiento del 60% tras purificación.

Si se consideran los rendimientos de ambas rutas partiendo del propargil alcohol, la ruta alternativa rinde un 21% mientras que la directa un 2%, lo que representa una notable mejora. Es importante remarcar que el rendimiento de la reacción de Sonogashira entre **I-BDP** y alcohol propargílico, es mucho más eficiente (95%) que los acoplamientos realizados usando las sulfonamidas funcionalizadas. En gran parte el bajo rendimiento de estas reacciones podría asociarse a la alta insolubilidad de la benzosulfonamidas, tanto en la mezcla de reacción como a la hora de realizar las purificaciones, incluso usando cromatografía en fase reversa.

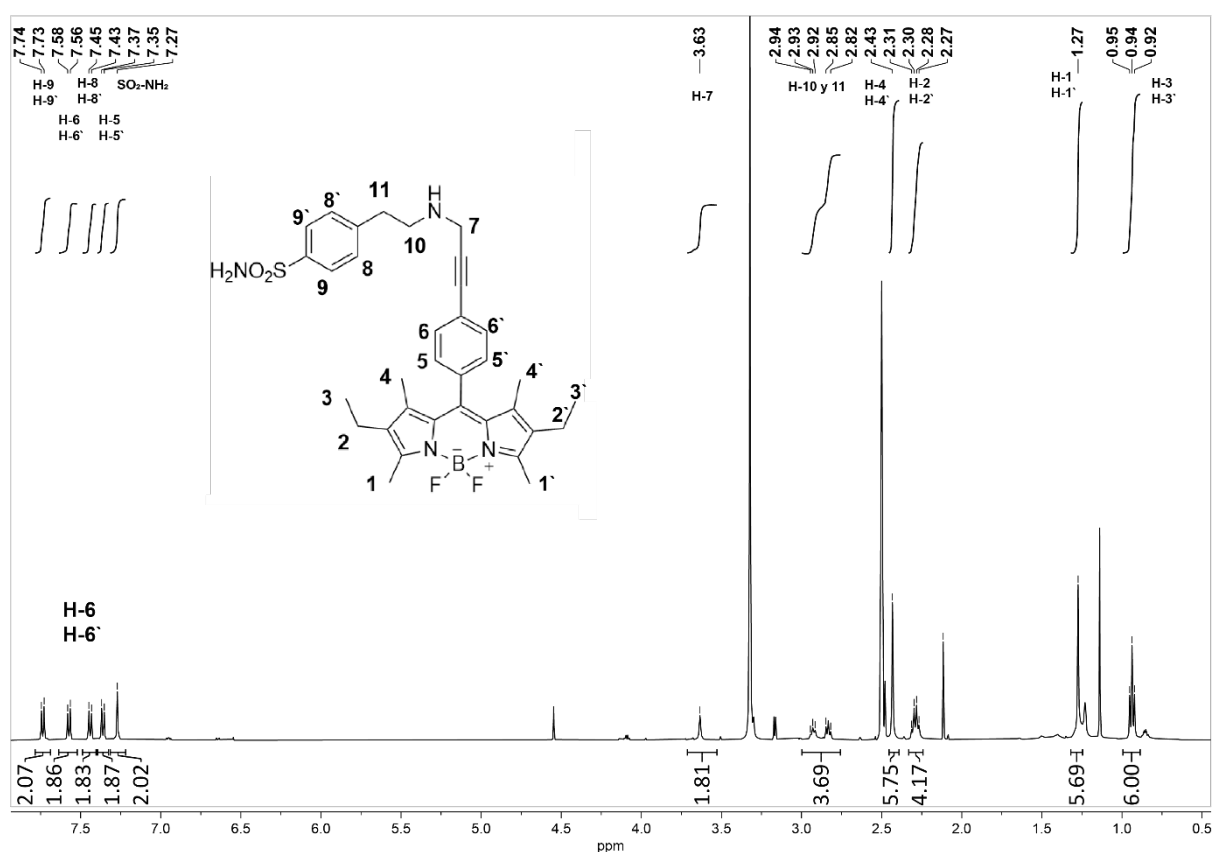


Figura 2.62. RMN ¹H (DMSO-d₆, 500MHz) de la sonda **BDP-Amina**.

El espectro de RMN protónico de la sonda **BDP-Amina** (Figura 2.62) muestra concordancia en los desplazamientos respecto a los espectros aislados de **L-Amina** y **I-BDP**. Desde el punto de vista de la multiplicidad, se replica el mismo comportamiento que en **L-Amida**, en donde el metileno

(H-7) que se encuentra entre el grupo alquino y el amino (H-7) pasa de ser un doblete en el ligando, a un singulete en la sonda.

Partiendo de Br-BDP

La mayoría de las referencias bibliográficas para este tipo de acoplamientos en BODIPYs están referenciadas al **I-BDP**, pero existe una escasa cantidad de publicaciones con **Br-BDP**. Luego de realizar varios intentos de acoplamientos usando las mismas condiciones que para **I-BDP**, se obtuvieron rendimientos muy bajos, menores a un 5 %. Es por esto por lo que se decide explorar la reactividad de esta molécula para poder encontrar de manera racional, condiciones de reacción que sean favorables, puesto que el protocolo de reacción no es transferible del **I-BDP** al **Br-BDP**.

Para encontrar condiciones de reacción efectivas para la reacción de Sonogashira con **Br-BDP**, se realiza una investigación bibliográfica. Habitualmente se suele asociar la reactividad de los halogenuros de arilo, a la fuerza de enlace X-Ar de este. Analizando estos valores, es evidente que el enlace I-Ar es el más débil ($I = 272$, $Br = 337$, $Cl = 402$ KJ.mol⁻¹). Sin embargo, en 2008, Heiden⁴² realizó estudios cinéticos de la reacción de Sonogashira y reveló que la diferencia en la reactividad no se correlaciona estrictamente con las variaciones en la fuerza de estos enlaces.

Por otro lado, Heiden encontró que la reactividad disminuye para halogenuros de arilo sustituidos con sustractores de carga en la posición *para*. Cabe mencionar que esta tendencia depende del tipo de halogenuro. La reactividad de los ioduros es menos sensible a los efectos electrónicos, mientras que los cloruros muestran una variabilidad significativa relacionada con el grado de activación. Los bromuros son más propensos a comportarse como los ioduros bajo la influencia de sustractores de carga y similares a los cloruros en el caso contrario. Este pivoteo de los bromuros se encuentra correlacionado con las entropías de activación. Si bien, Heiden y otros autores realizan diferentes hipótesis sobre el mecanismo en relación con los halogenuros de arilo, no hay un consenso ni pruebas experimentales concretas.^{43, 44}

En lo que respecta al **Br-BDP** se lo puede considerar un bromuro deficiente en electrones puesto que el grupo BODIPY es un sustractor de carga⁴⁵. Siguiendo la línea de lo encontrado por Heiden, se esperaría una elevada reactividad de este sustrato respecto a la reacción de Sonogashira, pero la evidencia experimental demuestra lo contrario.

Para poder racionalizar este hecho se realizan simulaciones computacionales para encontrar cuan desactivada se encuentra la zona del bromuro de arilo en el **Br-BDP** en relación con otros bromuros de arilo que se usarán como referencia y así encontrar una correlación con la reactividad. Para esto se eligió el enfoque de la teoría del funcional de densidad (DFT) y se calculó la superficie de potencial electroestático (ESP) (ver capítulo 3.2.3 para detalles). El potencial electroestático se encuentra definido como el trabajo necesario para mover una carga puntual desde un punto de referencia a otro dentro de un campo electromagnético:

$$V(\mathbf{r}) = \sum_A \frac{Z_A}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{r}|} - \int \frac{\rho(\mathbf{r}') d\mathbf{r}'}{|\mathbf{r}' - \mathbf{r}|}$$

Esta magnitud aislada puede ser visualizada como la densidad electrónica en cierto punto. La ESP es una representación tridimensional en la que se gráfica el potencial electroestático en torno a la topología molecular. Regiones con potenciales positivos (rojo) tienden a interactuar favorablemente con nucleófilos, y regiones negativas (azul) con electrófilos.

Se usan las ESP de tres bromuros de arilo con diferentes grados de activación/desactivación como referencia: 4-bromoanisol (**4-OMe**), 4-bromonitrobenzoceno (**4-Nitro**) y bromobenceno (**4-H**). Luego se calcula la ESP para el **Br-BDP** para así ubicarla en algún punto entre las moléculas de referencia usadas como validación del método.

La ESP mostrada en la figura 2.63 muestra una densidad de carga en la región del bromo que se hace más negativa (azul) a medida que aumenta el poder donante de carga de grupos sustituyentes en *para*, es decir, se hace más negativa al ir de **4-Nitro** a **4-OME** pasando por **4-H**.

Esta observación valida la efectividad del método computacional ya que es el comportamiento que se observa experimentalmente. Por otro lado, para **Br-BDP**, se puede identificar que, si bien el esqueleto del BODIPY es un grupo sustractor de carga, no es tan eficiente como el grupo nitro, puesto que la región del bromuro en el **Br-BDP** se encuentra ortogonal al esqueleto del BODIPY. Esto explicaría en principio la disminuida reactividad observada.

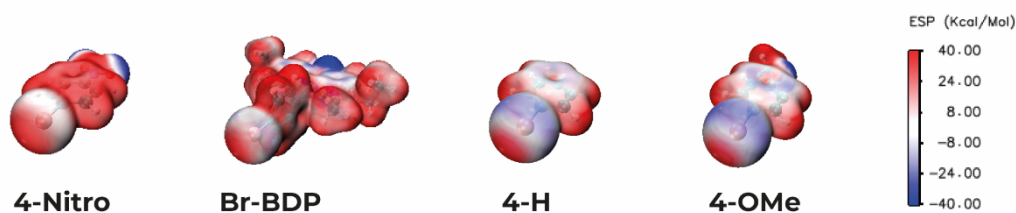


Figura 2.63. ESP para la serie **4-Nitro**, **Br-BDP**, **4-H** y **4-OMe**.

Una alternativa al estudio de la ESP es el análisis de los orbitales moleculares de frontera (FMO por sus siglas en inglés, frontier molecular orbital). En el reporte de Heiden, se encuentra una correlación entre la energía del orbital molecular de mayor energía ocupado (HOMO) y la entalpía de activación, lo que se traduce en una mayor reactividad. Al analizar las energías de los FMOs (Figura 2.64) se puede determinar que la energía del orbital HOMO -3 (-7,29 eV) de **Br-BDP** (que es el orbital predominante en el anillo aromático) cae a energías intermedias entre el **4-Nitro** (-7,51 eV) y **4-H** (-7,09 eV). Este resultado refuerza la conclusión obtenida al analizar la ESP.

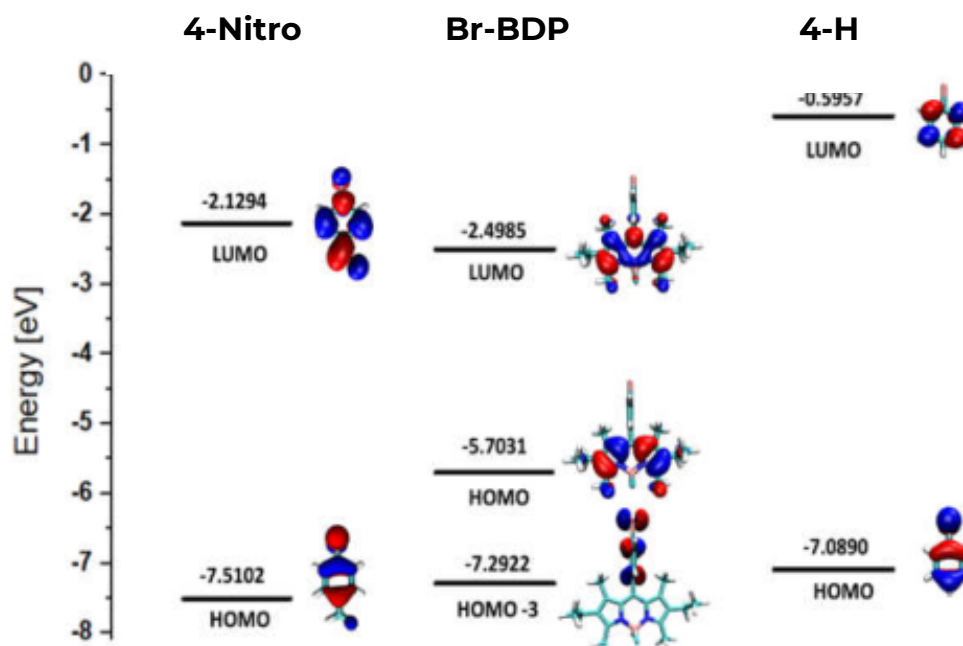


Figura 2.64. Diagrama de FMOs para las moléculas **4-Nitro**, **Br-BDP** y **4-H**.

En conclusión, a partir de las simulaciones computacionales se pudo determinar que el **Br-BDP** muestra una menor deficiencia electrónica que lo esperado y por ende la reactividad se distancia de los ioduros de arilo. Es por esto por lo que para encontrar condiciones de reacción adecuadas se deben adaptar los protocolos y usar procedimientos que favorezcan la

reactividad para bromuros de arilo parcialmente desactivados respecto a la reacción de Sonogashira.

Gu muestra que para bromuros de arilo sustituidos con grupos carboxilos, existe una marcada dependencia del rendimiento con la temperatura y que a partir de 85 °C la reacción se completa en un 85%.⁴⁶ Por otro lado, encuentra condiciones de reacción para este tipo de bromuros de arilo que consta en eliminar el CuI como co-catalizador, y adicionar piperidina (10 equivalentes). El autor muestra también que, para los ioduros de arilo, la temperatura no afecta tan marcadamente a los rendimientos del acoplamiento, en sintonía con el reporte de Heiden. Con el fin de encontrar las condiciones de reacción adecuadas para acoplar el **Br-BDP**, se exploran cuatro condiciones de reacción que constan de variar la temperatura, catalizador, base y solvente.

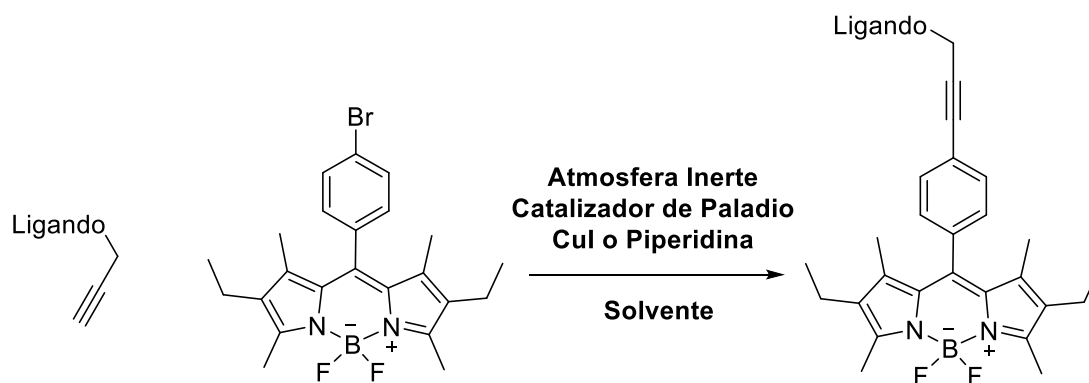


Figura 2.65. Acoplamiento entre Br-BDP y distintos ligandos probando condiciones de reacción.

Tabla 2.1. Condiciones de reacción para el acople de **Br-BDP** y **L-Amida/Amina**. Se utiliza un reactor sellado en todos los casos

Condición	Catalizadores	Solvente	Temp. (°C)	Ligando	R (%)
1	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (8 mol %) CuI 8 mol %	TEA	70	L-Amida	trazas
2	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ (8 mol %) CuI 8 mol % TEA 10 eq	THF	70	L-Amida	2
3	Pd(PPh ₃) ₄ 8 mol % CuI 8 mol %	ACN	70	L-Amida	5
4	PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ piperidina 10 eq	THF	85	L-Amina	25%

En la condición 1, se utiliza TEA como solvente, mientras que en la condición 2 se usa el mismo catalizador, pero THF como solvente. En la condición 3 se lleva a cabo un cambio tanto en el catalizador de paladio como en el solvente. Estas tres reacciones se realizaron a 70 °C. La condición 4 reproduce condiciones experimentales reportadas por Gu.

Si bien los rendimientos aumentan hasta el 25%, valor más cercano a los acoplamientos con **I-BDP**, no se reproducen los citados en bibliografía. La utilización de sulfonamidas presenta varias complicaciones experimentales, previamente mencionadas como una baja solubilidad en solventes orgánicos, tanto polares como no polares, y una elevada polaridad. Estas características, junto con la pequeña escala de trabajo y la complejidad de los crudos obtenidos, afectan el rendimiento final. Durante los pasos de purificación, especialmente al realizar cromatografía, el compuesto tiende a precipitar, dispersándose a lo largo de todo el camino de elución.

Como conclusión, se lograron obtener tres sondas específicas para hCAII usando BODIPYs como fluoróforo con linkers de diferente longitud y funcionalidad. Se exploró la reactividad de la reacción de Sonogashira usando **I-BDP** y se estudió la reactividad del **Br-BDP** en dicha reacción, encontrándose condiciones adecuadas para los acoplamientos a partir de ambos fluoróforos.

2.3.2.3. Sondas derivadas de hCAII-Cromona

Se sintetizan las sondas específicas de hCAII derivadas de 3HC con los ligandos **L-Amida** y **L-Amina**. Es importante tener en cuenta que para las 3HCs no se pueden utilizar temperaturas de reacción mayores a 80 °C, ya que, en medio básico, como el utilizado en la reacción de Sonogashira, el fluoróforo tiende a descomponerse.

Sonda 3HC-Amino

El acoplamiento entre **Br-3HC** y **L-Amina** se realiza usando el protocolo de Sonogashira para bromuros explorado en la sección 2.3.2.2 (Figura 2.66). En un vial cónico purgado con N₂ se disuelve en THF el **Br-3HC**, **L-Amina**, PdCl₂(PPh₃)₂ y finalmente 10 equivalentes de piperidina. Como las 3HCs son poco estables a altas temperaturas, se decide llevar a cabo la reacción a 75°C. Luego de dos horas se finaliza la reacción evaporando el solvente. La purificación se lleva a cabo haciendo una primera separación en columna por cromatografía normal usando DCM/Metanol como solvente de corrida.

El producto no se obtiene con gran pureza por lo que se realizan múltiples cromatografías en placa preparativa. Se obtiene la sonda **3HC-Amina** con un rendimiento del 6%. Los bajos rendimiento se pueden atribuir a la limitación de la temperatura, que no puede superar los 80°C debido a la descomposición del fluoróforo, y la insolubilidad de la sulfonamida.

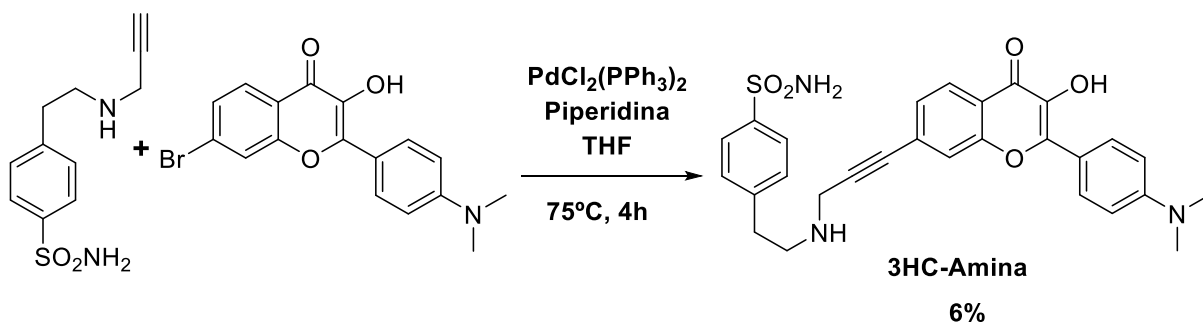


Figura 2.66 Síntesis de **3HC-Amina** a partir de **L-Amina** y **Br-3HC**.

El espectro de RMN protónico de la sonda **3HC-Amina** (Figura 2.67) muestra concordancia en los desplazamientos respecto a los espectros aislados de **L-Amino** y **Br-3HC** (Figura 2.58 y 2.38). Las señales de los protones H-5, H8 y H6 correspondientes al esqueleto de la 3HC se pueden resolver correctamente y se ubican en los desplazamientos 8,02, 7,79 y 7,41 ppm respectivamente. Los protones correspondientes a los metilenos del ligando, H-12 y H-13 muestran una forma similar a los que se observan en la sonda **BDP-Amina** (Figura 2.62), mientras que los protones metilénicos H-11 resultan en un singulete, prueba de que el alquino terminal ha reaccionado. Por otro lado, se pueden identificar los protones del grupo sulfonamida en 7,27 ppm.

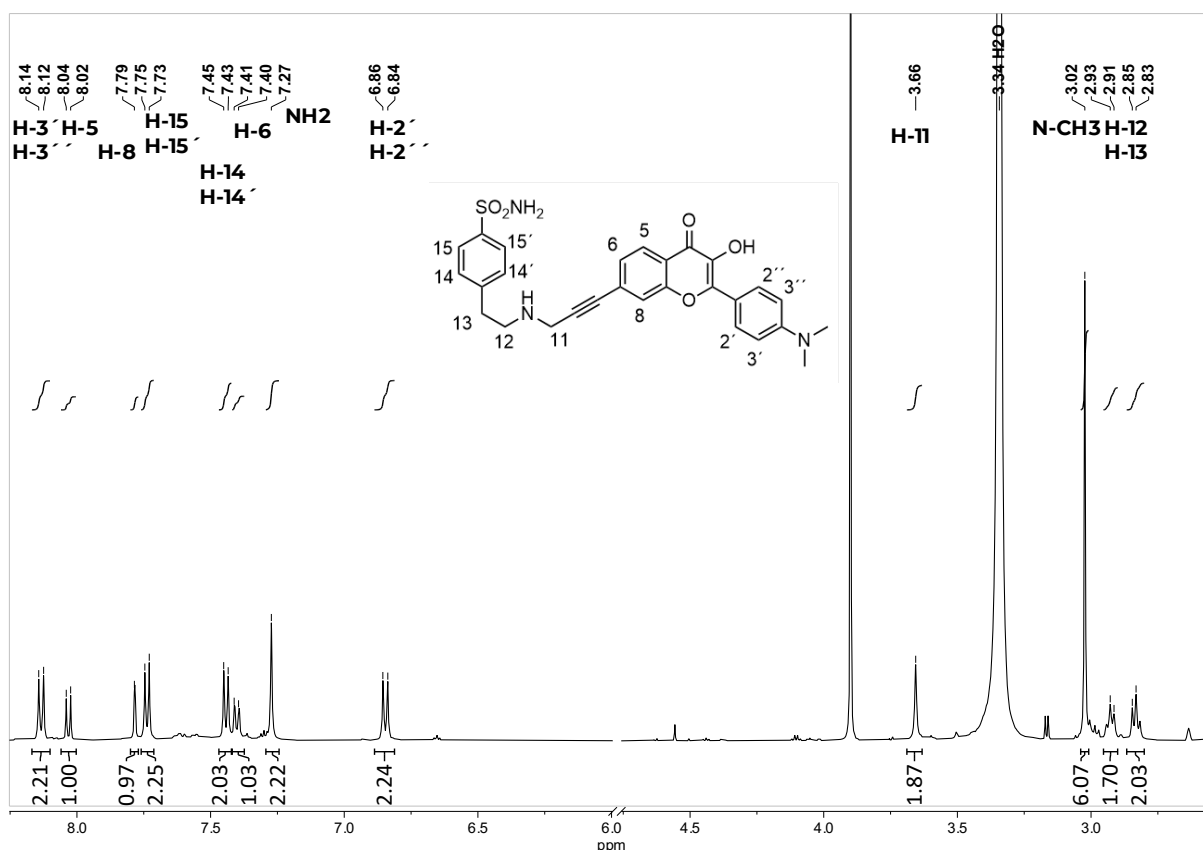


Figura 2.67 RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500MHz) de la sonda **3HC-Amina**.

Sonda 3HC-Amida

El acoplamiento entre **Br-3HC** y **L-Amida** se realiza utilizando el protocolo previamente descrito para la síntesis de **3HC-Amina**. La purificación se lleva a cabo sin un *work-up* previo, haciendo una primera separación en columna por cromatografía normal usando Diclorometano/Metanol como solvente de corrida. Posteriormente se realiza una segunda purificación en columna flash de fase reversa usando Metanol/Agua como solvente de corrida. Para obtener el producto con mayor grado de pureza se realizan varias purificaciones utilizando cromatografía en placa preparativa. Se obtiene el producto con rendimientos estimados menores al 5% de rendimiento.

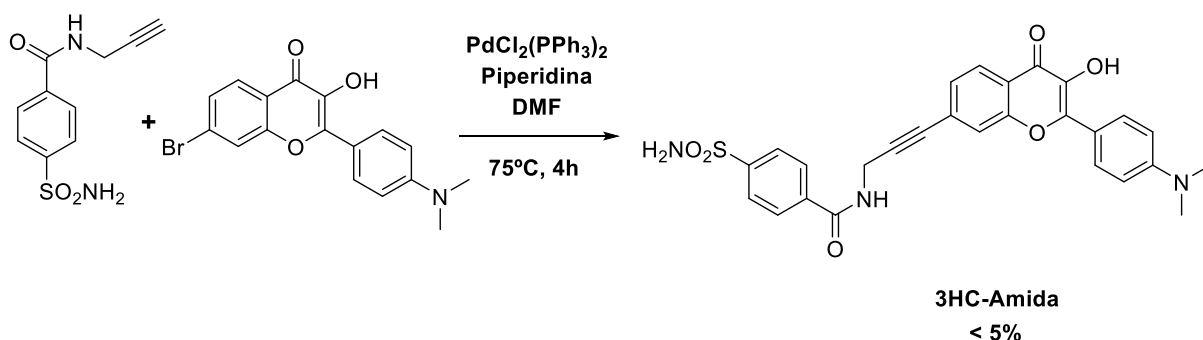


Figura 2.68 Síntesis de **3HC-Amida** a partir de **L-Amida** y **Br-3HC**.

El espectro de RMN protónico de la sonda **3HC-Amida** (Figura 2.69) muestra un patrón de señales similares al de la sonda **3HC-Amina**. En este caso las señales aromáticas H-13/13' del fragmento benzosulfonamida en 8,05 ppm se solapan con el protón H-5 del esqueleto de la 3HC. El resto de las señales se identifican y son coherentes en desplazamiento y en acoplamiento. La señal del hidrogeno H-11 acopla con el NH del grupo amida como ocurre en la sonda **BDP-Amida** y el ligando **L-Amida**. En la zona de 7,6 ppm se identifican las señales características del catalizador $\text{Pd}_2\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)_2$ como impureza.

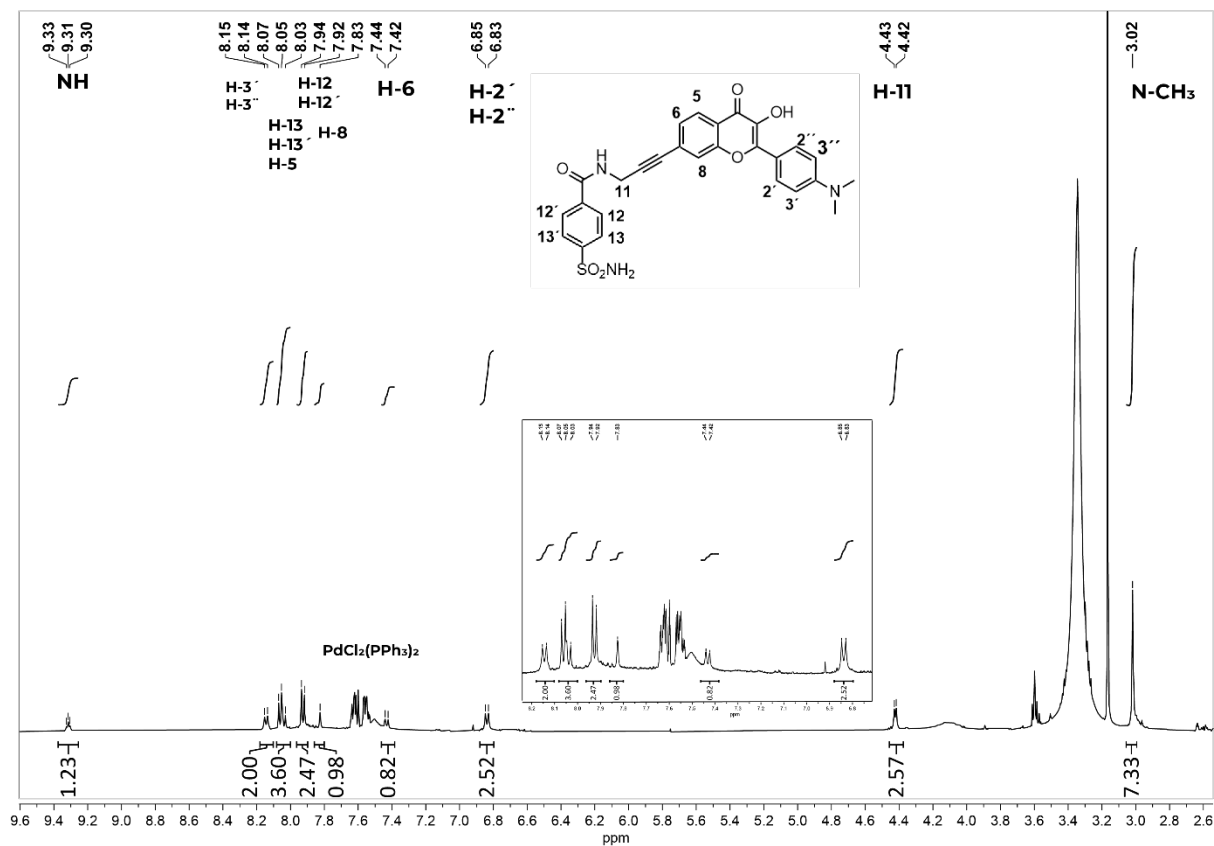


Figura 2.69 RMN ^1H (DMSO-d_6 , 500MHz) de la sonda **3HC-Amida**.

2.3.3. Sonda selectiva para proteínas de unión a ácidos grasos (FABP)

Otro sistema propuesto a estudiar es la proteína de unión a ácidos grasos (FABPs, por sus siglas en inglés). Estas proteínas desempeñan un papel crucial en la coordinación de las respuestas lipídicas dentro de las células y su función se encuentra estrechamente relacionada con diversas vías metabólicas e inflamatorias. De los nueve tipos de FABPs presentes en esta familia en esta tesis se utilizará como blanco la FABP2 (o intestinal).⁴⁷

Los ligandos más estudiados para las FABPs son los ácidos grasos de cadena larga. Para este caso se utilizará uno de 5 carbonos, que presenta un alquino terminal y fue adquirido comercialmente (Figura 2.70).

2.3.3.1. Sonda BDP-Ac

El acoplamiento entre Br-BDP y el ligando de FABP-2 se realiza usando el protocolo de Sonogashira para bromuros previamente explorado (Figura 2.70). En un vial cónico purgado con N₂ se disuelve en THF el **Br-BDP**, ácido 5-hexinoico, PdCl₂(PPh₃)₂ y finalmente 10 equivalentes de piperidina. La reacción se sumerge en un baño a 85°C durante tres horas. Luego de este periodo de tiempo se evapora el crudo, y se lo disuelve en DCM. Posteriormente se acidifica la solución con HCl 15% V/V y se realizan extracciones con DCM. La purificación se realiza por cromatografía líquida en columna flash utilizando un gradiente de ciclohexano, acetato de etilo y un 1% de ácido acético para obtener el producto en un 40% de rendimiento del producto puro.

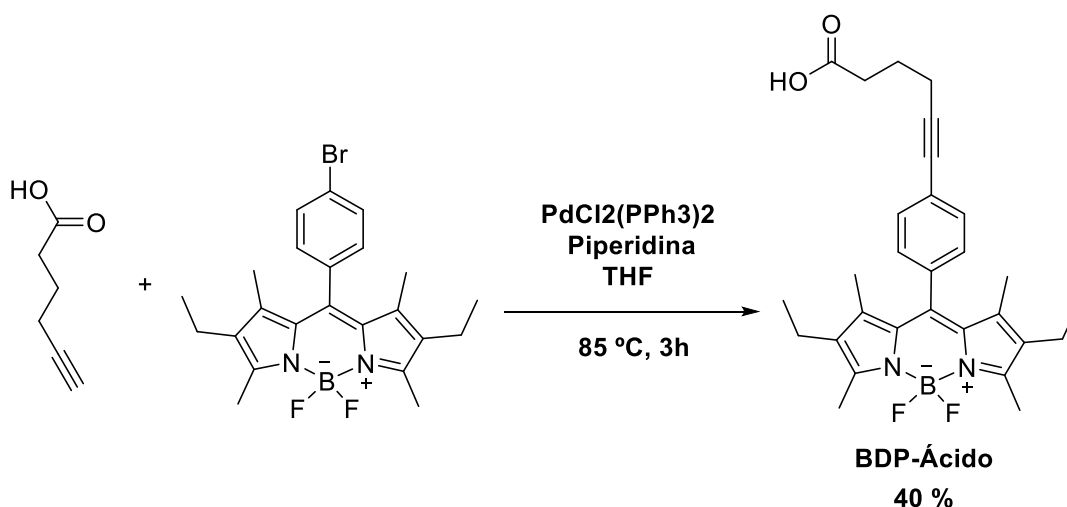


Figura 2.70. Síntesis de **BDP-Ácido** a partir de **Br-BDP** y ácido 5-hexinoico.

El espectro de RMN protónico de la sonda **BDP-Ácido** (Figura 2.71) muestra el comportamiento esperado tanto para los fragmentos del BDP como para los del ácido 5-hexinoico. Las señales metilénicas correspondientes a H-7, H-8 y H-9 coinciden con los reportados en bibliografía para el ligando libre,⁴⁸ y en el espectro medido se encuentra una correlación lógica con la multiplicidad de señales, puesto que H-7 y H-9 se muestran como tripletes con $J = 7,1$ Hz y $7,0$ Hz respectivamente, congruente con las constantes de acoplamiento de la señal asignada a H-8 en 1,98 ppm correspondiente a un doble triplete superpuesto.

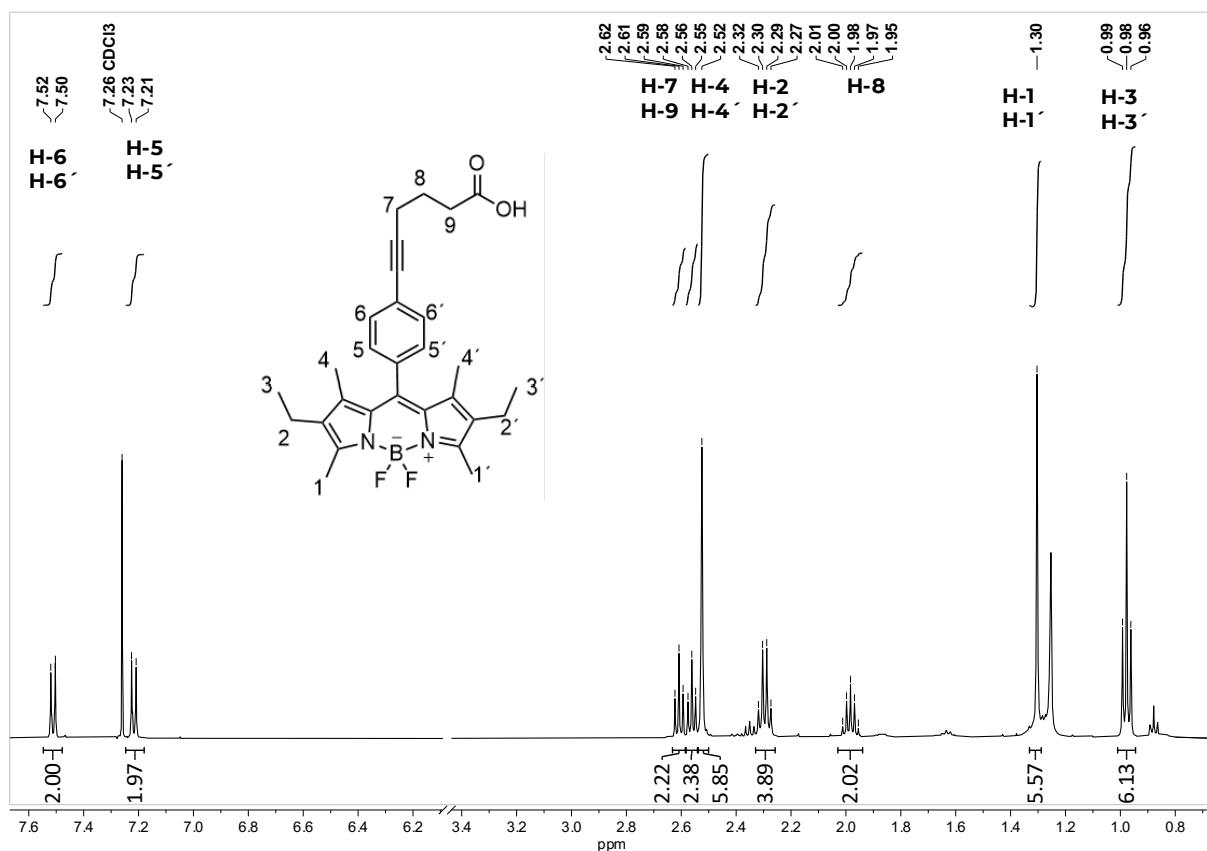


Figura 2.71 RMN ¹H (CDCl₃, 500MHz) de la sonda **BDP-Ácido**.

2.3.4. Sonda derivada de morfolina

En el marco de una colaboración se sintetiza una última sonda derivada de BODIPY que consiste en el acoplamiento entre el **I-BDP (2)** y el ligando N-propargilmorfolina para dar lugar a la sonda **BDP-Morfolina** (Figura 2.72). Las sondas derivadas de morfolina se utilizan habitualmente para realizar mediciones en liposomas.⁴⁹

Para obtener la sonda **BDP-Morfolina** se utiliza el protocolo general descrito en la sección 2.3.1 y se usa como reactivos I-BDP y propargil

morfolina comercial. Luego de tres horas de reacción y de comprobar desaparición del alquino por CCD se evapora el crudo de reacción y se lo filtra por un lecho de celite. La purificación se realiza por cromatografía flash en columna usando como fase fija sílica normal y como fase móvil se utiliza un gradiente de Ciclohexano/Acetato de etilo que comienza en 0 y llega hasta 60% del solvente más polar. El producto se obtiene con un rendimiento del 29%.

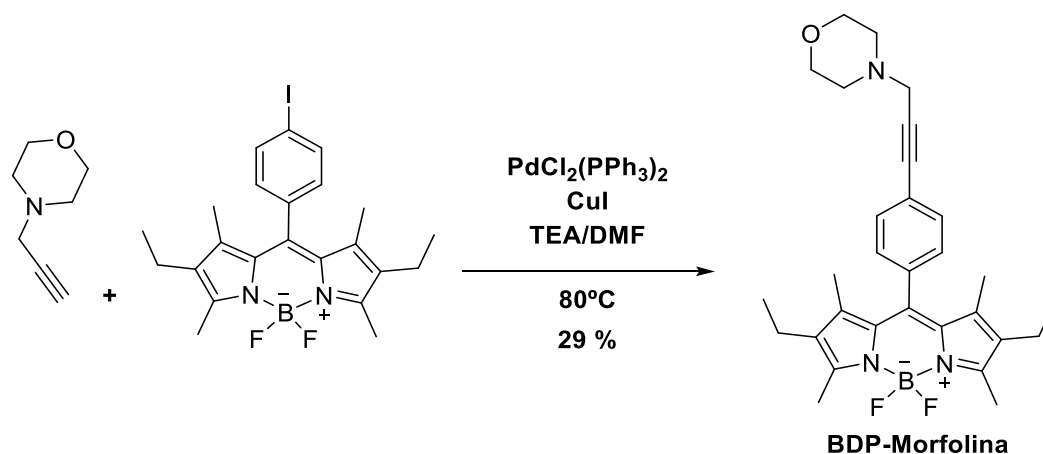


Figura 2.72 Síntesis de la sonda **BDP-Morfolina** a partir de I-BDP y propargil morfolina.

El espectro de RMN protónico de la sonda **BDP-Morfolina** (Figura 2.73) muestra las señales alifáticas para el fragmento BODIPY sin modificaciones sustanciales, y similares a las del resto de las sondas analizadas previamente. Por otro lado, se identifican los metilenos correspondientes a la morfolina H-8/8' y H-9/9' en desplazamientos de 2,71 y 3,81 ppm respectivamente. Estos desplazamientos son coherentes con los reportados en bibliografía para este tipo de molécula.^{48, 50} La multiplicidad de estas señales es determinada a partir de la herramienta de deconvolución de picos implementada en el software *Mestre Nova*, observándose dos tripletes con $J = 4,82$ Hz. Finalmente se identifica el metileno (H-7) como un singulete con un desplazamiento en 3,57 ppm comparable con los desplazamientos del mismo metileno en las sondas BDP-Amina (3,63 ppm) y 3HC-Amina (3,66 ppm).

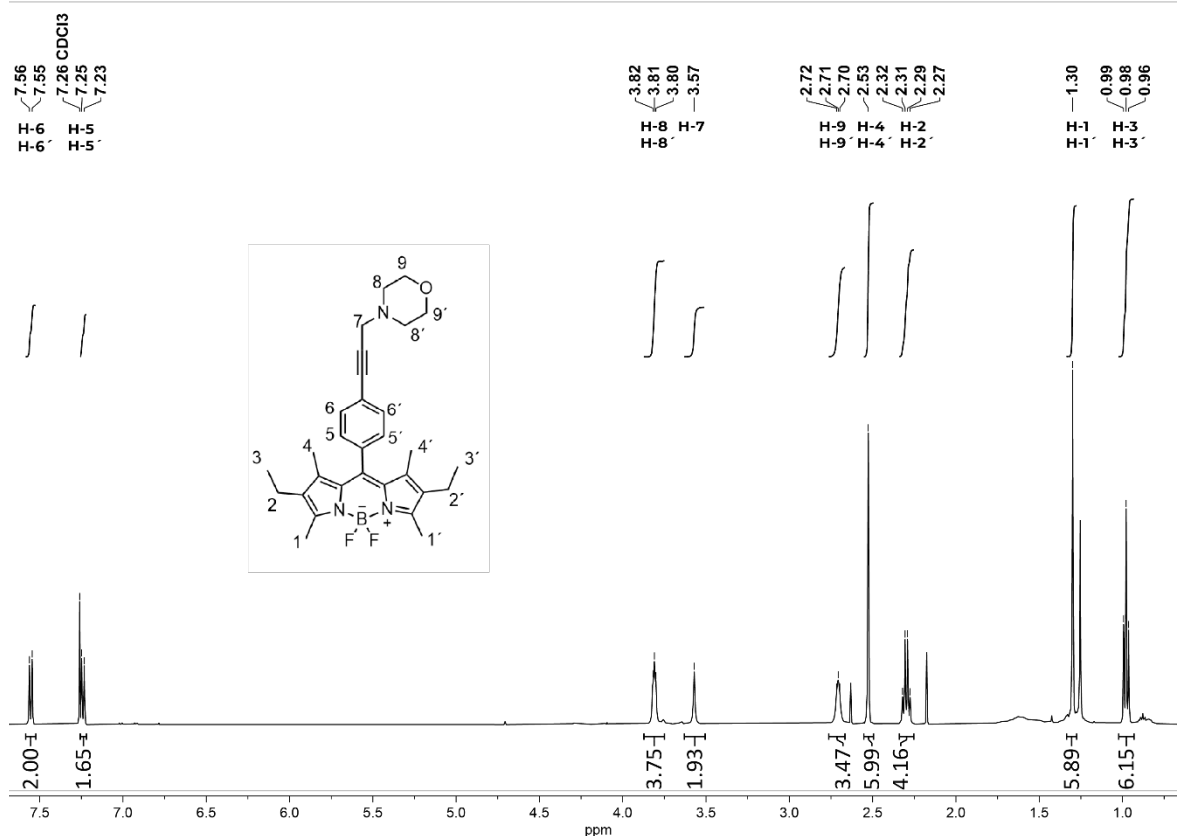


Figura 2.73 RMN ¹H (CDCl₃, 500MHz) de la sonda **BDP-Morfolina**.

2.4. Conclusiones

En este capítulo se presentaron las síntesis de distintas sondas fluorescentes sensibles al entorno derivadas de 3-hidroxicromonas y BODIPYs.. Se emplearon métodos tradicionales y actuales para su síntesis. En el caso de los BODIPYs, se utilizaron aldehídos y derivados de ácido como precursores, evaluando el uso de cloruros de ácido tanto comerciales como sintetizados en el laboratorio. Se observó que los cloruros de ácido sintetizados en el laboratorio introducen impurezas que reducen la eficiencia de la reacción. Para el fluoróforo Br-3HC, la adopción de rutas modernas, como el uso de piperidina o catalizadores de transferencia de fase, no mejoró los rendimientos.

Se investigó la reacción de acoplamiento de Sonogashira para la síntesis de las sondas fluorescentes, utilizando ioduros y bromuros de arilo acoplados a los fluoróforos, analizando su reactividad y optimización. Se obtuvieron 7 sondas fluorescentes: 5 específicas para la proteína hCAII, 1 para FABP2 y una última derivada de morfolina para estudiar sistemas similares a liposomas.

En la síntesis de sondas específicas para hCAII, los rendimientos fueron menores a lo esperado debido a problemas de solubilidad de los ligandos derivados de sulfonamidas, lo que afectó negativamente los resultados de la reacción de Sonogashira.

2.5. Detalles Experimentales

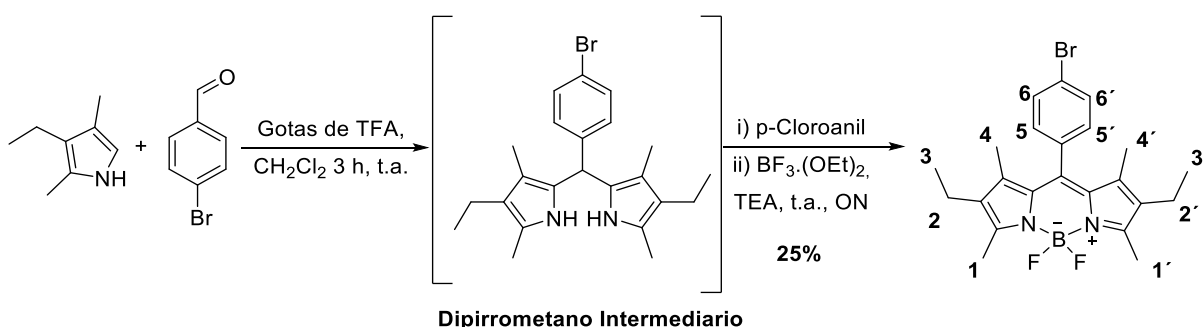
Los solventes utilizados, tanto para las reacciones como para la purificación, fueron destilados. En el caso del DCM seco, el proceso de secado se llevó a cabo agitando el solvente con hidruro de calcio CaH_2 seguido de destilación. Por otro lado, para el THF, se empleó la misma metodología, pero el secado se realiza utilizando sodio metálico.

Todos los compuestos fueron purificados por cromatografía en columna empleando silicagel Merck® (Kieselgel 60, 63–200 μm) y/o cromatografía preparativa usando Merck® PF254. El seguimiento de las reacciones se realizó con placas de silicagel Merck® precubiertas F-254 para CCD.

Todos los compuestos sintetizados fueron caracterizados mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN), y los compuestos finales fueron adicionalmente caracterizados mediante Espectrometría de Masa de Alta Resolución.

2.5.1. Síntesis de BODIPYs

2.5.1.1. Br-BDP (1)



En un balón, se mezcla el 2,4-dimetil-3-etilpirrol (4,65 mmol, 0,573 g) con el 4-bromobenzaldehído (1,62 mmol, 300 mg) y se disuelve en DCM seco y atmósfera de N_2 . Luego de 2 horas de reacción, se confirma que los productos reaccionaron mediante la aparición de una mancha poco polar roja en la CCD. Una vez confirmado esto, se adiciona p-cloroanil (1,62 mmol, 397 mg) y se deja reaccionar. Luego se adiciona TEA (13 mmol, 1,3g) y BF_3OEt_2

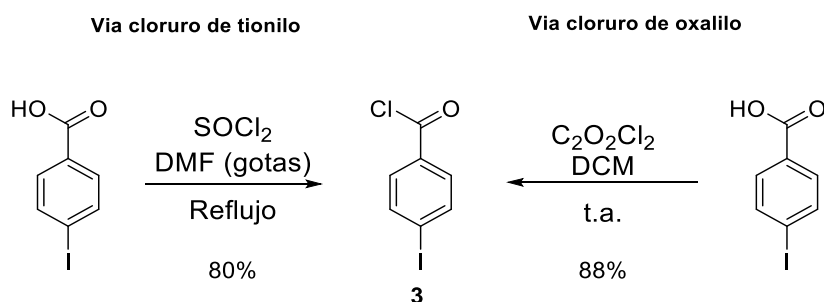
(13 mmol, 1,8 g) y se agita toda la noche. El balón se torna verde y se observa la aparición de fluorescencia. A continuación, se adiciona H₂O y se extrae con DCM. Posteriormente se lava la fase orgánica con NaCl (s.s.), H₂O, se seca con Na₂SO₄, filtra y evapora al vacío.

La purificación se lleva a cabo por cromatografía Flash líquida usando un gradiente de Ciclohexano/Acetato de etilo 100:0 hasta 80:20 y se obtiene el producto impuro, que se precipita disolviéndolo en una mínima cantidad de DCM y adicionando éter etílico obteniéndose agujas rojas/oscuras en un 25% de rendimiento.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,63 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, **H-6/6'**), 7,18 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, **H-5/5'**), 2,53 (s, 6H, **H-4/4'**), 2,31 (c, *J* = 7,6 Hz, 4H, **H-2/2'**), 1,31 (s, 6H, **H-1/1'**), 0,98 (t, *J* = 7,6 Hz, 6H, **H-3/3'**),

2.5.1.2. *I*-BDP (2)

Obtención de cloruro de acido



Vía cloruro de tionilo

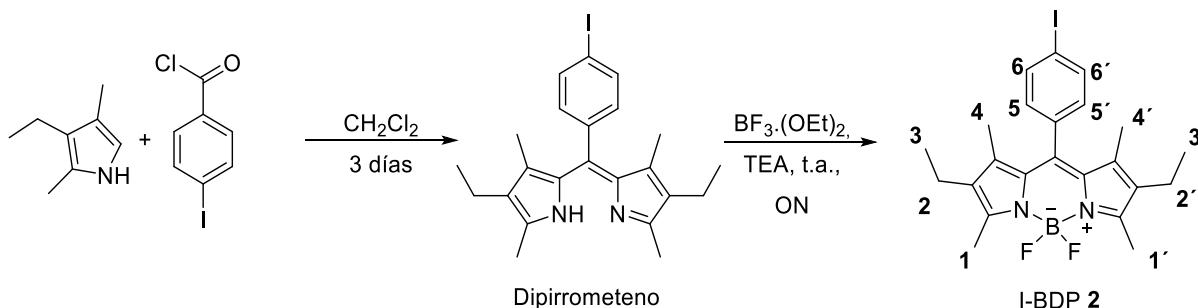
Se mezcla ácido 4-iodobenzoico (495 mg 2 mmol) con gotas de DMF y cloruro de tionilo recién destilado (5 ml, 78 mmol). La mezcla se lleva a reflujo durante toda la noche. Posteriormente, se realiza una destilación al vacío para quitar el exceso de cloruro de tionilo del crudo. Finalmente se realizan tres evaporaciones azeotropicas usando tolueno como co-solvente en rotavap obteniéndose un aceite amarillo que es filtrado por celite en Ciclohexano/Acetato de etilo 1:1. El aceite obtenido es enfriado solidificando como un sólido amarillo pálido (80%).

Vía cloruro de oxalilo

En un balón de dos bocas previamente secado en estufa de vacío y purgado con presión positiva de N₂, se mezclan ácido 4-iodobenzoico (506 mg 2,02 mmol) con gotas de DMF y DCM (10 ml). La emulsión blanca obtenida se lleva a 0°C y se adiciona cloruro de oxalilo (0,3 ml 4 mmol)

cuidadosamente con una corriente de N₂. La mezcla se lleva a temperatura ambiente y se agita por cuatro horas. Luego se evapora el solvente en rotavap y se realizan tres lavados con tolueno. Se obtiene un sólido amarillo pálido en un 88% de rendimiento.

Síntesis de I-BDP (2)



En un balón de dos bocas conectado a una línea de Shlenk con presión positiva de N₂ se adicionan 2,4-dimetil-3-etilpirrol (4,65 mmol, 0,573 g), cloruro de 4-iodobenzoilo (1,86 mmol, 0,5 g) y DCM (250 mL). La mezcla se deja agitando durante tres días. Luego, se adiciona BF₃OEt₂ (15,8 mmol, 2,1 g), TEA (12 mmol, 1,2 g) y se deja agitando durante toda la noche. La solución se torna verde. A continuación, se adiciona H₂O y se extrae con DCM. Finalmente, se lava la fase orgánica con NaCl (s.s.), H₂O, se seca en Na₂SO₄, filtra y evapora al vacío.

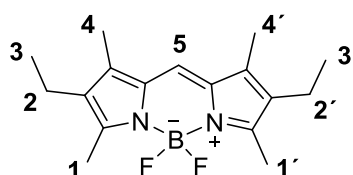
La purificación se lleva a cabo por cromatografía Flash líquida usando un gradiente de Ciclohexano/Acetato de etilo 100:0 hasta 80:20 y se obtiene el producto impuro, que se precipita disolviéndolo en una mínima cantidad de DCM y adicionando éter etílico obteniéndose agujas rojas/oscuras en un 30% de rendimiento.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,83 (d, J = 8,0 Hz, 1H, **H-6/6'**), 7,04 (d, J = 8,0 Hz, 1H, **H-5/5'**), 2,52 (s, 3H, **H-4/4'**), 2,30 (q, J = 7,6 Hz, 2H, **H-2/2'**), 1,31 (s, 3H, **H-1/1'**), 0,98 (td, J = 7,6, 0,7 Hz, 1H, **H-3/3'**),

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 154,19 (**BDP**), 138,56 (**BDP**), 138,29 (**Ar**), 138,21(**6/6'**), 135,42 (**BDP**), 133,07 (**BDP**), 130,52 (**BDP**), 130,32 (**5/5'**), 94,55 (**Ar**), 17,12 (**2/2'**), 14,68 (**3/3'**), 12,60 (**4/4'**), 12,03 (**1/1'**)

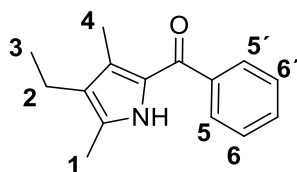
Caracterización de subproductos 5 y 6

H-BDP (5):



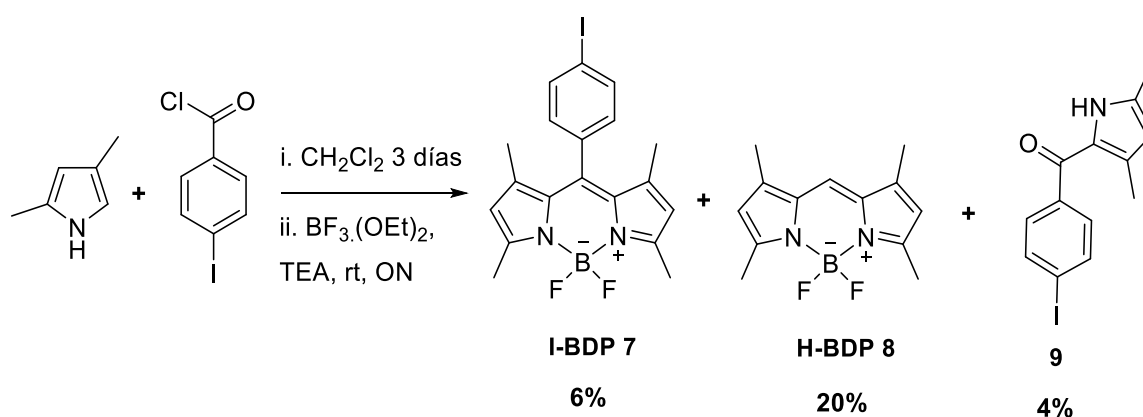
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 6,94 (s, 1H, **H-5**), 2,49 (s, 6H, **H-4/4'**), 2,38 (q, J = 7,6 Hz, 4H, **H-3/3'**), 2,16 (s, 6H, **H-1/1'**), 1,06 (t, J = 7,6 Hz, 6H, **H-2/2'**)

Subproducto monosustituído 6:



RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,80 (d, J = 8,4 Hz, 2H, **H-6/6'**), 7,36 (d, J = 8,4 Hz, 2H, **H-5/5'**), 2,38 (q, J = 7,5 Hz, 4H, **H-2**), 2,25 (s, 3H, **H-4**), 1,91 (s, 3H, **H-1**), 1,05 (t, J = 7,6 Hz, 3H, **H-3**),

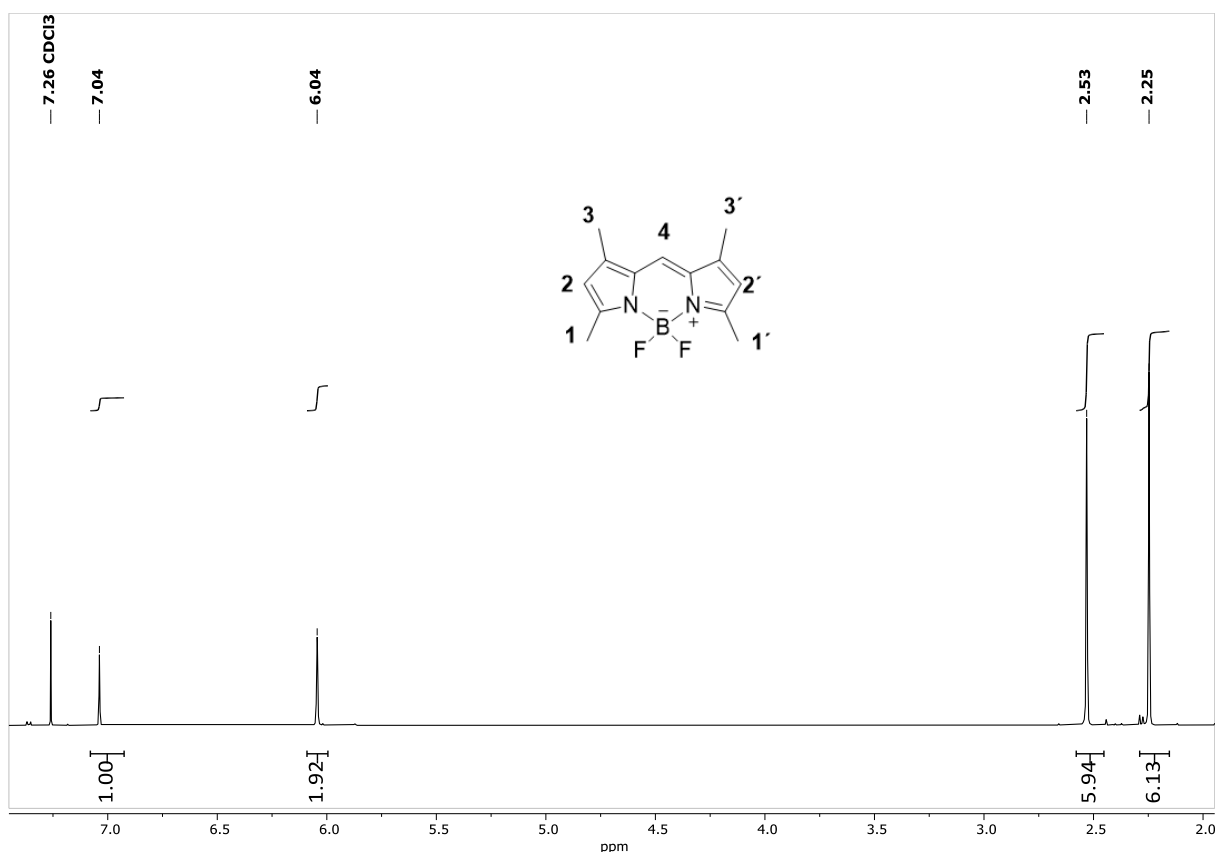
Determinación cuantitativa de I-BDP (7) y subproductos 8 y 9



Se repite el protocolo utilizado en la síntesis del **I-BDP 2** pero partiendo de 2,4-dimetilpirrol (2,1 mmol, 217 μL), cloruro de 4-iodobenzoilo (1,05 mmol, 280 mg), BF₃OEt₂ (7 mmol, 1,1 ml) y TEA (6,1 mmol, 1,68 ml)

Caracterización de H-BDP 8

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,04 (s, 1H, **H-4**), 6,04 (s, 2H, **H-2/2'**), 2,53 (s, 6H, **H-3/3'**), 2,25 (s, 6H, **H-1/1'**).

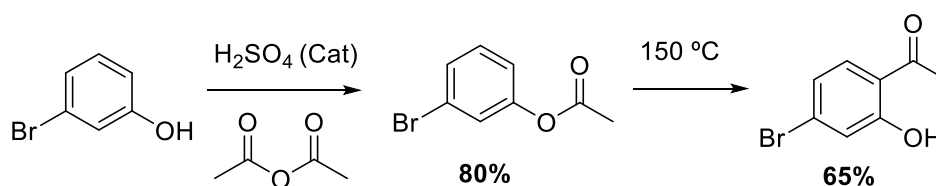


2.5.2. Síntesis de 3HCs

2.5.2.1. Síntesis de Br-3HC

Acetofenona 10

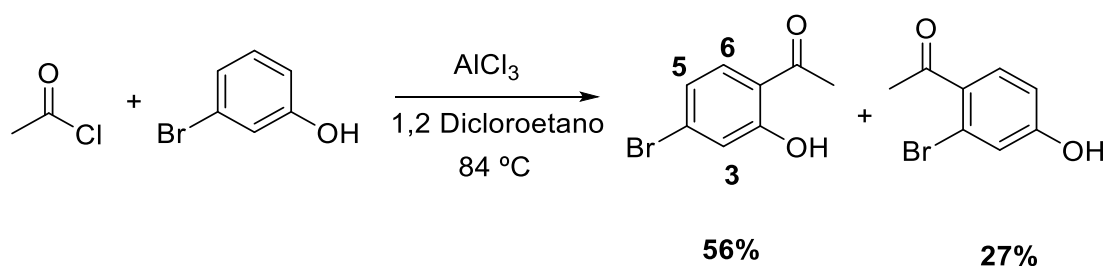
Vía reordenamiento de Fries en dos pasos



En un balón seco y purgado bajo una corriente de N_2 se mezcla 3-bromofenol (5,7 mmoles, 986 mg) y anhídrido acético (17,32 mmoles, 1,76 g). Luego se adicionan algunas gotas de ácido sulfúrico y se agita a temperatura ambiente durante dos horas. El crudo de reacción es volcado en HCl 2% frío y se realizan tres extracciones con DCM. Posteriormente se seca la fase orgánica con Na_2SO_4 , se filtra y se evapora en rotavap. Se adiciona tolueno para realizar la extracción completa del remanente de ácido acético formado. Se obtiene un aceite pálido que es utilizado sin purificar (80% de rendimiento) en el siguiente paso de reacción.

El aceite obtenido previamente es llevado a 150°C en un balón bajo atmosfera inerte y se adicionan lentamente en porciones 2 equivalentes de AlCl₃ (4,56 mmoles, 606 mg). Luego de tres horas se vuelca el crudo de reacción lentamente en HCl 2N en frío y se realizan tres extracciones con diclorometano. Posteriormente se seca la fase orgánica con Na₂SO₄, se filtra y evapora en rotavap. La purificación se realiza mediante columna flash de sílica con Ciclohexano/Acetato de etilo 98:2. El rendimiento obtenido es de 65% y el rendimiento global es del 52%

Vía reordenamiento de Fries en un paso



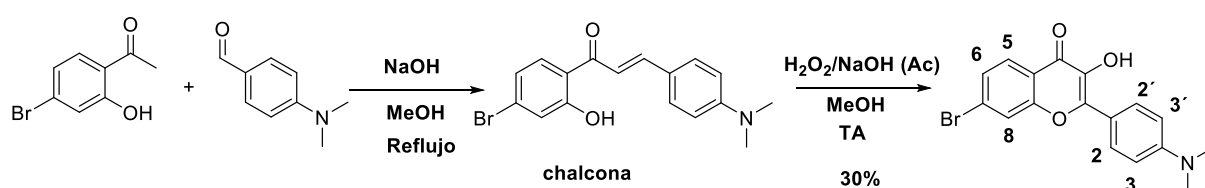
En un balón seco y purgado bajo una corriente de N₂ se mezclan 3-bromofenol (4,6 mmoles, 989 mg) y cloruro de acetilo (11,5 mmol, 902 mg) en 25 ml de 1,2 dicloroetano seco. La mezcla se agita durante 15 minutos. Luego se adiciona AlCl₃ (13,8 mmoles, 1,8 g) y la mezcla se lleva a reflujo (84°C) durante toda la noche. Se vuelca el crudo de reacción lentamente en HCl 2N en frío y se realizan tres extracciones con diclorometano. Posteriormente se seca la fase orgánica con Na₂SO₄, se filtra y evapora en rotavap. La purificación se realiza mediante columna flash de sílica con ciclohexano/Acetato de etilo 98:2. Se obtuvieron 544 mg (2,53 mmol) del compuesto **10**. El rendimiento es de 56% para el isómero orto y 27% para el isomero para.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 12,34 (s, 1H, **OH**), 7,58 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, **H-6**), 7,19 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, **H-3**), 7,06 – 7,03 (dd, *J* = 1,9 y 8,5 Hz, 1H, **H-5**), 2,61 (s, 3H, **CH₃**).

EMAR. C₈H₇O₂Br. Calculado[M+H]⁺: 213,3621. encontrado: 213,3628

Br-3HC (12)

Vía clásica (suave)



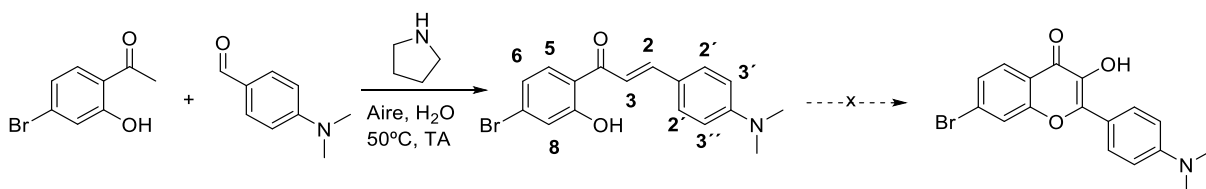
En un balón con 15 ml de metanol, se mezclan la acetofenona **X** (1,86 mmol, 400 mg), hidróxido de sodio (18,6 mmol, 744 mg) y 4-dimetilamino benzaldehído (1,86 mmol, 277 mg). La mezcla se lleva a reflujo (65°C) durante toda la noche. La solución pasa de un color amarillo traslucido a la formación de un precipitado poco soluble naranja correspondiente a la chalcona. Se lleva el crudo de reacción a temperatura ambiente y se adiciona 15 ml de una solución acuosa de NaOH 2N, y 2 ml de H₂O₂ 30%. Luego de 2 horas de agitación se observa por CCD la desaparición de la chalcona y la aparición de un producto fluorescente.

El crudo de reacción es volcado en agua con hielo y se acidifica con HCl hasta un pH de entre 4 y 5. Se filtra el precipitado naranja y se lava con agua. El producto no requiere otro paso de purificación y se obtiene en un 30% de rendimiento (0,56 mmol, 200 mg).

RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz) δ 8,17 – 8,14 (d, *J* = 9,3 Hz, 2H, **H-3/3'**), 8,08 (dd, *J* = 8,7, 0,4 Hz, 1H, **H-5**), 7,77 (dd, *J* = 1,7, 0,4 Hz, 1H, **H-8**), 7,50 (dd, *J* = 8,7, 1,7 Hz, 1H, **H-6**), 6,80 – 6,79 (d, *J* = 9,3, 2H, **H-2/2'**), 3,08 (s, 6H, **CH₃**).

RMN ¹³C (CDCl₃, 151 MHz) δ 172,05, 155,23, 151,67, 146,97, 137,20, 129,39, 128,01, 127,23, 126,76, 121,24, 120,00, 117,90, 111,70, 40,20.

Vía pirrolidina

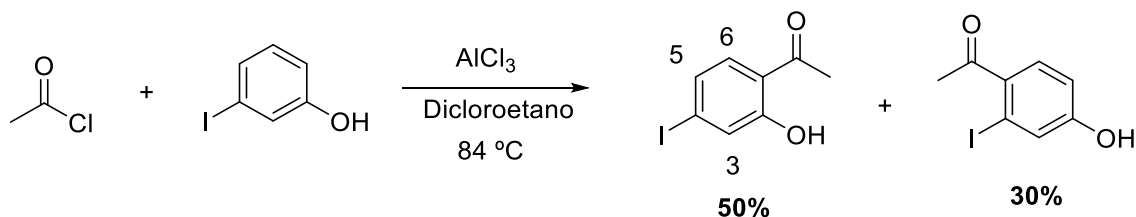


Se disuelven la acetofenona **10** (0,215 mmol, 46 mg) y 4-dimetilamino benzaldehído (0,215 mmol, 32 mg) en la mínima cantidad posible de metanol. La mezcla se añade en un balón que contiene pirrolidina (2,15 mmol, 152 mg) y 15 ml de agua. La reacción se agita a 50 °C toda la noche. Se observa la formación de chalcona intermediaria pero no del producto buscado. El crudo es volcado en agua, y neutralizado con HCl para obtener un sólido naranja en un 35% de rendimiento correspondiente a la chalcona **11** (0,075 mmol, 26 mmol).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 13,39 (s, 1H, **OH**), 7,93 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H, **H-2**), 7,76 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, **H-5**), 7,57 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, **H-3'/3''**), 7,36 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H, **H-3**), 7,19 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, **H-8**), 7,05 (dd, *J* = 8,6, 2,0 Hz, 1H, **H-6**), 6,69 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, **H-2'/2''**), 3,07 (s, 6H, **CH₃**)

2.5.2.2. Síntesis de I-3HC

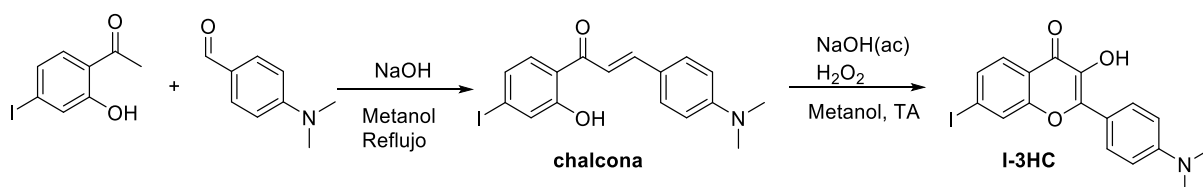
Acetofenona (**13**)



En un balón seco y purgado bajo una corriente de N_2 se mezclan 3-iodofenol (2,27 mmoles, 500 mg) y cloruro de acilo (5,67 mmol, 445 mg) en 25 ml de 1,2 dicloroetano seco. La mezcla se agita durante 15 minutos. Luego se adiciona AlCl_3 (5,67 mmoles, 7,54 mg) y la mezcla se lleva a reflujo (84°C) durante toda la noche. Se vuelca el crudo de reacción lentamente en HCl 2N en frío y se realizan tres extracciones con diclorometano. Posteriormente se seca la fase orgánica con Na_2SO_4 , se filtra y evapora en rotavap. La purificación se realiza mediante columna flash de sílica con ciclohexano/Acetato de etilo 98:2. Se obtiene la acetofenona **13** en un 50% de rendimiento (1,13 mmol, 297 mg).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 12,25 (s, 1H, **OH**), 7,42 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, **H-3**), 7,41-7,39 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, **H-6**), 7,26 (dd, $J = 8,4$ y $1,6$ Hz, 1H, **H-5**), 2,60 (s, 3H, **CH₃**).

I-3HC (**15**)



En un balón con 15 ml de metanol, se mezclan la acetofenona **13** (0,76 mmol, 200 mg), hidróxido de sodio (7,6 mmol, 304 mg) y 4-dimetilamino benzaldehído (0,76 mmol, 114 mg). La mezcla se lleva a reflujo (65°C) durante toda la noche. La solución pasa de un color amarillo traslucido a la formación de un precipitado poco soluble naranja correspondiente a la chalcona intermediaria. Se lleva el crudo de reacción a temperatura ambiente y se adiciona 7 ml de una solución acuosa de NaOH 2N, y 1 ml de H_2O_2 30%. Luego de 2 horas de agitación se observa por CCD la desaparición de la chalcona y la aparición de un producto fluorescente.

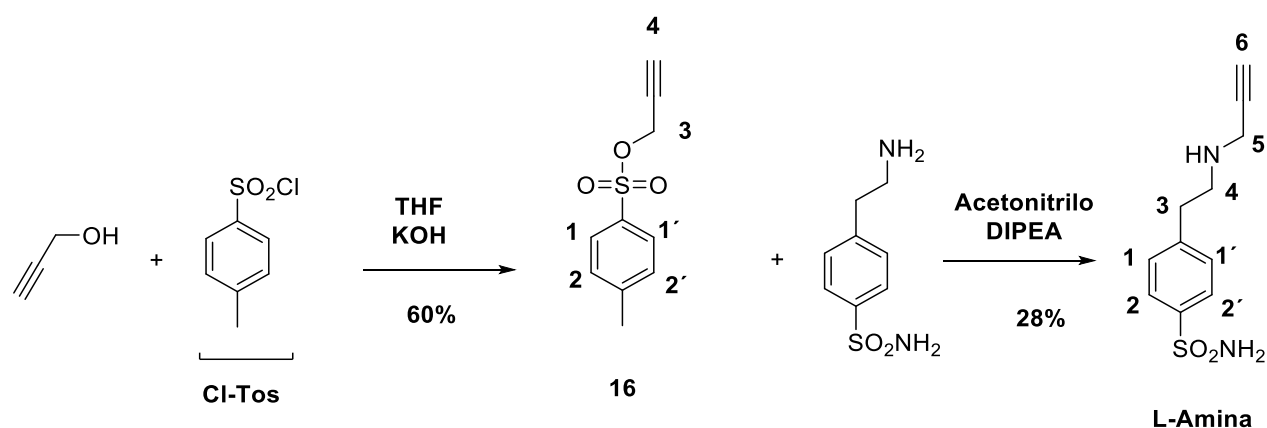
El crudo de reacción se vuelca en agua con hielo y se acidifica con HCl hasta un pH de entre 4 y 5. Se filtra el precipitado naranja y se lava con agua.

El producto no requiere otro paso de purificación y se obtiene en un 5% de rendimiento (0,03 mmol, 13 mg).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,17 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, **H-3/3'**), 8,00 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H, **H-8**), 7,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, **H-5**), 7,70 (dd, *J* = 8,3, 1,4 Hz, 1H, **H-6**), 6,81 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, **H-2/2'**), 3,08 (s, 6H, **CH₃**).

2.5.3. Síntesis de ligandos selectivos para hCAII

2.5.3.1. L-Amina



Paso 1: Tosilación

En un balón se disuelve cloruro de tosilo (4,1g, 21,3 mmol) en 11 ml de THF seco a 0°C y se adiciona alcohol propargílico (1 g, 17,8 mmol). Luego de unos minutos se adicionan hidróxido de potasio (4,6 g, 88 mmol) y se mantiene la temperatura en 0°C durante media hora. La reacción se lleva a temperatura ambiente durante tres horas y se finaliza adicionando 10 ml de agua. Se llevan a cabo tres extracciones con éter etílico, y tras purificar por cromatografía líquida en columna con un gradiente de Ciclohexano/Acetato de etilo 85/75 a 70/30, se obtiene un 60% de rendimiento del producto buscado (**16**).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,82 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, **H-1/1'**), 7,36 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H, **H-2/2'**), 4,69 (d, *J* = 2,5 Hz, 2H, **H-3**), 2,47 (t, *J* = 2,5 Hz, 1H, **H-4**), 2,45 (s, 3H, **CH₃**),

Paso 2: Sustitución

En un balón secado en estufa y purgado bajo una corriente de N₂ se mezclan 4-aminoetilbenzosulfonamida (493 mg, 2,38 mmol) y propargil-tosilato (508 mg, 2,38 mmol) en 12 ml de acetonitrilo. Se adicionan gotas de DMF hasta disolución de los reactivos. A continuación, se adiciona 1 ml de DIPEA y se agita durante toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, se evapora el crudo de reacción y se purifica por cromatografía

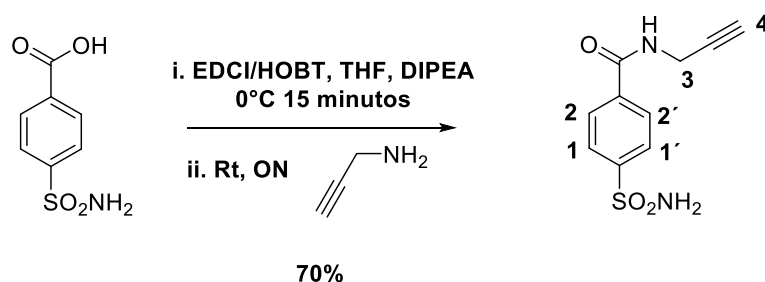
líquida en columna utilizando DCM/Metanol al 5% del último obteniéndose un aceite traslucido que cristaliza rindiendo el producto **L-Amina** en un 28.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,73-7,72 (d, *J* = 8,6, 2H, **H-1/1'**), 7,40 – 7,39 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, **H-2/2'**), 7,27 (s, 2H, **SO₂-NH₂**), 3,33 (s, 1H, **NH**), 3,32 (d, *J* = 2,5 Hz, 2H, **H-5**), 3,04 (t, *J* = 2,5 Hz, 1H, **H-6**), 2,80 – 2,76 (m, 4H, **H-3 y H-4**).

RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 144,82, 141,77, 129,05, 125,58, 82,99, 73,58, 49,09, 37,21, 35,12.

EMAR. C₁₁H₁₄N₂O₂S. Calculado[M-H]⁻: 237,0700, encontrado: 237,0698

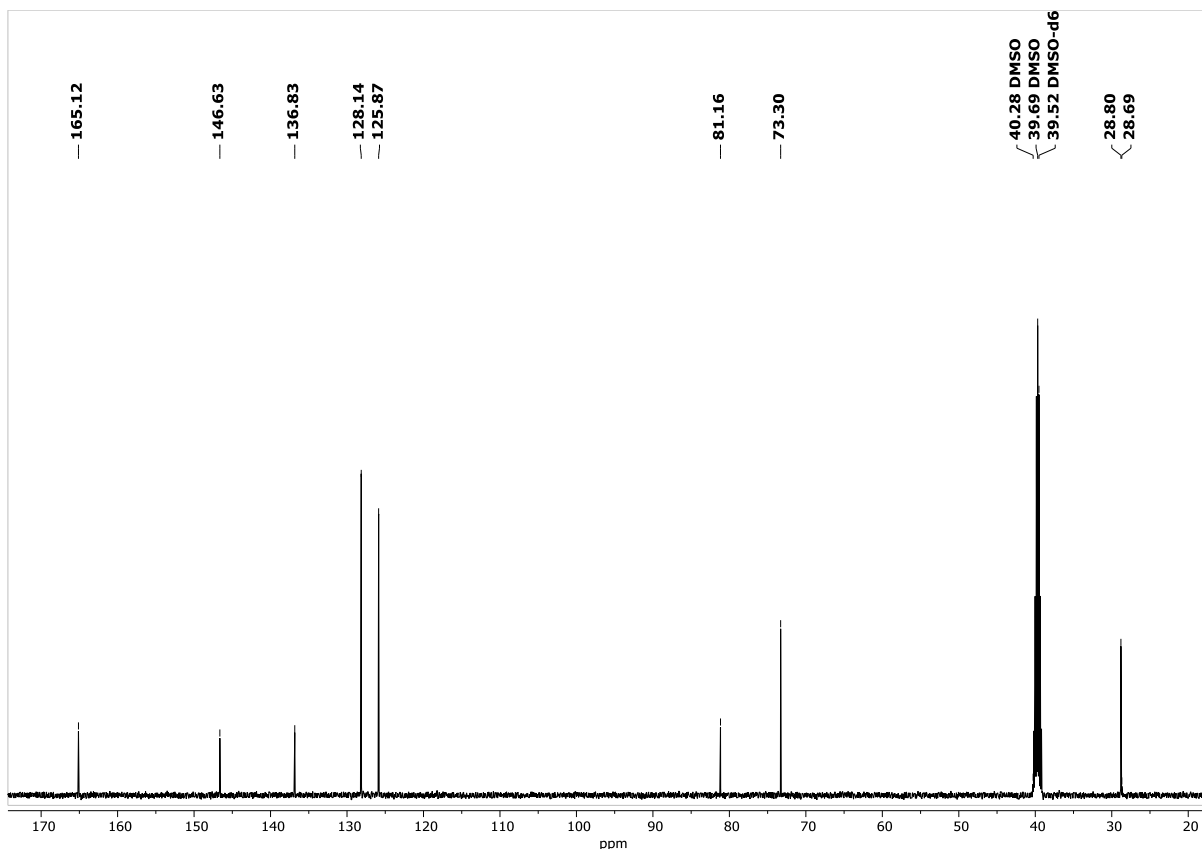
2.5.3.2. L-Amida



Se disuelve ácido 4-sulfamoilbenzoico (500 mg, 2,48 mmol) en 30 ml de THF. Posteriormente se adiciona HOBt (201 mg, 1,5 mmol) y DIPEA (415 μl, 16 mmol) y la mezcla se lleva a 0 °C. A continuación, se adiciona EDCI (521 mg, 3,36 mmol). Luego de 15 minutos, se adiciona propargil amina (238 μL, 3,75 mmol), se lleva a temperatura ambiente y se reacciona durante toda la noche. Se evapora el crudo de reacción y se suspende en 30 ml de agua obteniéndose un precipitado, que se filtra y corresponde al producto. La fase acuosa obtenida en el filtrado se extrae con acetato de etilo obteniéndose más producto precipitado. Los sólidos obtenidos son agitados en éter etílico, filtrados y lavados con agua fría sin necesidad de una purificación posterior. El rendimiento luego de secar en estufa es de 70%.

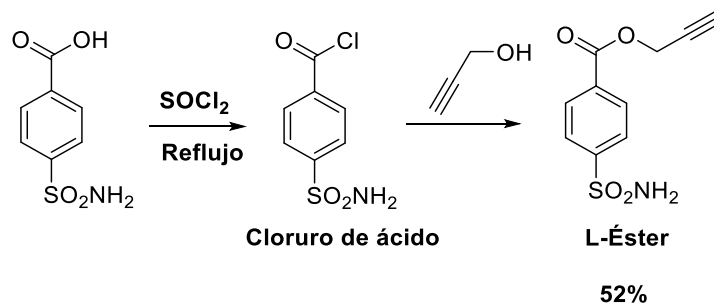
RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,13 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, **NH**), 8,00 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, **H-2/2'**), 7,90 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, **H-1/1'**), 7,49 (s, 2H, **SO₂-NH₂**), 4,08 (dd, *J* = 5,5, 2,6 Hz, 2H, **H-3**), 3,15 (t, *J* = 2,5 Hz, 1H, **H-4**).

RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,12, 146,63, 136,83, 128,14, 125,87, 81,16, 73,30, 28,80.

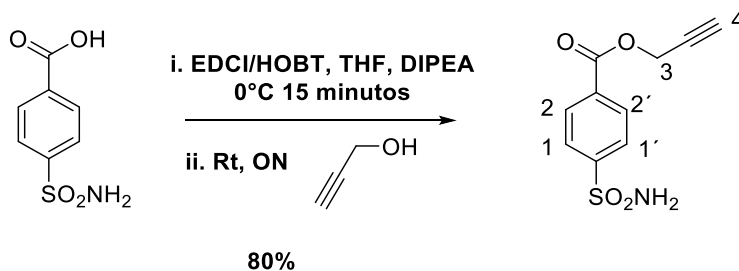


2.5.3.3. L-Éster

Ruta A



Ruta B



Ruta A

Se refluja ácido 4-sulfamoilbenzoico (297 mg, 1,47 mmol) en 50 ml de cloruro de tionilo a 100 °C durante toda la noche. Se usan gotas de DMF para

catalizar la reacción. Luego se realiza una destilación al vacío para remover el exceso de cloruro de tionilo y se obtiene un sólido amarillo pálido. Para eliminar las trazas de cloruro de tionilo que pueden haber quedado, se realizan múltiples destilaciones azeotrópicas en rotavap usando tolueno.

El cloruro de ácido se mezcla con 8 ml de propargil alcohol y se agita durante toda la noche a temperatura ambiente. La purificación se lleva a cabo por cromatografía flash, usando Ciclohexano/Acetato de etilo en una relación 60:40 respectivamente como fase móvil, obteniéndose un 52% de rendimiento del producto buscado.

Ruta B

Se disuelve ácido 4-sulfamoilbenzoico (234 mg, 1,16 mmol) en 15 ml de THF. Posteriormente se adiciona HOBt (100 mg, 0,75 mmol) y DIPEA (119 μ l, 0,8 mmol) y la mezcla se lleva a 0 °C. A continuación, se adiciona EDCI (267 mg, 1,87 mmol). Luego de 15 minutos, se adiciona propargil alcohol (110 μ L, 1,73 mmol), se lleva a temperatura ambiente y se reacciona durante toda la noche. Se evapora el crudo de reacción y se suspende en 30 ml de agua obteniéndose un precipitado, que se filtra y corresponde al producto. La fase acuosa obtenida en el filtrado se extrae con acetato de etilo obteniéndose más producto precipitado. Los sólidos obtenidos son agitados en éter etílico, filtrados y lavados con agua fría sin necesidad de una purificación posterior. El producto **L-Éster** se obtiene con un 80% de rendimiento.

RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) δ 8,15 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, **H-2/2'**), 7,98 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, **H-1/1'**), 7,59 (s, 2H, **SO₂-NH₂**), 5,00 (d, $J = 2,6$ Hz, 2H, **H-3**), 3,65 (t, $J = 2,7$ Hz, 1H, **H-4**),

2.5.4. Síntesis de sondas

Procedimiento general para las reacciones de Sonogashira

Un vial cónico de 4 ml se purga mientras que se burbujea N₂ en una mezcla de TEA/DMF 1:1. Posteriormente se introducen bajo atmósfera de N₂ los sustratos a acoplar y el PdCl₂(PPh₃)₂. Se continúa la purga del vial de reacción durante cinco minutos y se adiciona CuI. Finalmente se traspasa con una jeringa o cánula la mezcla de TEA/DMF al vial y se sumerge en un baño de glicerina a la temperatura de reacción según cada caso. El *work-up* consiste en la evaporación directa el crudo de reacción y filtración en lecho de celite.

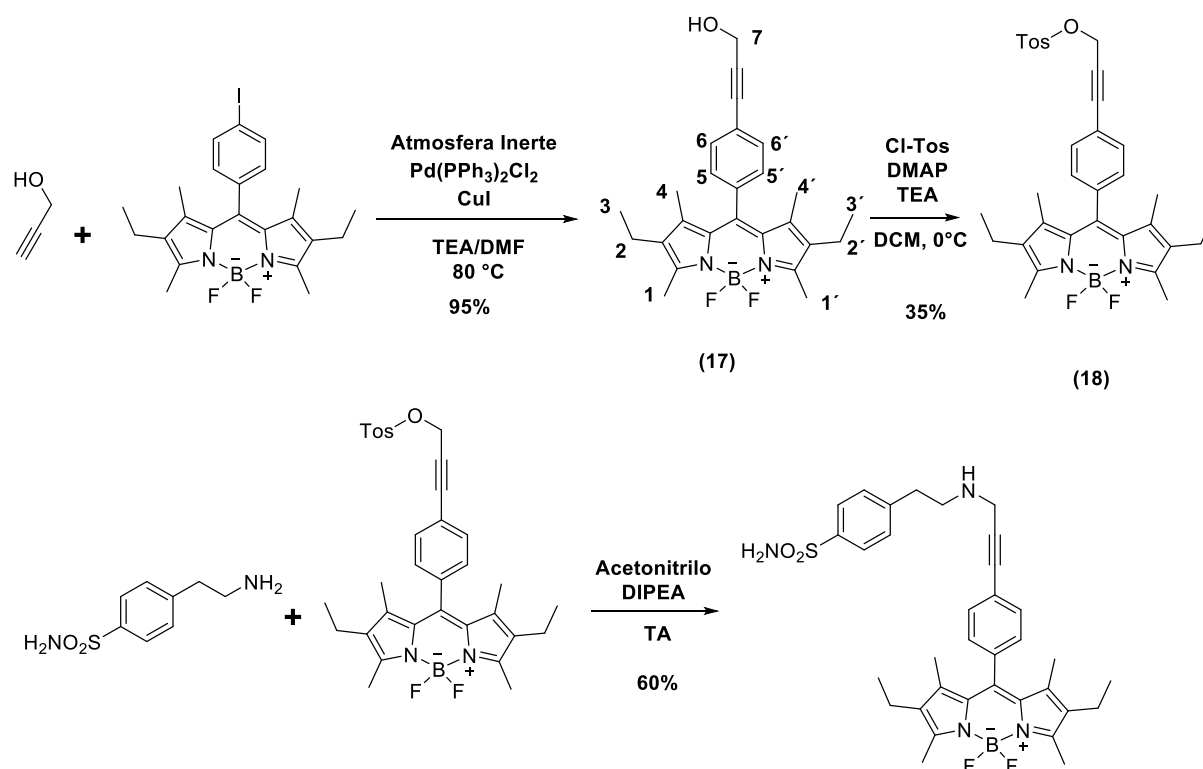
En las reacciones que usan bromuros de arilo, no se utiliza CuI y en lugar de utilizar TEA/DMF 1:1 se utiliza piperidina y el solvente según corresponda.

2.5.4.1. BDP-Amina

Acople directo

Las cantidades de cada reactivo son: 20 mg (0,04 mmol) de **I-BDP**, 30 mg (0,12 mmol) de **L-Amina** y 5mg (7 μ mol) del catalizador de paladio. Se adiciona una punta de espátula de CuI y se utilizan 2ml de la mezcla de solventes. La temperatura es de 75 °C y se agita durante tres horas. La purificación se realiza mediante cromatografía flash en fase normal usando un gradiente de DCM/MeOH de 0 a 10% del solvente más polar. El rendimiento es de 13%.

Síntesis indirecta

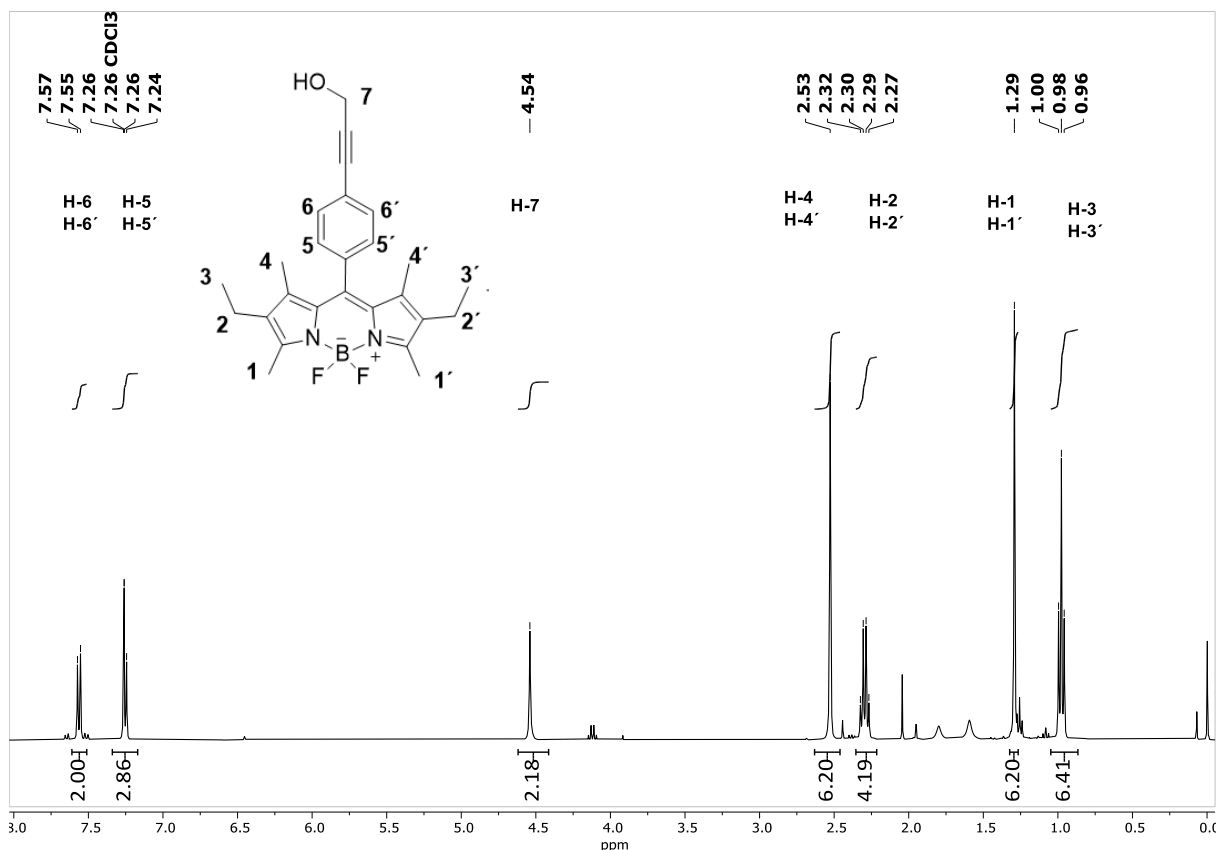


Paso 1: Obtención del compuesto 17

Para esta reacción se utiliza el protocolo general para las reacciones de Sonogashira. Las cantidades de cada reactivo son: 30 mg (0,06 mmol) del **I-BDP 2**, 9 mg (0,16 mmol) de propargil alcohol, 4 mg (7 μ mol) del catalizador de paladio y una punta de espátula de CuI. Se utilizan 2 ml mezcla de la mezcla de solventes. La temperatura de reacción es de 75°C. Luego de

cuatro horas de reacción se evapora el crudo de reacción, se re-suspende en acetato de etilo y es filtrado en un lecho de celite. La purificación se realiza por cromatografía flash usando Ciclohexano/Acetato de etilo 9:1 obteniendo un 35 % de rendimiento del producto **16**.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,56 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,46 – 7,16 (m, 2H), 4,54 (s, 2H), 2,53 (s, 6H), 2,30 (q, J = 7,5 Hz, 4H), 1,29 (s, 6H), 0,98 (t, J = 7,6 Hz, 6H),



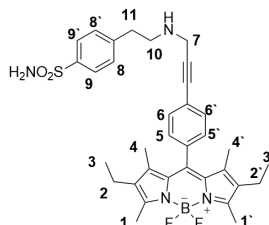
Paso 2: Tosilación del producto 16 (17):

La reacción de tosilación se realiza mezclando el compuesto **16** (25 mg, 0,058 mmol), cloruro tosilo (25 mg, 0,13 mmol), DMAP (5 mg, 0,04 mmol) y TEA (8 µL, 0,058 mmol) en 2 ml de DCM seco. Luego de agitar durante toda la noche se vuelca el crudo de reacción sobre éter etílico formándose un precipitado rojizo que es lavado con una solución de NaCl saturado y luego con agua. La purificación se realiza por cromatografía flash usando Ciclohexano/Acetato de etilo 8:2 obteniendo un 95 % de rendimiento del producto BDP-Ts **17**.

Paso 3: Sustitución:

La reacción de tosilación se lleva a cabo mezclando BDP-Ts (**17**) (12 mg, 20 µmol) y aminosulfonamida (6,1 mg, 3 µmol) en 2 mL de acetonitrilo seco. Posteriormente, se adiciona DIPEA (20 µl 0,18 mmol) y se agita durante toda

la noche a temperatura ambiente. Finalmente se evapora el crudo de reacción y se purifica por cromatografía flash usando DCM/MeOH 95:5 como solvente de elución. Se obtiene el compuesto **BDP-Amina** con un rendimiento del 60%.

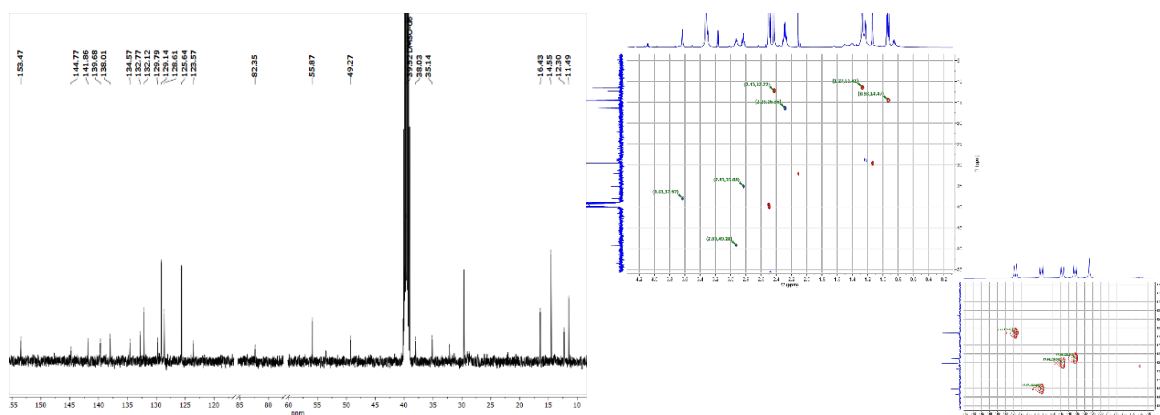


RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,74 (d, J = 8,4 Hz, 2H, **H-9/9'**), 7,57 (d, J = 8,3 Hz, 2H, **H-6/6'**), 7,44 (d, J = 8,4 Hz, 2H, **H-8/8'**), 7,36 (d, J = 8,3 Hz, 2H, **H-5/5'**), 7,27 (s, 2H, SO₂NH₂), 3,63 (s, 2H, **H-7**), 2,93 (t, J = 7,4 Hz, 2H, **H-10**), 2,83 (t, J = 7,5 Hz, 2H, **H-11**), 2,43 (s, 6H, **H-4**), 2,29 (q, J = 7,6 Hz, 4H, **H-2/2'**), 1,27 (s, 6H, **H-1/1'**), 0,94 (t, J = 7,6 Hz, 6H, **H-3/3'**),

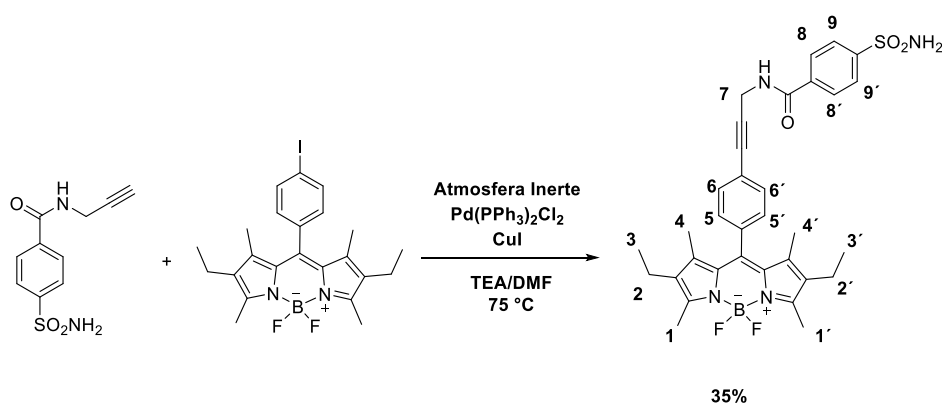
RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-d₆) δ 153,47 (**BDP**), 144,67 (**cuat. Ligando**), 141,86(**cuat. ligando**), 139,68(**BDP**), 138,01(**BDP**), 134,57(**BDP**), 132,77 (**BDP**), 132,12 (**6**), 129,79(**BDP**), 129,14 (**8**), 128,61 (**5**), 125,64 (**9**), 123,57 (**BDP**), 82,35 (**Alquino**), 49,27 (**10**), 38,03 (**7**), 35,14 (**11**), 16,43 (**2**), 14,55 (**3**), 12,30(**4**), 11,49 (**1**).

EMAR. C₃₄H₃₉BF₂N₄O₂S. Calculado[M+H]⁺ : 617,2939. encontrado: 617,2945

Asignación	δ H	δ C
9	7,74	125,64
6	7,57	132,12
8	7,44	129,14
5	7,36	128,61
7	3,63	38,03
10	2,93	49,27
11	2,83	35,15
4	2,43	12,30
2	2,29	16,43
1	1,27	11,49
3	0,94	14,55



2.5.4.2. BDP-Amida

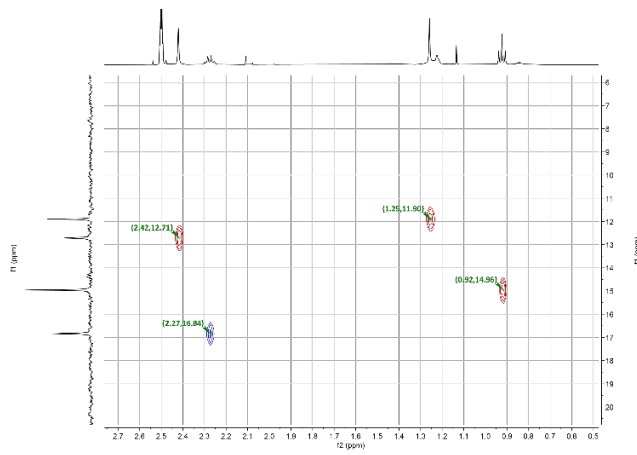
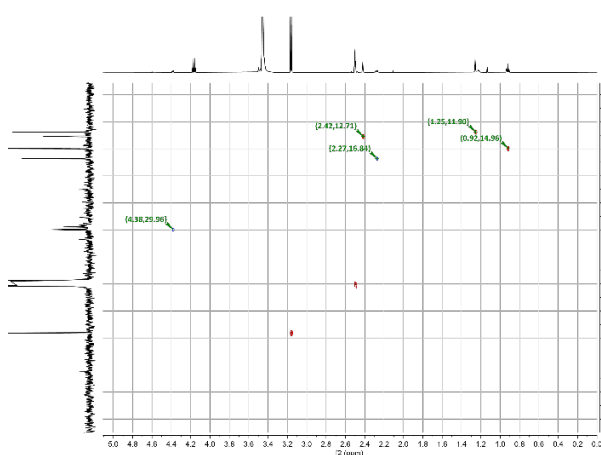
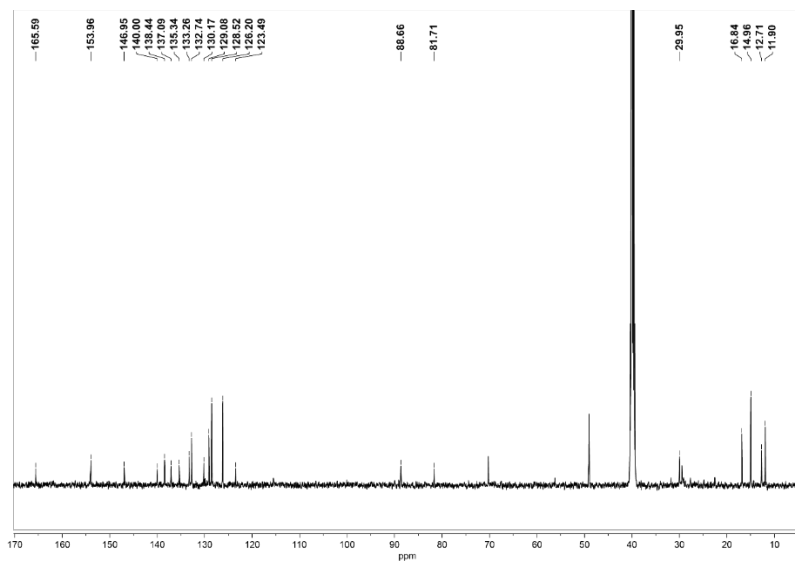


Las cantidades de cada reactivo son: 70 mg (0,15 mmol) de **I-BDP 2**, 70 mg (0,3 mmol) de **L-Amida**, 9,82 mg (0,014 mmol) del catalizador de paladio y 0,79 mg (0,07mmol) de CuI. Se utiliza 5ml de la mezcla de solvente y una temperatura de 75 °C. La purificación se lleva a cabo mediante una cromatografía flash en fase reversa, usando un gradiente de elución que va de Metanol/Agua 1:1 a 9:1. Luego se realizan varias cromatografías en capa delgada preparativa con una fase móvil compuesta de DCM/MeOH 92:8. El producto **BDP-Amida** se obtiene con un 32% de rendimiento.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9,26 (t, J = 5,4 Hz, 1H, **NH**), 8,04 (d, J = 8,8 Hz, 2H, **H-9/9'**), 7,93 (d, J = 8,7 Hz, 2H, **H-8/8'**), 7,61 (d, J = 8,5 Hz, 2H, **H-6/6'**), 7,51 (s, 2H, **SO₂-NH₂**), 7,36 (d, J = 8,5 Hz, 2H, **H-5/5'**), 4,38 (d, J = 5,4 Hz, 2H, **H-7**), 2,42 (s, 6H, **H-4/4'**), 2,27 (c, J = 7,4 Hz, 4H, **H-2/2'**), 1,26 (s, 6H, **H-1/1'**), 0,92 (t, J = 7,4 Hz, 6H, **H-3/3'**),

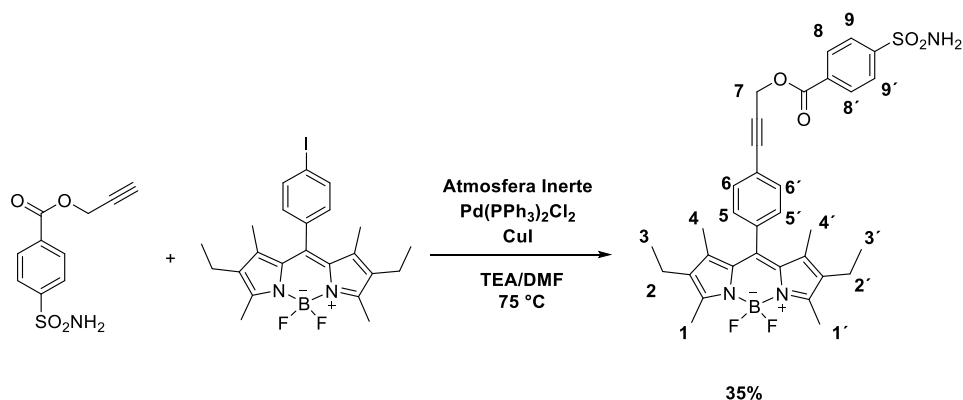
RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-d₆) δ 165,59 (**carbonilo**), 153,96 (**BDP**), 146,95(**ligando**), 140,00 (**BDP**), 138,44 (**BDP**), 137,09 (**ligando**), 135,34 (**BDP**), 133,26 (**BDP**), 132,74 (**6 y 6'**), 130,17 (**BDP**), 129,08 (**5 y 5'**), 128,52(**9 y 9'**), 126,20 (**8 y 8'**), 123,49 (**BDP**), 88,66 (**alquino**), 81,71 (**alquino**), 29,95 (**7**), 16,84 (**2 y 2'**), 14,96 (**3 y 3'**), 12,71 (**4 y 4'**), 11,90 (**1 y 1'**).

EMAR. C₃₃H₃₅BF₂N₄O₃S. Calculado[M+H]⁺: 617,2575. encontrado: 617,2565



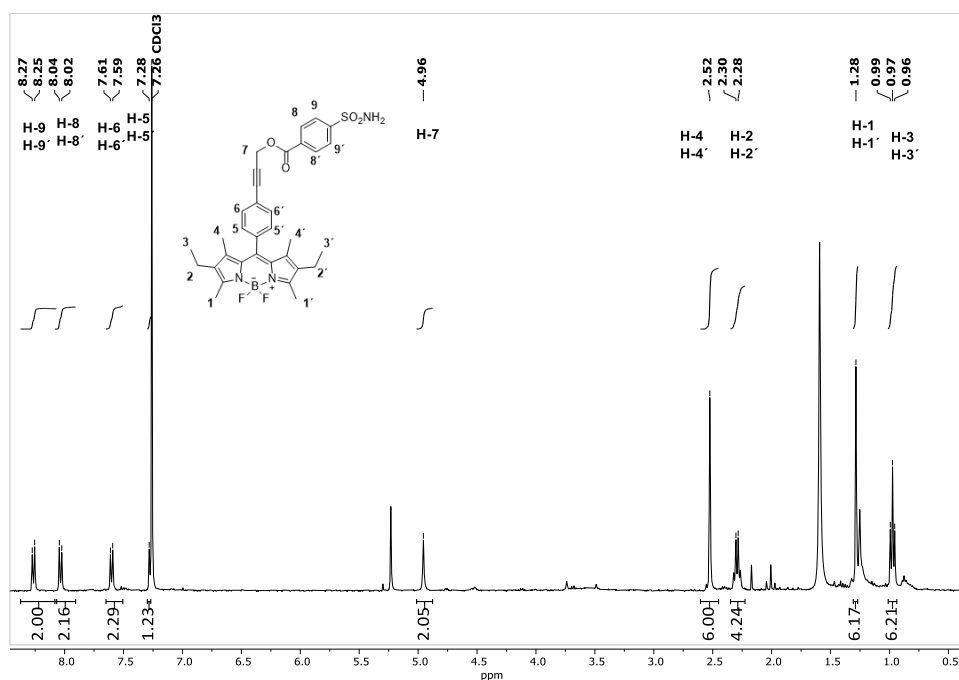
Correlación HSQC		
Asignación	δ H	δ C
9 y 9´	8,04	128,52
8 y 8´	7,93	126,20
6 y 6´	7,61	132,74
5 y 5´	7,36	129,08
7	4,38	29,95
4 y 4´	2,42	12,71
2 y 2´	2,27	16,84
1 y 1´	1,26	11,90
3 y 3´	0,92	14,96

2.5.4.3. BDP-Éster

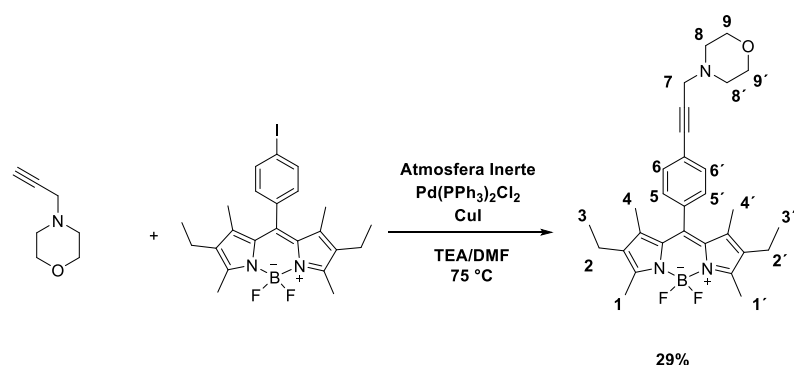


Las cantidades de cada reactivo son: 20mg (0,040 mmol) de **I-BDP 2**, 20 mg (0,080 mmol) de **L-Éster**, 1,9 mg (0,0054 mmol) del catalizador de paladio y una punta de espátula de CuI. Se utilizan 2ml de la mezcla de solvente y una temperatura de 75 °C. La purificación se lleva a cabo mediante una cromatografía flash en fase reversa, usando un gradiente de elución que va de Metanol/Agua 1:1 a 9:1. Luego se realizan varias cromatografías en capa delgada preparativa con una fase móvil compuesta de DCM/MeOH 92:8. El producto se obtiene con un 20% de rendimiento

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,26 (d, J = 8,2 Hz, 2H, **H-9/9'**), 8,03 (d, J = 8,2 Hz, 2H, **H-8/8'**), 7,60 (d, J = 7,8 Hz, 2H, **H-6/6'**), 7,28 (2H, **H-5/5'**), 4,96 (s, 2H, **H-7**), 2,52 (s, 6H, **H-4/4'**), 2,29 (q, J = 7,5 Hz, 4H, **H-2/2'**), 1,28 (s, 6H, **H-1/1'**), 0,97 (t, J = 7,5 Hz, 6H, **H-3/3'**).



2.5.4.4. BDP-Morfolina



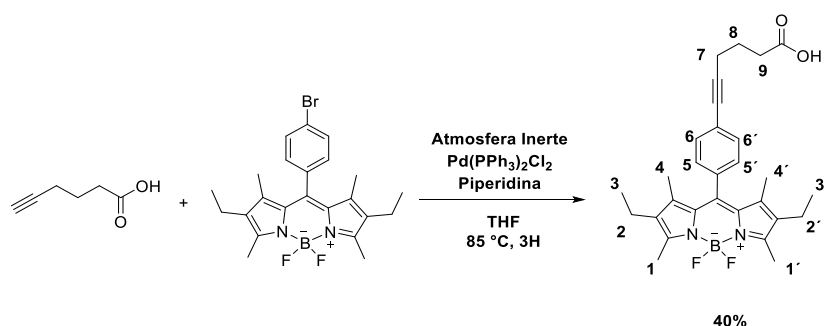
Las cantidades de cada reactivo son: 30 mg (0,06 mmol) de **I-BDP 2**, 20 mg (0,16 mmol) Propargil morfolina, 5 mg (7 μ mol) del catalizador de paladio y una punta de espátula de CuI. Se utilizan 2 ml de la mezcla de solventes y una temperatura de 75°C. La purificación se realiza por cromatografía flash en columna usando como fase fija sílica normal y como fase móvil se utiliza un gradiente de Ciclohexano/Acetato de etilo que comienza en 0 y llega hasta 60% del solvente más polar. El producto se obtiene con un rendimiento del 29%.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7,55 (d, J = 8.2 Hz, 2H, **H-6/6'**), 7.24 (d, J = 8.2 Hz, 2H, **H-5/5'**), 3.81 (t, J = 4.8 Hz, 4H, **H-9/9'**), 3.57 (s, 2H, **H-7**), 2.71 (t, J = 4.8 Hz, 4H, **H-8/8'**), 2.53 (s, 6H, **H-4/4'**), 2.30 (q, J = 7.5 Hz, 4H, **H-2/2'**), 1.30 (s, 6H, **H-1/1'**), 0.98 (t, J = 7.5 Hz, 6H, **H-3/3'**).

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 154,03(**BDP**), 139,21 (**BDP**), 138,22(**BDP**), 135,85 (**BDP**), 132,94 (**6 y 6'**), 132,37 (**BDP**), 130,54 (**BDP**), 128,47 (**5 y 5'**), 123,45 (**BDP**), 66,80 (**9 y 9'**), 52,44 (**8 y 8'**), 48,07 (**7**), 17,08 (**2 y 2'**), 14,61 (**3 y 3'**), 12,53 (**4 y 4'**), 11,88 (**1 y 1'**),

EMAR. C₃₀H₃₆BF₂N₃O. Calculado[M+H]⁺ : 504,3003. encontrado: 504,3013

2.5.4.5. BDP-Ac

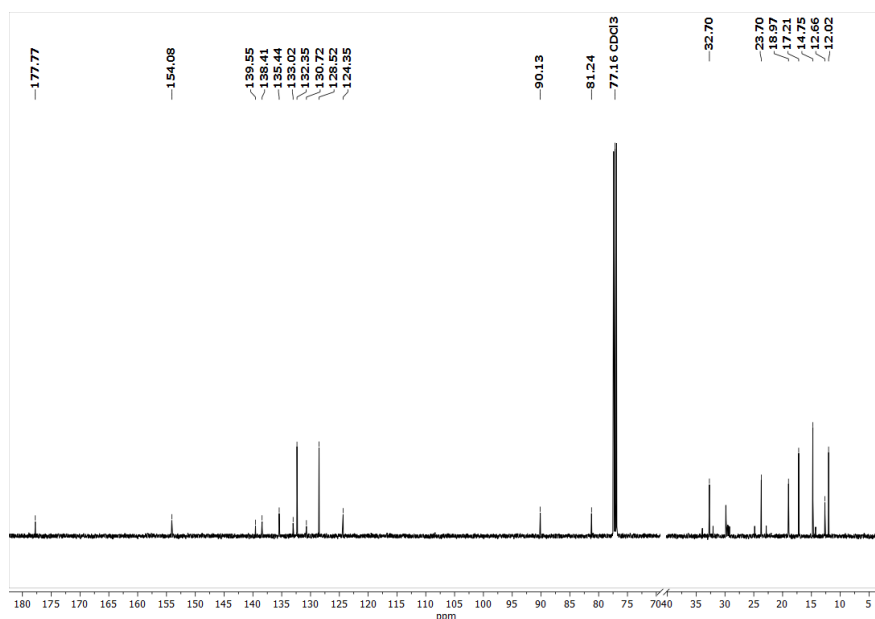


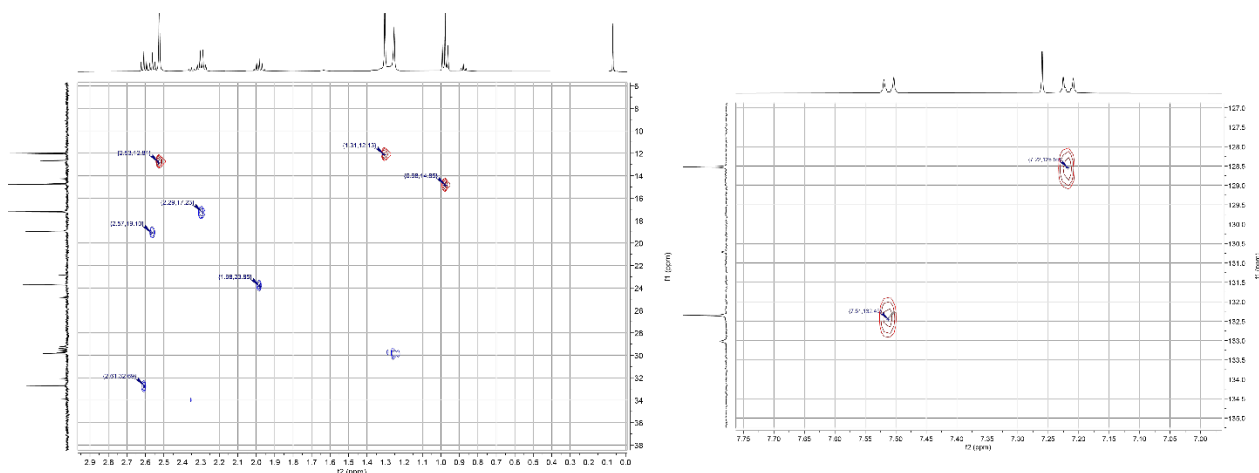
Para este caso se utiliza el protocolo para bromuros de arilo: se mezclan 40 mg (0,09 mmol) de Br-BDP, 19,4 mg, (0,18 mmol) de ácido 5 hexinoico, 6 mg, (8,5 μ mol) del catalizador de paladio y 103 μ L (1 mmol) de piperidina. Se disuelve todo en 10 ml THF y se lleva a una temperatura de 85°C. La purificación se realiza por cromatografía líquida en columna flash utilizando un gradiente de ciclohexano, acetato de etilo y un 1% de ácido acético para obtener el producto en un 40% de rendimiento del producto puro

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7,51 (d, J = 8,4 Hz, 2H, **H-6/6'**), 7,22 (d, J = 8,4 Hz, 2H, **H-5/5'**), 2,61 (t, J = 7,1 Hz, 2H, **H-9**), 2,56 (t, J = 7,0 Hz, 2H, **H-7**), 2,52 (s, 6H, **H-4/4'**), 2,30 (q, J = 7,6 Hz, 6H, **H-2/2'**), 1,98 (p, J = 7,1 Hz, 2H, **H-8**), 1,30 (s, 6H, **H-1/1'**), 0,98 (t, J = 7,6 Hz, 6H, **H-3/3'**),

RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 177,77 (**carbonilo**), 154,08 (**BDP**), 139,55 (**BDP**), 138,41 (**BDP**), 135,44 (**BDP**), 133,02 (**BDP**), 132,35 (**6 y 6'**), 130,72 (**BDP**), 128,52 (**5 y 5'**), 124,35 (**BDP**), 90,13 (**alquino**), 81,24 (**alquino**), 32,70 (**9**), 23,70 (**8**), 18,97 (**7**), 17,21 (**2 y 2'**), 14,75 (**3 y 3'**), 12,66 (**4 y 4'**), 12,02 (**1 y 1'**).

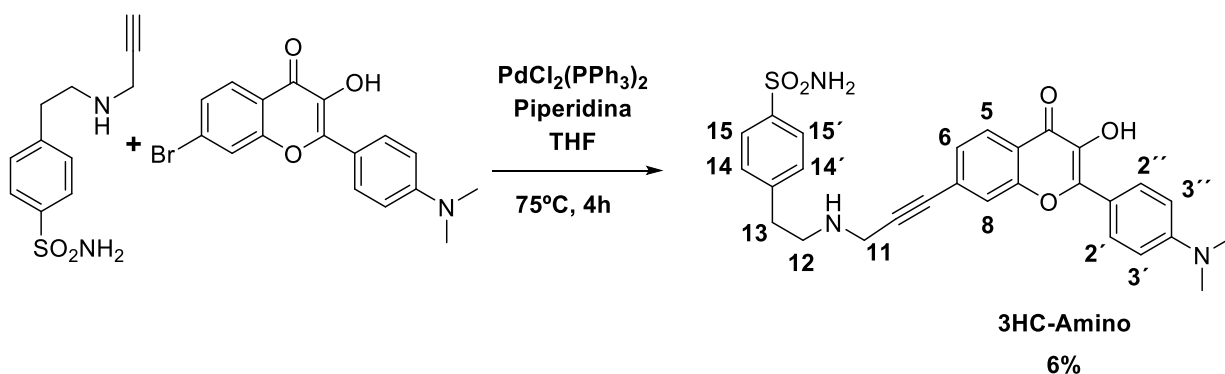
EMAR. $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2$. Calculado[M-H] $^-$: 489,2530. encontrado: 489,2530





Correlación HSQC		
Asignación	δ H	δ C
6 y 6'	7,51	132,35
5 y 5'	7,22	128,52
9	2,61	32,70
7	2,56	18,97
4 y 4'	2,52	12,66
2 y 2'	2,30	17,21
8	1,98	23,70
1 y 1'	1,30	12,08
3 y 3'	0,98	14,75

2.5.4.6. 3HC-Amino



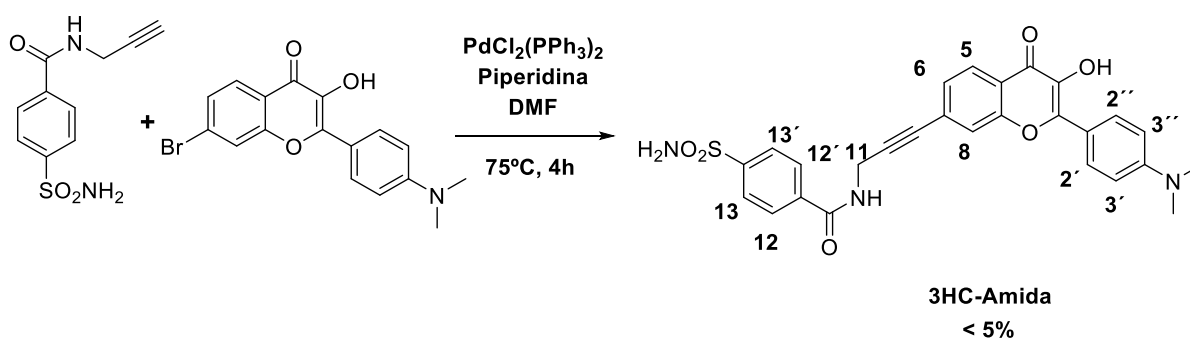
Se utiliza el mismo protocolo que para **BDP-Ácido**, pero la temperatura es de 75 °C. Las cantidades utilizadas son: 55 mg (0,15 mmol) de **Br-3HC**, 71 mg (0,3 mmol) del **L-Amina**, 16 m, (0,022 mmol) del catalizador de paladio, 148 μ L (1,5 mmol) de piperidina y en 7 ml de THF. La purificación se lleva a cabo mediante una cromatografía flash en fase reversa, usando un gradiente de elución que va de MeOH/Agua 1:1 a 90% de metanol. Luego se

realizan varias cromatografías en capa delgada preparativa con una fase móvil compuesta de Diclorometano/Metanol 92:8.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8,13 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, **H-3'/3''**), 8,03 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, **H-5**), 7,79 (s, 1H, **H-8**), 7,74 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, **H-6**), 7,44 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, **H-15/15'**), 7,40 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, **H-14/14'**), 6,85 (d, *J* = 9,3 Hz, 2H, **H-2'/2''**), 3,66 (s, 2H, **H-11**), 3,02 (s, 6H, **CH₃**), 2,92 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H, **H-12**), 2,84 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H, **H-13**).

EMAR. C₂₈H₂₇N₃O₅S. Calculado[M+H]⁺: 518,1755. encontrado: 518,1750

2.5.4.7. 3HC-Amida



Se utiliza el mismo protocolo que para BDP-Ácido, pero la temperatura es de 75 °C. Las cantidades utilizadas son: 35 mg (0,097 mmol) de **Br-3HC**, 36 mg (0,17 mmol) del **L-Amida**, 97 µL (0,97 mmol) de piperidina, 10 mg (0,014 mmol) del catalizador de paladio y 4 ml de THF como solvente. La purificación se lleva a cabo mediante una cromatografía flash en fase reversa, usando un gradiente de elución que va de MeOH/Agua 1:1 a 90% de metanol. Luego se realizan varias cromatografías en capa delgada preparativa con una fase móvil compuesta de DCM/MeOH 92:8 %.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9,32 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H, **NH**), 8,14 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, **H-3/3'**), 8,14 (m, 3H, **H-13/13' y H-5**), 7,93 (d, *J* = 8,5 Hz, 3H, **H-12/12'**), 7,83 (s, 1H, **H-8**), 7,43 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H, **H-6**), 6,84 (d, *J* = 9,2 Hz, 2H, **H-2/2'**), 4,42 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H, **H-11**), 3,02 (s, 6H, **CH₃**),

2.6. Referencias

1. Lai H-P, Gao R-C, Huang C-L, Chen IC, Tan K-T. Fluorescence switchable probes based on a molecular rotor for selective detection of proteins and small molecules. *Chem Commun.* 2015;51(90):16197.
2. Fu Y, Finney NS. Small-molecule fluorescent probes and their design. *RSC Advances.* 2018;8(51):29051.
3. Xiong W, Wang X, Shen X, Hu C, Wang X, Wang F, et al. Synthesis of Flavonols via Pyrrolidine Catalysis: Origins of the Selectivity for Flavonol versus Aurone. *The Journal of Organic Chemistry.* 2020;85(20):13160.
4. Treibs A, Kreuzer F-H. Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie.* 1968;718(1):208.
5. R. Alan Jones GPB. *The Chemistry of Pyrroles Organic Chemistry: A Series of Monographs*1977.
6. Shah M, Thangaraj K, Soong M-L, Wolford LT, Boyer JH, Politzer IR, et al. Pyrromethene–BF₂ complexes as laser dyes:1. *Heteroat Chem.* 1990;1(5):389.
7. Wagner RW, Lindsey JS. Boron-dipyrrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays. 1996;68(7):1373.
8. Loudet A, Burgess K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem Rev.* 2007;107(11):4891.
9. Benniston AC, Copley G, Elliott KJ, Harrington RW, Clegg W. Redox-Controlled Fluorescence Modulation in a BODIPY-Quinone Dyad. *Eur J Org Chem.* 2008;2008(16):2705.
10. Vázquez-Romero A, Kielland N, Arévalo MJ, Preciado S, Mellanby RJ, Feng Y, et al. Multicomponent Reactions for de Novo Synthesis of BODIPY Probes: In Vivo Imaging of Phagocytic Macrophages. *Journal of the American Chemical Society.* 2013;135(43):16018.
11. Gao L-X, Tian M, Zhang L, Liu Y, Jiang F-L. Syntheses, kinetics and thermodynamics of BODIPY-based fluorescent probes with different kinds of hydrophilic groups for the detection of biothiols. *Dyes and Pigments.* 2020;180:108434.

12. Godoy J, Vives G, Tour JM. Synthesis of Highly Fluorescent BODIPY-Based Nanocars. *Org Lett*. 2010;12(7):1464.
13. Aguiar A, Farinhas J, da Silva W, Susano M, Silva MR, Alcácer L, et al. Simple BODIPY dyes as suitable electron-donors for organic bulk heterojunction photovoltaic cells. *Dyes and Pigments*. 2020;172:107842.
14. Burghart A, Kim H, Welch MB, Thoresen LH, Reibenspies J, Burgess K, et al. 3,5-Diaryl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) Dyes: Synthesis, Spectroscopic, Electrochemical, and Structural Properties. *The Journal of Organic Chemistry*. 1999;64(21):7813.
15. Warashina T, Matsuura D, Sengoku T, Takahashi M, Yoda H, Kimura Y. Regioselective Formylation of Pyrrole-2-Carboxylate: Crystalline Vilsmeier Reagent vs Dichloromethyl Alkyl Ether. *Organic Process Research & Development*. 2019;23(4):614.
16. Wu L, Burgess K. A new synthesis of symmetric boraindacene (BODIPY) dyes. *Chem Commun*. 2008(40):4933.
17. Black DSC, Blackburn GM, Johnston GAR. Chapter 14 - Aliphatic Monohydroxy-monocarboxylic Acids and Related Compounds. In: Coffey S, editor. *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds (Second Edition)*. Amsterdam: Elsevier; 1964. p. 80.
18. Klymchenko AS, Pivovarenko VG, Ozturk T, Demchenko AP. Modulation of the solvent-dependent dual emission in 3-hydroxychromones by substituents. *New J Chem*. 2003;27(9):1336.
19. al KvAe. *Ber*. 1908;41:4233.
20. Algar J, Flynn JP. A New Method for the Synthesis of Flavonols. *Proceedings of the Royal Irish Academy Section B: Biological, Geological, and Chemical Science*. 1934;42:1.
21. Baker W, Robinson R. 242. Synthetical experiments in the isoflavone group. Part VI. The reactions of some keto-ethylene oxides. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1932(0):1798.
22. Patonay T, Lévai A, Nemes C, Timár T, Tóth G, Adam W. Synthesis and Cyclization of 1-(2-Hydroxyphenyl)-2-propen-1-one Epoxides: 3-

Hydroxychromanones and -flavanones versus 2-(1-Hydroxyalkyl)-3-coumaranones. *The Journal of Organic Chemistry*. 1996;61(16):5375.

23. Dean FM, Podimuang V. 737. The course of the Algar–Flynn–Oyamada (A.F.O.) reaction. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1965(0):3978.

24. Serdiuk IE, Roshal AD, Błażejowski J. Quantum-Chemical Analysis of the Algar–Flynn–Oyamada Reaction Mechanism. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2014;50(3):396.

25. Shen X, Zhou Q, Xiong W, Pu W, Zhang W, Zhang G, et al. Synthesis of 5-substituted flavonols via the Algar-Flynn-Oyamada (AFO) reaction: The mechanistic implication. *Tetrahedron*. 2017;73(32):4822.

26. Nhu D, Hawkins BC, Burns CJ. Phase Transfer Catalysis Extends The Scope of The Algar–Flynn–Oyamada Synthesis of 3-Hydroxyflavones. *Aust J Chem*. 2015;68(7):1102.

27. Gunduz S, Goren AC, Ozturk T. Facile Syntheses of 3-Hydroxyflavones. *Org Lett*. 2012;14(6):1576.

28. Gosselck J. Friedel-Crafts and Related Reactions. Herausgeg. von G. A. Olah. Band I: General Aspects. Interscience Publishers, a Division of John Wiley & Sons, New York-London 1963. 1. Aufl., XXXIV, 1031 S., zahlr. Abb. u. Tab., geb. £ 11.0.0. *Angew Chem*. 1965;77:144.

29. Cullinane NM, Edwards BFR. 596. The Fries rearrangement. Part V. Effect of the ring substituent and the acyl group. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1958(0):2926.

30. Sartori G, Maggi R. Use of Solid Catalysts in Friedel–Crafts Acylation Reactions. *Chem Rev*. 2006;106(3):1077.

31. Giordano L, Shvadchak VV, Fauerbach JA, Jares-Erijman EA, Jovin TM. Highly Solvatochromic 7-Aryl-3-hydroxychromones. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2012;3(8):1011.

32. Sonogashira K, Tohda Y, Hagihara N. A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Lett*. 1975;16(50):4467.

33. Cassar L. Synthesis of aryl- and vinyl-substituted acetylene derivatives by the use of nickel and palladium complexes. *J Organomet Chem.* 1975;93(2):253.
34. Dieck HA, Heck FR. Palladium catalyzed synthesis of aryl, heterocyclic and vinylic acetylene derivatives. *J Organomet Chem.* 1975;93(2):259.
35. Chinchilla R, Nájera C. Recent advances in Sonogashira reactions. *Chem Soc Rev.* 2011;40(10):5084.
36. Gazvoda M, Virant M, Pinter B, Košmrlj J. Mechanism of copper-free Sonogashira reaction operates through palladium-palladium transmetalation. *Nature Communications.* 2018;9(1):4814.
37. Alterio V, Di Fiore A, D'Ambrosio K, Supuran CT, De Simone G. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms? *Chem Rev.* 2012;112(8):4421.
38. Gaspari R, Rechlin C, Heine A, Bottegoni G, Rocchia W, Schwarz D, et al. Kinetic and Structural Insights into the Mechanism of Binding of Sulfonamides to Human Carbonic Anhydrase by Computational and Experimental Studies. *J Med Chem.* 2016;59(9):4245.
39. Han S-Y, Kim Y-A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron.* 2004;60(11):2447.
40. Surry DS, Fox DJ, Macdonald SJF, Spring DR. Aryl-aryl coupling via directed lithiation and oxidation. *Chem Commun.* 2005(20):2589.
41. Raghothama S. NMR of peptides. *J Indian Inst Sci.* 2010;90.
42. an der Heiden MR, Plenio H, Immel S, Burello E, Rothenberg G, Hoefsloot HCJ. Insights into Sonogashira Cross-Coupling by High-Throughput Kinetics and Descriptor Modeling. *Chemistry – A European Journal.* 2008;14(9):2857.
43. Roy AH, Hartwig JF. Directly observed reductive elimination of aryl halides from monomeric arylpalladium (II) halide complexes. *Journal of the American Chemical Society.* 2003;125(46):13944.
44. Goossen LJ, Koley D, Hermann HL, Thiel W. Mechanistic pathways for oxidative addition of aryl halides to palladium (0) complexes: a DFT study. *Organometallics.* 2005;24(10):2398.

45. Li F-Z, Wu Z, Lin C, Wang Q, Kuang G-C. Photophysical properties regulation and applications of BODIPY-based derivatives with electron donor-acceptor system. *Results in Chemistry*. 2022;4:100384.
46. Gu Z, Li Z, Liu Z, Wang Y, Liu C, Xiang J. Simple, efficient copper-free Sonogashira coupling of haloaryl carboxylic acids or unactivated aryl bromides with terminal alkynes. *Catal Commun*. 2008;9(13):2154.
47. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7(6):489.
48. Deepak VD, Mahmud I, Gauthier M. Synthesis of carboxylated derivatives of poly(isobutylene-co-isoprene) by azide-alkyne "click" chemistry. *Polym J*. 2019;51(3):327.
49. Yang J, Chen D, Wang Z, Wang Y, Li J, Wang J, et al. Rational design fluorescent dyes based on morpholine derivatives for specific imaging of lysosomes and lipid droplets in living cells. *Dyes and Pigments*. 2024;221:111819.
50. Lv H, Xing Q, Yue C, Lei Z, Li F. Solvent-promoted catalyst-free N-formylation of amines using carbon dioxide under ambient conditions. *Chem Commun*. 2016;52(39):6545.

Capítulo 3

Materiales y

métodos

3.1. Espectroscopía

3.1.1. Absorción

Los espectros de absorción se tomaron en un espectrofotómetro de absorción de doble haz Shimadzu UV-3600 en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Precision Cells Inc.). La línea de base se obtiene utilizando aire, y en lugar de utilizar el doble haz, se toma el espectro del solvente como referencia y luego se resta en cada espectro tomado. Todos los espectros fueron adquiridos con un nivel de velocidad media y 1 nm de ancho espectral.

3.1.2. Emisión estacionaria

Los espectros de emisión se obtuvieron en un espectrofluorómetro PTI QM40, utilizando cubetas de fluorescencia de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Precision Cells Inc). Se utilizaron celdas de 80 μ L para las titulaciones y de 300 μ L de volumen para las medidas simples (Figura 3.1).

En cada determinación se utilizó el mismo ancho de rendija a la entrada y salida de los monocromadores de excitación y de emisión. El valor se ajustó entre 0,5 mm y 1 mm, correspondiendo a un ancho espectral de 2 a 4 nm en cada monocromador. Se buscó obtener una señal en el máximo en el orden 10^6 cuentas, procurando estar siempre por debajo del nivel de saturación del detector.

Los espectros de emisión se adquirieron en un intervalo espectral con límite inferior 10 nm por encima de la longitud de onda de la luz de excitación, para evitar la detección de luz dispersa. Se utilizó una función de corrección provista por el equipo que compensa la sensibilidad variable que presenta el canal de detección a la luz de distintas longitudes de onda. Tanto los espectros de emisión como los de excitación fueron adquiridos con un tiempo de exposición de 0,1 segundos en pasos de 1 nm. Para el caso de las titulaciones de fluorescencia, se chequea por absorción que la absorbancia sea menor a 0,1 para evitar efectos de filtro interno.

Los derivados de I-BDP fueron excitados a 490 nm mientras que el H-BDP a 480 nm. Las 3HCS son excitadas a 420 nm.

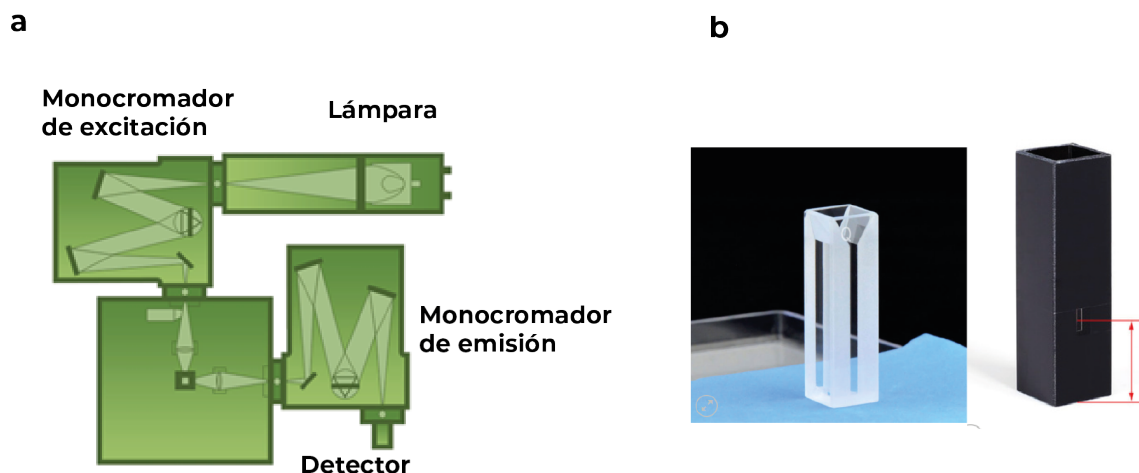


Figura 3.1. a) Esquema del espectrofluorómetro PTI QM40 utilizado. b) Celdas utilizadas para las determinaciones de fluorescencia.

3.1.3. Anisotropía de fluorescencia

La anisotropía de fluorescencia (r) es una medida del grado de polarización de la luz producida en la emisión fluorescente, y está relacionado a la orientación relativa de los momentos de transición para la absorción y la emisión. A su vez, la anisotropía puede disminuir por la presencia de procesos que despolaricen la emisión, como un movimiento rotacional, una transformación en estado excitado o una transferencia de energía. En soluciones isotrópicas, el valor máximo de r es igual a 0,4 y corresponde a una alineación exacta entre el momento de transición de absorción y de emisión para la molécula en estudio, en ausencia de procesos que despolaricen la emisión durante el tiempo que dura la misma. Se pueden obtener valores negativos de hasta -0,2, correspondientes a un ángulo de 90° entre el momento de transición de absorción y el de emisión (también en ausencia de cualquier proceso de despolarización).

Para conocer el valor de r de una solución es necesario medir la intensidad de fluorescencia excitando con luz polarizada en una dada dirección y detectando la emisión en una dirección paralela ($I_{||}$) y en una perpendicular (I_{\perp}) a la dirección de excitación. En la Ecuación 2.1 se puede ver la relación entre estos parámetros y r :

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad [3.1]$$

Las mediciones de anisotropía se realizaron en el espectrofluorómetro PTI-QM40, previamente mencionado. Con el objetivo de conocer I_{\perp} e I_{\parallel} se usó el típico procedimiento que utiliza dos polarizadores de película de polímero colocados entre la muestra y cada uno de los monocromadores. Los polarizadores poseen un mecanismo para el movimiento de su eje de forma tal de permitir el paso de luz polarizada perpendicular al plano de incidencia (plano vertical) o paralela al mismo (plano horizontal). En la figura 3.2 se muestra un esquema tomado del trabajo de Vinegoni¹, donde la luz de excitación está polarizada en dirección vertical y la detección de la emisión puede alternar entre la polarización vertical, I_{VV} (por vertical-vertical), o perpendicular, I_{VH} (vertical-horizontal). Dado que la sensibilidad del canal de emisión es diferente para luz polarizada en sentido vertical y horizontal, es necesario realizar una corrección para obtener I_{\perp} e I_{\parallel} a partir de I_{VH} y I_{VV} . La misma consiste en realizar una excitación horizontal y detecciones en dirección horizontal (I_{HH}) y vertical (I_{HV}), para obtener finalmente el factor de corrección (Ecuación 3.2):

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} = \frac{I_{VV}I_{\perp}}{I_{VH}I_{\parallel}} \quad [3.2]$$

Con el factor de corrección determinado la anisotropía se puede obtener como la ecuación 3.3:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad [3.3]$$

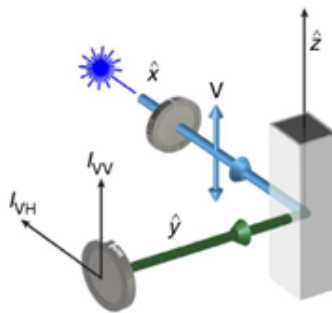


Figura 3.2. Esquema de medición de anisotropía de fluorescencia con polarizadores tomado del trabajo de Vinegoni.

3.1.4. Emisión resuelta en el tiempo

Los experimentos de fluorescencia resuelta en el tiempo se realizaron en un equipo IBH Horiba–Jobin-Ivon Time Correlated Single Photon Counting. La técnica de Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC) se basa en la utilización de una fuente de luz pulsada (láser o diodo láser) a frecuencias en el orden de los MHz y la posterior detección de fotones individuales provenientes de la muestra. El tiempo transcurrido entre el pulso de luz y el arribo del primer fotón al detector es usado a través de muchas repeticiones del experimento para obtener un histograma de tiempo de arribo de fotones. En esta técnica es importante lograr que la probabilidad de detectar dos fotones con un único pulso sea baja. Como regla general, se debe obtener una tasa de emisión de la muestra que valga el 1-3% de la frecuencia de excitación.

Para las mediciones de derivados de BODIPY se utilizó como fuente de excitación un diodo láser Horiba Jobin Yvon 405 nm LED, con <100 ps de ancho de pulso y 1 MHz de frecuencia de repetición. Si bien la longitud de onda no se corresponde con el máximo de excitación, el ancho del pulso del láser hace que la medida sea más rápida. El monocromador de excitación se fijó en 410 nm. La obtención del pulso se llevó a cabo utilizando un vidrio dispersor esmerilado dispuesto a 45° en lugar de la muestra. La emisión se colectó a 540 nm. Las rendijas de ambos monocromadores, que poseen siete posiciones (1, 2, 4, 6, 8, 16 y 32), se colocaron en posición 16 para la medición del pulso. Al introducir la muestra, se trabajó con ambas rendijas en 32 (máxima apertura). En estas mediciones se colocó un filtro GG495 (Schott, 2 mm) para evitar la llegada de luz dispersa al detector, así como un polarizador ubicado en el ángulo mágico para evitar efectos de polarización. La adquisición se realizó hasta llegar a 10.000 cuentas en el máximo, trabajando en un rango de 50 ns con 8192 canales (6,86 ps/canal).

Después de registrar los pulsos y decaimientos, se realizaron deconvoluciones mono- y biexponenciales utilizando el programa IBH Data Station. Adicionalmente, se empleó la librería lifefit de Python para ajustar una serie de exponenciales mediante una reconvolución iterativa con la función de respuesta del instrumento (IRF).

3.1.5. Medidas de fluorescencia en lector de placas

Para las medidas de fluorescencia en placas, se utilizó un lector de placa Pherastar fs, con un módulo óptico armado a partir de un filtro de excitación de 490 nm, un espejo dicroico que oficia de filtro pasa altos, y un filtro de emisión de 540 nm. El esquema del módulo se muestra en la figura 3.3.a. La placa utilizada usada fue una placa opaca de 92 wells para fluorescencia del tipo nunc.



Figura 3.3. a) representación del módulo óptico utilizado para medir intensidad de fluorescencia en lector de placas. b) Placa genérica opaca para medir fluorescencia.

Se realiza un ajuste de ganancia mapeando la placa y determinando el pocillo que presenta mayor intensidad de fluorescencia. Una vez ajustada la ganancia, se realiza una calibración de la distancia focal. Se realiza una lectura promedio orbital en la que el equipo toma medidas en distintas zonas del pocillo y promedia el valor de estas. La señal se lee desde la superficie.

3.1.6. Deconvoluciones espectrales

Los espectros de fluorescencia de las 3HCs en solventes apolares muestran dos bandas de emisión, asignadas a los estados excitados N^* y T^* (Capítulo 1.1.3).² Debido a la naturaleza solvatocrómica de las 3HCs, estas bandas varían en posición y en relación de intensidades (Ratio N/T).

Dado que las dos bandas de emisión se superponen parcialmente en algunos compuestos y solventes, se suelen realizar deconvoluciones espectrales para reconstruir el espectro final como la suma de las bandas simuladas. Para las 3HCs, estas deconvoluciones se realizan comúnmente utilizando funciones gaussianas (Gau, ecuación 3.4) o log-normal (LN, ecuación 3.5). Las funciones LN son preferidas para representar los espectros de emisión de fluoróforos ya que los espectros no suelen ser simétricos debido a las interacciones soluto-solvente.³ A partir de la determinación de las bandas simuladas, se pueden obtener de manera sistemática y precisa los parámetros de posición de máximo y área bajo la curva, a diferencia con la identificación visual de los máximos aparentes de cada banda.

$$f(x; A, \mu, \sigma) = \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad [3.4]$$

$$f(x; A, \mu, \sigma) = \frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}} \frac{e^{-\frac{(\ln(x)-\mu)^2}{2\sigma^2}}}{x} \quad [3.5]$$

En solventes polares próticos, se genera una tercera especie que produce una tercera banda de emisión: una banda aniónica (banda A, figura 3.4). Esta banda corresponde a una forma "desprotonada" donde el grupo hidroxilo en la posición 3 es afectado por puentes de hidrógeno con el entorno, lo que impide la ESIPT. Ignorar la aparición de esta tercera especie produce una desviación de la linealidad observada en solventes apróticos entre la posición de N y las relaciones de área N/T con la polaridad. Caarls y Celej^{4,5} demostraron que, al realizar deconvoluciones espectrales avanzadas y tener en cuenta esta tercera especie, la linealidad de N y T se mantiene, y las desviaciones provienen de una incorrecta interpretación de los espectros.

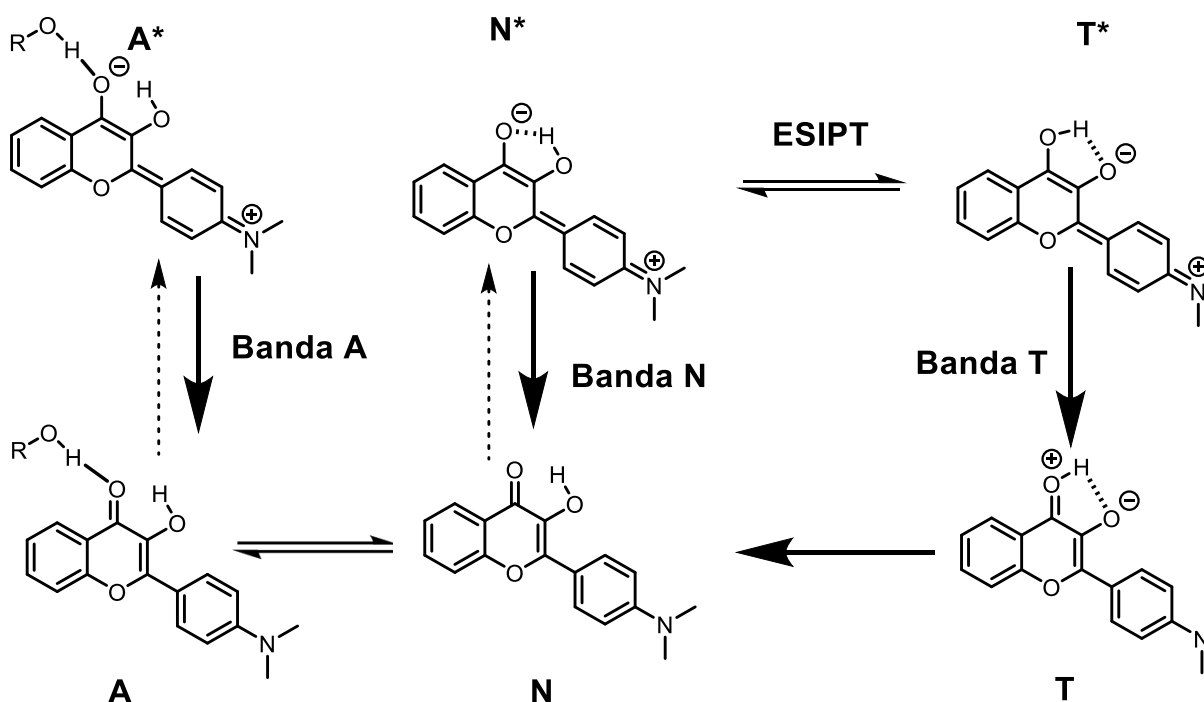


Figura 3.4. Esquema completo del ciclo ES IPT para FE en presencia de solventes próticos.

En esta tesis se realizaron deconvoluciones espectrales con el paquete de Python Imfit, utilizando una función log-normal (LN) incluida en el paquete, de tres parámetros (Posición, forma y área, ecuación 3.5) para representar con precisión las bandas de emisión en términos de parámetros espectrales. La banda de emisión de T* es ligeramente más ancha por lo que se adiciona una tercera función LN a cada espectro para mejorar su representación. Esta banda tiene un sentido físico asociado a la separación de un modo vibracional, y es dependiente de la banda T en la distancia que hay entre ellas. La banda será llamada banda vibrónica (Banda V, figura 3.5) a lo largo de este texto para mayor comprensión. De esta manera la banda T completa queda representada por la función LN T y V. En los solventes próticos o entornos acuosos se adiciona una cuarta función LN asociada a la especie A.

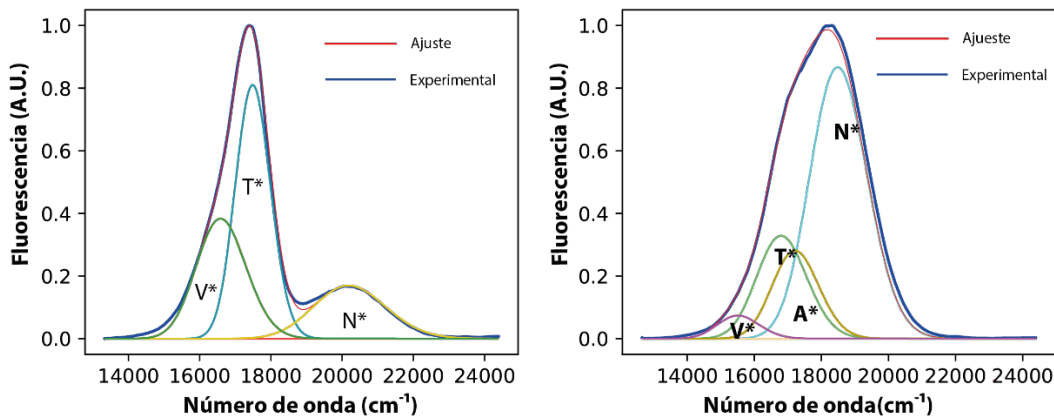


Figura 3.5. Resultado de una deconvolución espectral para 3HCs en solventes apróticos (izquierda) y próticos (derecha).

Un detalle para tener en cuenta es que si se da total libertad a los parámetros de las bandas estas pueden tomar múltiples representaciones que no tienen sentido físico pero que ajustan muy bien al espectro. Es por esto por lo que se utilizan restricciones a la hora de ajustar los parámetros de las bandas LN:

- Se limita la distancia entre la banda T y la banda vibrónica auxiliar V, de tal manera que la diferencia sea de entre 800 y 1500 cm^{-1} (característica de las vibraciones de anillos aromáticos)
- Se realiza un ajuste “asistido” en base a la correlación experimental que hay entre los parámetros tales como posición del máximo de N y ratio N/T, con ET_{30}
- La banda A se ubica a longitudes de onda mayores que la N y la distancia entre estas dos varía en torno a los 20 nm

3.2. Simulaciones computacionales

3.2.1. Docking Molecular

El docking molecular es una técnica computacional utilizada para predecir cómo una molécula, se une a una proteína u otra macromolécula. Es una herramienta ampliamente utilizada en el campo del descubrimiento de fármacos. El objetivo de esta simulación implica predecir la mejor manera (comúnmente denominada pose) en que una molécula pequeña (ligando) se une a una molécula más grande (receptor), como una proteína. Luego, se preparan las estructuras de ambas moléculas. La estructura tridimensional

del ligando se ajusta para asegurar que tenga la geometría y las cargas correctas, mientras que la estructura del receptor generalmente se obtiene de datos experimentales como la cristalografía de rayos X.

A continuación, se generan múltiples conformaciones del ligando, lo que permite explorar cómo puede encajar mejor en el sitio de unión del receptor. Estas conformaciones se colocan en el sitio de unión del receptor, utilizando diferentes algoritmos que buscan las mejores posiciones. Para cada conformación y posición, se calcula la energía de interacción entre el ligando y el receptor. Energías bajas indican interacciones favorables, mientras que energías altas indican interacciones desfavorables.

La mejor conformación y posición del ligando se selecciona en función de la energía de interacción más baja, lo que constituye la predicción de cómo el ligando se une al receptor. Finalmente, se analizan los resultados para entender las interacciones clave, como los puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, y se refinan las predicciones si es necesario utilizando métodos más avanzados o datos adicionales.

Los dockings moleculares fueron realizados con el software Protein-Ligand ANTSsystem (PLANTS).⁶ Este software utiliza un algoritmo de búsqueda estocástica que trata al ligando y a la proteína como flexibles.

Para hCAII se utilizó el PDB 3HS4 que fue cristalizado con el ligando acetazolamida. El ligando cristalizado es superpuesto con la molécula a estudiar y luego es eliminado. Se realiza una minimización local para relajar el sistema. Tanto el ligando como la proteína son preparados con el software chimera en donde se asignan cargas de Gasteiger. Para la proteína FABP2 se usa el PDB 2mji co-cristalizado con keterolac y se utiliza la misma metodología que para hCAII. Las interacciones 2D son analizadas con el software Discovery Studio y VMD.

3.2.2. Dinámica Molecular

La dinámica molecular (MD) es una técnica computacional que calcula la trayectoria de los átomos y moléculas a lo largo del tiempo de simulación. A diferencia de los métodos computacionales cuánticos, la MD se basa en la mecánica clásica y el marco temporal de las simulaciones van desde unos pocos nanosegundos a microsegundos. Las trayectorias surgen como resultado de integrar las ecuaciones de Newton para cada átomo de un sistema a estudiar.

Para seguir la dinámica de un sistema de muchas partículas con diversos potenciales de interacción, se calcula la fuerza sobre cada partícula teniendo en cuenta la influencia de sus vecinos en cada instante. Las trayectorias pueden ser trazadas permitiendo que las partículas se desplacen bajo una fuerza constante durante un breve intervalo de tiempo, recalculando luego la nueva fuerza para el próximo intervalo de tiempo corto, y así sucesivamente.⁷

El potencial que experimentan los átomos en un modelo biológico se caracteriza por lo que se denomina un campo de fuerzas. Este campo de fuerzas incluye la energía potencial resultante del movimiento de los enlaces, los ángulos, las torsiones y las componentes electrostáticas y se encuentra parametrizado de manera empírica para cada tipo de átomo.

De manera simplificada, el algoritmo de MD se puede resumir en una secuencia de pasos:

1. **Condiciones iniciales:** Proporcionar una configuración inicial del sistema que consista en las posiciones \mathbf{r}_i y las velocidades \mathbf{v}_i de los átomos en el tiempo \mathbf{t} . Calcular la energía potencial \mathbf{U} que surge de las interacciones.
2. **Calcular fuerzas:** Las fuerzas que actúan sobre cada átomo se obtienen de \mathbf{U} . Este es el paso que consume más tiempo, ya que las fuerzas surgen de las interacciones entre átomos y dependen de una amplia variedad de parámetros.

$$F_i = -\frac{\partial U}{\partial r_i} [2.6]$$

3. **Encontrar nueva configuración:** Las posiciones de los átomos en el siguiente intervalo de tiempo $\mathbf{t}+\delta\mathbf{t}$ se obtienen resolviendo la ecuación del movimiento de Newton utilizando métodos numéricos.
4. **Iteración:** Se actualiza la configuración inicial con la nueva configuración y se repite el proceso por tantos pasos como sea necesario.

Para la MD realizada para el sistema BDP-Amina/hCAII se hizo un docking inicial utilizando la sistemática descrita en la sección 3.2.1. Luego el sistema es preparado los paquetes: antechamber (preparación y parametrización del ligando), pdb4amber (preparación de la proteína y tleap (preparación y parametrización del complejo) incluidos en la suite de

Ambertools 2023. Se utilizó el software OpenMM para realizar la MD. Se realizaron 5 pasos de minimización previos utilizando potenciales armónicos decrecientes para minimizar el sistema poco a poco. El paso final de producción deriva en una trayectoria de 100 ns.

3.2.3. Métodos cuánticos (QM)

Para la realización de simulaciones usando métodos QM se utilizó el enfoque de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) para el cálculo de propiedades moleculares, y la utilización de métodos semi empíricos (GFN-xTB) para búsquedas conformacionales. Para el primer caso las geometrías son minimizadas con el nivel de teoría según cada caso y luego se realiza un cálculo de frecuencias para corroborar que la estructura minimizada es el máximo global. De este par de simulaciones surgen los orbitales moleculares de frontera, junto con las propiedades electromagnéticas de las moléculas.

Las simulaciones computacionales DFT correspondientes al capítulo 2 se realizaron con el software ORCA utilizando el par de bases/funcional B3LYP/6-311++G(d,p).

Las simulaciones computacionales del capítulo 4 para la molécula BDP-Amino se realizaron utilizando el software xtb y la utilidad CREST. Xtb emplea métodos de química cuántica semiempíricos, mientras que CREST es una herramienta de muestreo de conformeros basada en el método GFN-xTB. El modelo de **BDP-Amina** se creó en el software Avogadro, donde se llevó a cabo una minimización estructural inicial. La estructura resultante fue luego minimizada con xtb a nivel GFN-xTB y utilizada como punto de partida para la búsqueda de conformeros con CREST.

Las simulaciones computacionales correspondientes al capítulo 5 se realizaron con los recursos computacionales de la Dra Verónica Sánchez de (INQUIMAE-CONICET) utilizando el software Gaussian 09. Todas las geometrías se optimizaron mediante DFT para el estado fundamental y TD-DFT para el estado excitado, ambos en fase gaseosa. Se probaron tres niveles de teoría usando como referencia la molécula **FE**: CAM-B3LYP/TZVP, B3LYP/6-31+g y PBE0/TZVP. Este último proporciona una mejor aproximación respecto a los resultados experimentales, y es ampliamente usado en bibliografía para el cálculo de 3HC. Después de la optimización de la geometría, se realizaron cálculos de frecuencias para verificar la ausencia de frecuencias imaginarias,

confirmando que se alcanzó un mínimo global. Las fuerzas del oscilador se calcularon a partir de la geometría optimizada del estado fundamental utilizando el método de “Linear Response”(LR). Se utilizó el programa Multiwfn para calcular el Gradiente de Densidad Reducida (RDG). El software VMD se empleó para representar gráficamente orbitales y moléculas.

3.3. Obtención de proteínas

La proteína hCAII fue expresada a partir de un plásmido pET51b_HCAII que contiene el gen codificante para esta. El plásmido incluye una secuencia que codifica una cola de histidinas (His-Tag) al final del gen proteico, lo que facilita la posterior purificación de la proteína. También incluye el promotor T7, que permite controlar la expresión del gen, y un gen que aporta resistencia al antibiótico ampicilina. Los pasos para obtener la proteína fueron:

Transformación y selección de bacterias: Las células competentes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) se transforman con el plásmido. Las bacterias transformadas se cultivan en un medio de cultivo Luria-Bertani (LB) que contiene ampicilina para seleccionar solo aquellas células que han incorporado el plásmido.

Inducción de la expresión: Una colonia de bacterias transformadas se inocula en un Erlenmeyer con medio de cultivo LB y se incuba hasta alcanzar una densidad óptica (absorbancia a 600 nm) de 0,5, medida por espectroscopia de absorción. La expresión de hCAII se induce añadiendo el agente inductor IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), al medio de cultivo. Este activa el promotor T7 y la maquinaria transcripcional comienza a producir grandes cantidades de hCAII.

Cosecha de células y lisis: Luego del período de inducción (toda la noche), las células se cosechan por centrifugación y se resuspenden en buffer de lisis. (Tris, 80 mM, NaCl 300 mM, Tween 0,01%, imidazol 15 mM, PMSF 1 mM pH=8,8). Las células resuspendidas se lisan mediante sonicación para liberar el contenido intracelular, incluyendo la proteína hCAII.

Purificación de la proteína: La proteína hCAII, que contiene la cola de histidinas, se purifica mediante cromatografía de afinidad con His-Tag. El lisado celular se pasa a una columna de agarosa de 1 mL de volumen muerto unida a níquel (HisTrap HP, Amersham Biosciences), donde las histidinas de

la proteína se unen fuertemente al metal. Las impurezas se eliminan mediante lavados con un buffer de baja concentración de imidazol (Tris, 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 15 mM, pH=8). Finalmente, la proteína hCAII se eluye de la columna con un buffer de alta concentración de imidazol (Tris, 20 mM, NaCl 300 mM, imidazol 200 mM, pH=8)), que compite con la His-Tag por los sitios de unión al níquel. Finalmente se realiza un filtrado en centrifuga usando un filtro Amicon® de 5 mL con una membrana de 10 Kda de poro. La solución filtrada se resuspende en buffer HEPES (50 mM, pH = 7,2).

Verificación de pureza: La pureza de la proteína hCAII purificada se verifica llevando a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando un marcador de peso molecular.

La proteína HSA es adquirida comercialmente (A1887, Sigma-Aldrich) y la proteína FABP-2 es provista por el Dr. Lisandro Falomir Lockhart (INIBIOLP-CONICET)

3.4. Referencias

1. Vinegoni C, Fumene Feruglio P, Brand C, Lee S, Nibbs AE, Stapleton S, et al. Measurement of drug-target engagement in live cells by two-photon fluorescence anisotropy imaging. *Nat Protocols*. 2017;12(7):1472.
2. Klymchenko AS, Pivovarenko VG, Ozturk T, Demchenko AP. Modulation of the solvent-dependent dual emission in 3-hydroxychromones by substituents. *New J Chem*. 2003;27(9):1336.
3. Siano DB, Metzler DE. Band Shapes of the Electronic Spectra of Complex Molecules. *The Journal of Chemical Physics*. 1969;51(5):1856.
4. Celej MS, Caarls W, Demchenko AP, Jovin TM. A triple-emission fluorescent probe reveals distinctive amyloid fibrillar polymorphism of wild-type alpha-synuclein and its familial Parkinson's disease mutants. *Biochemistry*. 2009;48(31):7465.
5. Caarls W, Soledad Celej M, Demchenko AP, Jovin TM. Characterization of coupled ground state and excited state equilibria by fluorescence spectral deconvolution. *J Fluoresc*. 2010;20(1):181.

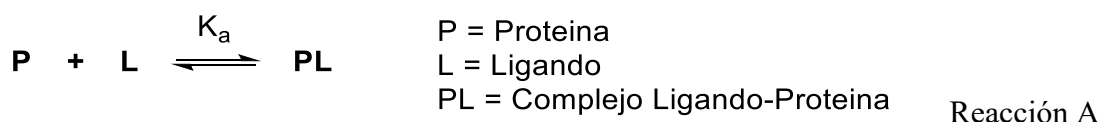
6. Korb O, Stützle T, Exner TE. An ant colony optimization approach to flexible protein–ligand docking. *Swarm Intelligence*. 2007;1(2):115.
7. Battimelli G, Ciccotti G. Berni Alder and the pioneering times of molecular simulation. *The European Physical Journal H*. 2018;43(3):303.

Capítulo 4

Determinaciones en sistemas proteicos

4.1. Introducción

La magnitud que determina la fuerza de la unión entre una molécula pequeña con una proteína (Reacción A) es la variación de energía libre tras la unión (Ecuación 4.1).



$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad [4.1]$$

La técnica más directa para obtener los valores de ΔG es la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) que mide el calor liberado en la reacción A. De manera indirecta, la constante de afinidad (K_a) que es proporcional a la energía libre de Gibbs, se puede determinar mediante técnicas como la resonancia magnética nuclear, el uso de ligandos radioactivos y métodos espectroscópicos como absorción y emisión.¹⁻³ En todos los casos, se realiza una titulación y, a partir del ajuste de la respuesta de la señal con modelos de unión ligando proteína se obtiene el valor de K_a . En particular, las técnicas de fluorescencia permiten desarrollar ensayos simples, utilizando concentraciones de sondas en el rango de 0,1-1 μM y obteniendo resultados rápidamente.

El objetivo principal de esta tesis es encontrar una metodología que permita determinar si una molécula es un ligando de una proteína, es decir, si se une al sitio de unión o no. Para esto se sintetizaron distintas sondas fluorescentes (capítulo 2) específicas a los sistemas proteicos propuestos (hCAII, FABP). Según la hipótesis inicial, al producirse la unión de la sonda con la proteína con una constante de afinidad K_a , habrá un cambio de señal de fluorescencia debido a la naturaleza de los fluoróforos elegidos que son sensibles al entorno. Luego cuando se introduce un ligando específico de la proteína estudiada, y si la K_a es al menos del mismo orden que la de la sonda, se espera un nuevo cambio en la señal por desplazamiento total o parcial del sensor.

Para que el ensayo sea efectivo, la sonda tiene que mostrar una constante de afinidad intermedia. Si la unión es débil, cualquier molécula que interaccione débilmente con el bolsillo hidrofóbico de la proteína podría desplazar la sonda, y se obtendrían una multitud de falsos positivos. Por el

contrario, si la afinidad es muy elevada, no se detectarían muchos ligandos con menor capacidad de unión, pero que aún se unen los suficientemente fuerte. Por ello, la constante de afinidad (o su inversa, la constante de disociación) es una magnitud importante a considerar. Por un lado, proporciona información sobre la utilidad de la sonda para el ensayo, y por el otro, si el valor obtenido se encuentra en el rango de lo reportado, indica que la metodología es precisa y robusta.

En este capítulo se presentan los resultados de un ensayo de unión de la sonda con la proteína, que permite determinar la constante de afinidad de la molécula por el sistema. Este dato es relevante porque establece un valor umbral de referencia: cualquier molécula que desplace a la sonda tendrá una constante de afinidad similar o mayor. Además, se desarrolla un ensayo de desplazamiento de la sonda por un ligando específico de la proteína blanco. Este ensayo permite determinar, a partir de medidas de fluorescencia y la constante de afinidad de la sonda previamente calculada, la constante de afinidad de la molécula estudiada.

4.1.1. Determinación de constantes de afinidad de las sondas

De manera general la unión entre una molécula y una proteína puede caracterizarse como:



En donde P y L son la proteína y el ligando, respectivamente, y K_{mn} es la constante de equilibrio para la reacción de unión ligando-proteína. La problemática básica a la hora de determinar la constante de equilibrio es que las concentraciones implicadas en la expresión son las concentraciones libres, las cuales *a priori* se desconocen. Se considerará un sistema de estequiometría 1 a 1 para llevar a cabo el desarrollo matemático y encontrar una expresión útil para calcular la constante de equilibrio. Para este sistema la reacción de formación del complejo PL es:



Y su constante de equilibrio queda expresada como:

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad [4.2]$$

El objetivo es encontrar una expresión que permita encontrar los valores de K_a en función de la señal de fluorescencia F que puede expresarse en términos de las concentraciones de cada especie y sus coeficientes de fluorescencia:

$$F = f_p[P] + f_L[L] + f_{pl}[PL] \quad [4.3]$$

Los términos f_x corresponden a los coeficientes de fluorescencia para cada especie (análogos al coeficiente de extinción molar). La ecuación 4.3 se puede simplificar si hay especies que no presentan una emisión de fluorescencia significativa. Este caso suele ser el de la proteína si la emisión de la sonda se da a longitudes de onda mayores a 400 nm, por lo que se puede reducir la expresión a:

$$F = f_L[L] + f_{pl}[PL] \quad [4.4]$$

Dado que las concentraciones libres no son conocidas, pero sí lo son las concentraciones totales $[P]_0$ y $[L]_0$ se puede plantear un balance de masa como:

$$[P]_0 = [P] + [PL] \quad [4.5]$$

$$[L]_0 = [L] + [PL] \quad [4.6]$$

Despejando $[P]$ y $[L]$ en las ecuaciones 4.5 y 4.6 y reemplazamos en la expresión de la constante de equilibrio 4.2, aplicando producto de binomios en el denominador obtenemos la ecuación 4.7:

$$K_a = \frac{[PL]}{([P]_0 - [PL])([L]_0 - [PL])} = \frac{[PL]}{[PL]^2 - ([P]_0 + [L]_0)[PL] + ([P]_0)[L]_0} \quad [4.7]$$

La expresión anterior es una ecuación cuadrática, y si la reorganizamos obtenemos:

$$[PL]^2 - [PL] \left([P]_0 + [L]_0 + \frac{1}{K_a} \right) + ([P]_0)[L]_0 = 0 \quad [4.8]$$

Si consideramos la raíz real de la ecuación 4.8 se obtiene a la ecuación 4.9:

$$[PL] = \frac{1}{2} \left\{ \left([P]_0 + [L]_0 + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{\left([P]_0 + [L]_0 + \frac{1}{K_a} \right)^2 - 4[P]_0[L]_0} \right\} \quad [4.9]$$

El segundo término de la ecuación 4.4 queda determinado ya que ahora tenemos una expresión para [PL] en función de magnitudes conocidas y solo una incógnita a calcular, que es K_a . Resta evaluar el primer término, que es la concentración libre de L. Por ello, se puede reemplazar [L] despejando de la ecuación 4.6 del balance de masas:

$$F = f_L([L]_0 - [PL]) + f_{pl}[PL] = f_L[L]_0 + [PL](f_{pl} - f_L) \quad [4.10]$$

El primer término de la ecuación anterior $f_L[L]_0$ no es más que el background introducido por el ligando, es decir su emisión basal en las condiciones medidas. Este valor se muestra como F_0 en las siguientes ecuaciones. Ahora la concentración libre del complejo queda en función de la fluorescencia como:

$$[PL] = \frac{F - F_0}{(f_{pl} - f_L)} \quad [4.11]$$

Y si reemplazamos [PL] por la ecuación 4.9 y reorganizamos obtenemos la ecuación 4.12:

$$\Delta F = F_{\Delta PL} \left(\frac{1}{2} \left\{ \left([P]_0 + [L]_0 + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{\left([P]_0 + [L]_0 + \frac{1}{K_a} \right)^2 - 4[P]_0[L]_0} \right\} \right) \quad [4.12]$$

En donde $\Delta F = F - F_0$ y $F_{\Delta PL}$ es $f_{pl} - f_L$

Con esta expresión, las variables desconocidas son K_a , que es lo que queremos determinar y también $F_{\Delta PL}$. Para obtener las variables incógnitas se hace una titulación (Figura 4.1) en la que la concentración de ligando $[L]_0$ se mantiene fijo y se varía la concentración total de proteína $[P]_0$. El motivo por el cual la concentración de ligando se mantiene constante en este caso deriva de asegurar que los cambios en la emisión sean debido a la presencia de la proteína, y que no existan efectos relacionados al cambio de concentración del fluoróforo, como puede ser la formación de exímeros o agregados moleculares. A partir de una regresión no lineal de los datos con el modelo presentado en la ecuación 4.12 se determinan las variables incógnitas, obteniéndose así la K_a . A fines prácticos se reemplaza K_a por K_D

($K_D = 1/K_a$) ya que las unidades de la constante de disociación son concentraciones, lo que hace que las comparaciones sean más directas e intuitivas.

El modelo que surge de la ecuación 4.12 es llamado modelo 1. Además, se explorará un modelo más simplificado, que se llamará modelo 2, que proviene de la expresión 4.13:

$$F = \frac{B_{max}P_0}{K_D + P_t} \quad [4.13]$$

Esta ecuación es la utilizada por el software comercial GraphPad para el modelo de unión a un sitio. Si bien la estequiometría esperada para todos los sistemas planteados en esta tesis es 1:1, se usará adicionalmente el modelo de unión a dos sitios del software comercial antes mencionado, para realizar una comprobación rápida de dicha estequiometría.

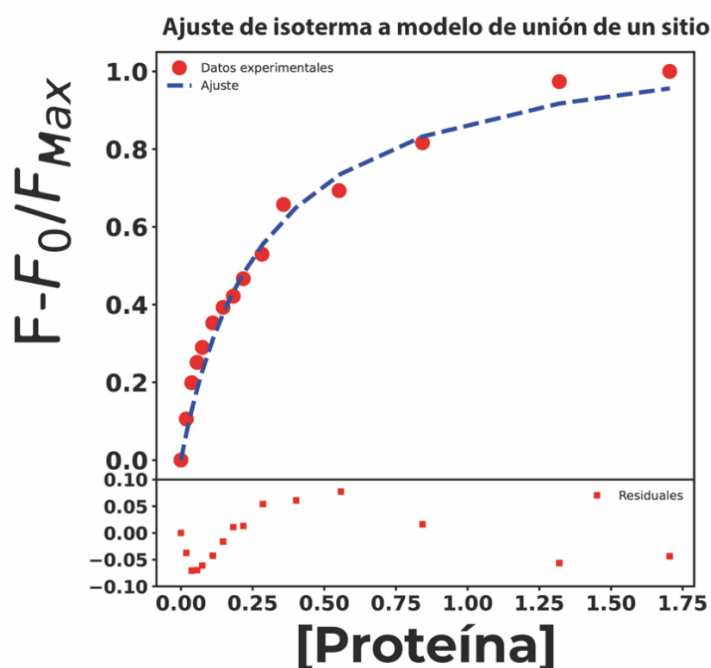
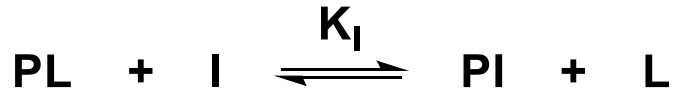


Figura 4.1. Ejemplo de ajuste de una isoterma de titulación con un modelo de unión a un sitio

4.1.2. Determinación de constantes de afinidad de ligandos competitivos

Una vez formado el complejo ligando proteína, se introducen al sistema ligandos competitivos que desplazan al ligando fluorescentes:



La constante de unión del ligando competitivo K_i también puede obtenerse realizando titulaciones de fluorescencia. El modelo es más complejo dado que la concentración del complejo PL que es la que tiene correlación de fluorescencia depende tanto de K_D como de K_i y de la concentración del ligando competitivo I. Esto hace que en lugar de obtener una ecuación cuadrática como la ecuación 4.8 se obtenga una ecuación cúbica (Ecuación 4.14). Para este tipo de problemas se suele plantear una solución numérica utilizando el método iterativo de Newton.

$$A[PL]^3 + B[PL]^2 + C[PL] + D = 0 \quad [4.14]$$

Por otro lado, Blay y colaboradores⁴ reportan una solución analítica aproximada, que acelera el proceso de cálculo, que corresponde a una implementación más simple y puede aplicarse a una titulación de fluorescencia en la que se varía la concentración del ligando competitivo.

$$A = K_D + K_i + [L]_0 + [I]_0 - [P]_0 \quad [4.15]$$

$$b = K_D([I]_0 - [P]_0) + K_i([I]_0 - [P]_0) + K_D K_i \quad [4.16]$$

$$g = -K_D K_i [P]_0 \quad [4.17]$$

$$t = \arccos \left(\frac{-2a^3 + 9ab - 27g}{2\sqrt{(a^3 - 3b)^3}} \right) \quad [4.18]$$

$$[P] = \frac{2}{3} \sqrt{(a^2 - 3b)} \cos \left(\frac{t}{3} \right) - \frac{a}{3} \quad [4.19]$$

$$[PL] = \frac{[P] \cdot [L]_0}{K_D + [P]} \quad [4.20]$$

$$F = B + f_{pl} \cdot [PL] \quad [4.21]$$

Mediante ajuste no lineal se determina la constante del ligando competitivo K_i . Es importante destacar que primero se debe determinar la constante de disociación de la sonda (K_D), puesto que es un parámetro fijo

utilizado en el modelo de desplazamiento, donde la concentración del complejo sonda-proteína ahora depende tanto de K_D como de K_i .

4.1.3. Diseño de experimentos

Para llevar a cabo los ensayos y titulaciones de fluorescencia, es fundamental considerar que las concentraciones de sonda fluorescente, y de la proteína deben definirse con precisión. El rango de concentraciones de la sonda se determina por la técnica de detección utilizada. En particular, la emisión de fluorescencia permite trabajar en rangos de entre 0,1 μM y 1 mM dependiendo del rendimiento cuántico de los fluoróforos.⁵ Los BODIPYs utilizados en esta tesis muestran rendimientos cuánticos elevados en la mayoría de los entornos (0,6 - 0,9) a excepción de en agua y nos permite explorar rangos de concentraciones del orden de los 0.1 μM . Mientras que, las cromonas si bien muestran una marcada emisión de fluorescencia en entornos no polares, requieren una concentración más elevada que los BODIPYs puesto que su rendimiento cuántico es considerablemente menor.⁶

La constante de disociación esperada determina qué concentración debe elegirse para la proteína. Wilcox⁷ realizando simulaciones determino los rangos de concentración de titulante relevantes para obtener resultados de titulación más confiables. Las reglas generales que se obtienen son:

- Si $K_D > [\text{Sonda}]_0$ (por lo tanto, K_a bastante bajo) en al menos un orden de magnitud sería aconsejable recopilar varios puntos de datos en el rango de 1-20 equivalentes de proteína añadidos.
- Si $K_D < [\text{Sonda}]_0$ es esencial obtener tantos puntos como sea posible entre 0-1 equivalentes de proteína añadidos.
- Si $K_D \approx [\text{Sonda}]_0$, se obtiene una buena determinación en cualquier lugar dentro del rango de 0 a 10 equivalentes de proteína añadidos

Una relación general a la que llega Hirose⁸ es:

$$\frac{1}{10} \cdot K_D \leq [P]_{total} \leq 10 \cdot K_D \quad [4.22]$$

De esta manera como el rango de concentraciones de la sonda es fijo, a la hora de diseñar los experimentos la única variable que se puede ajustar libremente para obtener los mejores resultados posibles es la concentración de la proteína.

4.1.4. Tipo de determinaciones

En la siguiente sección se describirán los procedimientos experimentales de las determinaciones llevadas a cabo. Para la titulación de fluorescencia se adoptaron dos enfoques (secuencial e independiente) mientras que en el ensayo de desplazamiento con ligandos específicos uno (secuencial).

4.1.4.1. Determinación de unión simple

Se denomina determinación de unión simple a un ensayo que consta de una medida única en la que se incuba la sonda con la proteína, en buffer y se toma o bien un espectro de fluorescencia o se hace una lectura rápida de la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión utilizando un lector de placas. Estas medidas son cualitativas y forman parte de un primer acercamiento al estudio de cómo se comporta el sistema. Un cambio en la señal a partir de este ensayo no es garantía de unión entre la sonda y la proteína, pero es un indicio de que algo está ocurriendo. Por el contrario, si no hay cambios en la señal, se puede descartar la existencia de la unión entre los pares.

4.1.4.2. Titulaciones de unión

La titulación de fluorescencia con su posterior ajuste a un modelo de unión es una determinación cuantitativa en la que se mide la emisión de fluorescencia del fluoróforo a una concentración fija, en relación con el aumento de concentración de proteína. Para una dinámica de unión ligando-proteína se espera una gráfica del tipo asintótica, en la que se llega a una meseta (Figura 4.1). Luego se ajustan los datos utilizando los modelos desarrollados en la sección 4.1.1. Si los datos se ajustan correctamente al modelo, se puede confirmar que existe una unión entre las dos partes, y se puede determinar su constante de afinidad y su estequiometría. En el caso contrario, se deben explorar modelos alternativos más complejos, que incluyan otras estequiometrías, u otros fenómenos como el cooperativismo.

En esta tesis se llevan a cabo dos tipos de titulaciones: secuenciales e independientes (Figura 4.2). La titulación secuencial involucra dos soluciones: una solución a titular, que se encuentra en la cubeta de fluorescencia usada para la medición, y que consta en la sonda fluorescente en buffer a una concentración fija; y la solución titulante, que está

compuesta por la proteína blanco en buffer, junto con la sonda a la misma concentración que en la cubeta de medida. La concentración de la sonda se mantiene constante para que cualquier cambio en la intensidad de fluorescencia se deba únicamente a la interacción del ligando fluorescente con la proteína. En algunos casos, se adiciona una cantidad controlada de DMSO para favorecer la solubilidad. Luego de cada agregado de solución titulante, se incuba durante cinco a diez minutos, según corresponda.

El segundo tipo de titulación consiste en realizar determinaciones independientes, en las que se prepara una solución para cada medida, manteniendo constante la concentración de la sonda fluorescente y el porcentaje de DMSO, y variando las concentraciones de la proteína. Cada solución se incuba durante cinco a diez minutos, según corresponda. Este enfoque permite realizar varias medidas para un solo punto, lo que es útil para mitigar errores experimentales. Sin embargo, presenta la desventaja de que el consumo de proteína, que es el recurso habitualmente escaso, es mayor.

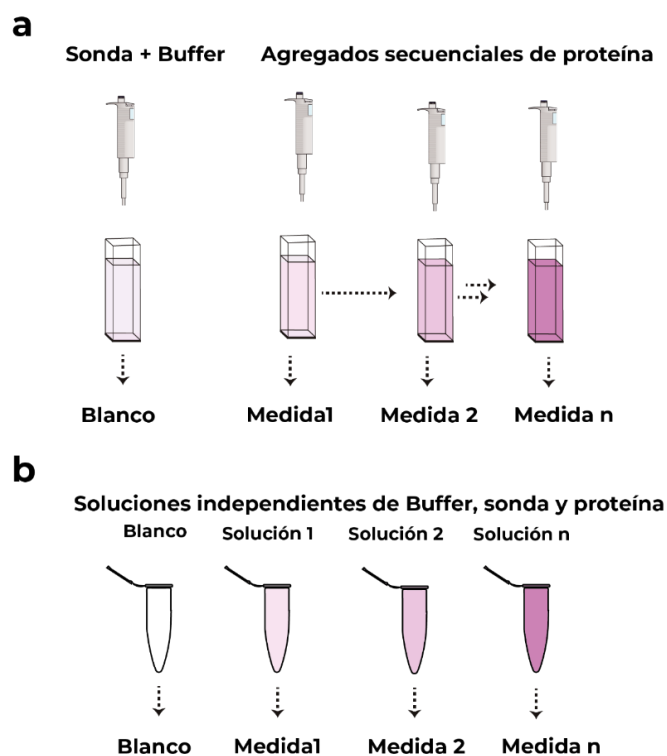


Figura 4.2. Representación de las titulaciones a) Secuenciales, b) Independientes

El esquema de titulaciones con determinaciones independientes se realiza tanto en el espectrofluorómetro como en un lector de placas. En este

último se obtienen un valor de intensidad a una longitud de onda fija dado que el equipo no dispone de la función para medir espectros completos. Esta modalidad permite realizar titulaciones más rápidas y replicadas.

4.1.4.3. Titulación de desplazamiento

El ensayo de desplazamiento se realiza como una titulación secuencial en la que la solución a titular se encuentra conformada por una concentración fija de sonda, junto con la proteína a estudiar. Por otro lado, la solución titulante contiene a la sonda fluorescente y a la proteína en la misma concentración que la solución a titular y además se adiciona el ligando competitivo. Este experimento se realiza con el fin de estudiar que ocurre con la señal cuando la sonda es desplazada y así obtener una constante de afinidad del ligando y comparar con los valores reportados en bibliografía. Para realizar el ajuste se usa un modelo de desplazamiento que es la resolución analítica de la ecuación de unión competitiva, descrita en la sección 4.1.2.

4.2. Resultados

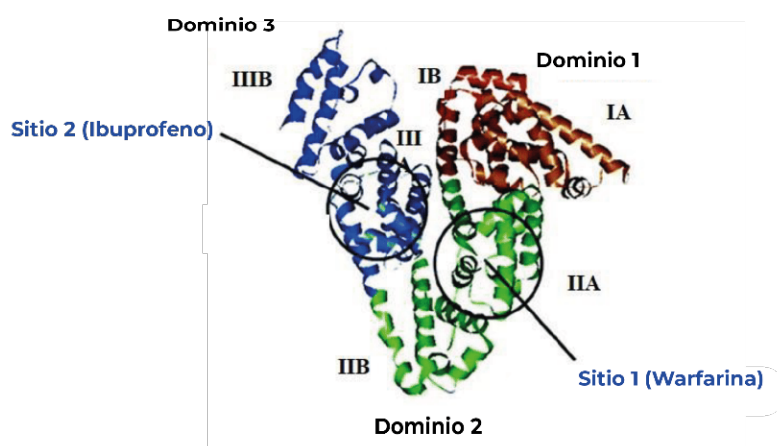
En las siguientes secciones se discutirán los resultados obtenidos a partir de los ensayos previamente mencionados. En primer lugar, se utilizará la proteína Sero albumina humana, que se caracteriza por su capacidad para unir moléculas pequeñas en general. Existen reportes en literatura en los que se emplean fluoróforos similares a los desarrollados en este trabajo (como **I-BDP** y **H-BDP**). Esta disponibilidad de información facilita la puesta a punto de las determinaciones y se utilizara para validar la metodología empleada. Luego, con los ensayos optimizados y validados, se evaluarán las sondas específicas diseñadas para detectar las proteínas hCAII y FABP. En aquellos casos donde se determine unión entre sonda-proteína, se realizan las determinaciones de desplazamiento.

4.2.1. Sistema Albúmina de suero Humano

La Albúmina sérica humana o Albúmina de suero humano (HSA, por sus siglas en inglés, Human Serum albumin) es una proteína ampliamente estudiada debido a su papel crucial como transportador de compuestos exógenos, endógenos y ácidos grasos en el torrente sanguíneo. Su flexibilidad estructural y la presencia de tres dominios similares, llamados

dominio I, II y III, permiten esta función. Cada dominio se subdivide en dos subdominios: IA, IB, IIA, IIB, IIIA y IIIB (Figura 4.3.a). Se han identificado varios sitios de unión en la HSA, siendo los más importantes los ubicados en los subdominios IIA y IIIA, conocidos como sitios 1 y 2, donde se unen la warfarina e ibuprofeno, respectivamente (Figura 4.3.b). Como el modo de unión y las constantes de afinidad de estas moléculas se conocen en detalle, se suelen utilizar como marcadores de sitio.⁹

a



b

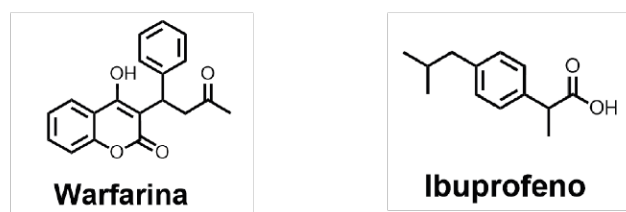


Figura 4.3 a) Estructura de la proteína HSA con sus respectivos sitios de unión. b) Estructura de los ligandos warfarina e ibuprofeno. Adaptado de Golianová et.al.¹⁰

Es debido a su capacidad para unir diversas moléculas que se utiliza la HSA como el primer sistema en el cual se estudiará el comportamiento de fluorescencia de la sonda **BDP-morfolina**, así como los fluoróforos **I-BDP** (2) y **H-BDP** (8).¹¹ Además, se llevarán a cabo ensayos de desplazamiento con los ligandos warfarina e ibuprofeno. Ambos se unen a diferentes sitios de unión de la proteína y se emplean para caracterizar a qué sitio se une cada fluoróforo estudiado.

4.2.1.1. Determinaciones con I-BDP

Determinaciones simples en distintos medios

El fluoróforo **I-BDP** (2) es tomado como modelo y se realizan una serie de medidas cualitativas para conocer el comportamiento de fluorescencia de los derivados BODIPY meso sustituidos en diferentes entornos. Primero, se toman tres medidas independientes en buffer Tris (50 mM, pH = 7,2), DMSO y luego en una solución 12 μ M de la proteína HSA. En todos los casos, la concentración de la sonda es 0,1 μ M.

Cuando el fluoróforo se encuentra en DMSO, la respuesta de fluorescencia es 17 veces mayor que en buffer (Figura 4.4.a). Aunque el BODIPY utilizado no muestra una alta sensibilidad a la polaridad ni a la viscosidad cuando estas son bajas (ver capítulo 1.2.4), la hidrofobicidad presente en este tipo de moléculas se traduce en una intensidad de fluorescencia disminuida debido a la formación de agregados que reduce la concentración del fluoróforo en solución acuosa.¹² Este tipo de respuesta es frecuente en fluoróforos orgánicos hidrofóbicos o que son poco solubles en soluciones acuosas.¹²⁻¹⁴

En presencia de la proteína, la intensidad de fluorescencia aumenta tres veces respecto a la intensidad en buffer, y el máximo se desplaza 3 nm hacia el rojo (Figura 4.4.b, verde). Este aumento en la intensidad de fluorescencia se debe a una combinación de la “desagregación” del fluoróforo para formar el complejo ligando-proteína¹⁵ y el cambio en el entorno del fluoróforo. Sin embargo, no se alcanzan los niveles de emisión observados en DMSO, porque la concentración de equilibrio del complejo ligando-proteína es menor que la concentración de ligando total. Este resultado confirma que la determinación cualitativa se realizó correctamente y que el **I-BDP** se une a la proteína, como se reporta en bibliografía.

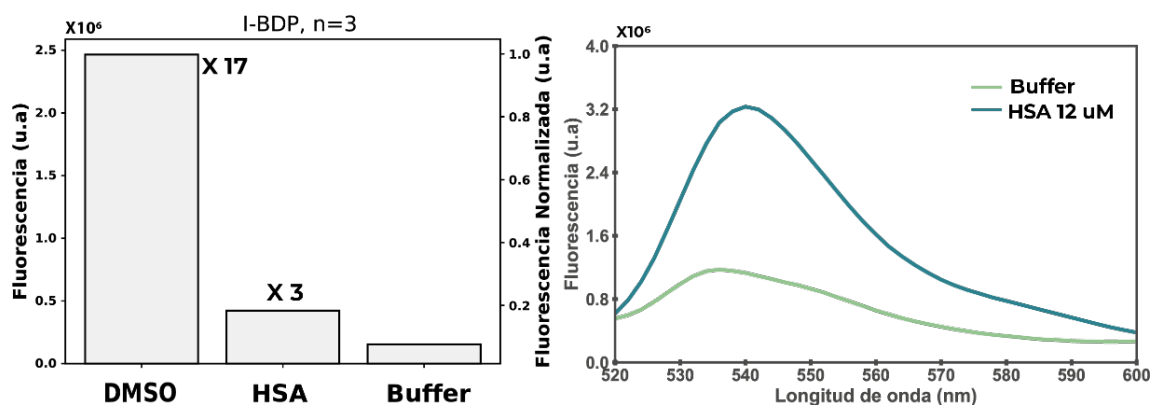


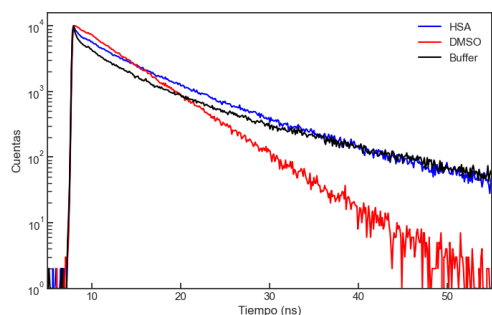
Figura 4.4 a) Intensidad de fluorescencia de **I-BDP** ($0,1 \mu\text{M}$) en DMSO, HSA ($12 \mu\text{M}$) y Buffer Tris (50 mM , $\text{pH} = 7,2$) a $\lambda_{em} = 490 \text{ nm}$, b) Espectros de emisión de **I-BDP** ($0,1 \mu\text{M}$) en HSA ($12 \mu\text{M}$) y Buffer Tris (50 mM , $\text{pH} = 7,2$).

Como la intensidad de fluorescencia depende directamente de la concentración, se miden los tiempos de vida estacionarios del **I-BDP** en los tres entornos diferentes. Los resultados se presentan en la figura 4.5. En todos los casos, se observan dos componentes: una de tiempos de vida cortos, alrededor de $0,2 \text{ ns}$, y otra más larga, que varía entre $4,37 \text{ ns}$ en DMSO a $5,34 \text{ ns}$ en HSA.

La componente corta del tiempo de vida de fluorescencia resulta comparable en los tres entornos y no está asociada con agregados del fluoróforo, sino con inhomogeneidades en la solución.¹⁶ Mientras que la componente larga varía en valor y peso según el entorno. Al añadir HSA, el valor de esta componente larga aumenta levemente y su peso se duplica en comparación con el fluoróforo en solución acuosa. Este resultado indica que la formación del complejo ligando-proteína incrementa la contribución de la especie emisora. No obstante, los tiempos de vida de la componente larga varían poco, lo que evidencia que la especie emisora es similar tanto en el complejo ligando-proteína como en la solución acuosa. Esto sugiere que los cambios en la emisión de fluorescencia se deben más a la desagregación del fluoróforo que a modificaciones en su entorno.

Por otro lado, los tiempos de vida de la componente larga en DMSO son 1 ns más cortos que en solución acuosa. Aunque el rotor utilizado no presenta una marcada dependencia con la viscosidad del entorno, a densidades bajas las interacciones soluto-soluto y soluto-solvente empiezan a influir en el comportamiento de estos fluoróforos (ver capítulo 1.2.4). Este experimento, al ser independiente de la concentración, confirma de manera más precisa que el **I-BDP** en solución acuosa presenta un rendimiento

cuántico reducido debido a la concentración. A pesar de que los tiempos de vida en solución acuosa son mayores (y proporcionalmente relacionados con el rendimiento cuántico), el DMSO muestra una intensidad de fluorescencia 17 veces mayor con la misma concentración de fluoróforo.



	τ (ns)	Pesos
Buffer	0,19	86%
	5,16	14%
HSA	0,26	72%
	5,34	28%
DMSO	0,24	41%
	4,37	59%

Figura 4.5. Curvas de decaimiento de tiempos de vida de **I-BDP** en DMSO, HSA (10 μ M) y buffer Tris (50 mM, pH = 7,2), b) Tabla con valores los valores de tiempo de vida y la contribución de cada componente a la curva de decaimiento (pesos).

Titulación de fluorescencia en HSA

Se realiza una titulación de fluorescencia secuencial por duplicado para determinar la estequiometría de unión, la constante de disociación y así comparar con los datos bibliográficos para validar la metodología adoptada. En una cubeta se introduce una solución base compuesta por **I-BDP** 0,1 μ M en buffer Tris (50 mM, pH = 7,2) y se adicionan cantidades crecientes de la solución titulante conformada por la solución base junto con HSA 70 μ M. El porcentaje final de DMSO es de 5% y se incuba 5 minutos entre cada medida. Es importante destacar que se realizaron varias determinaciones, puesto que el ensayo es considerablemente irreproducible y muestra una marcada variabilidad entre titulaciones, así como una considerable tasa de fallo por problemas experimentales como formación de burbujas, problemas de pipeteo, etc. La K_D para este tipo de moléculas en HSA (o su análoga bobina, BSA) se encuentra en el orden de los 1-10 μ M.¹¹ De esta manera como punto de partida se puede asumir que la K_D es mayor a la concentración de la sonda y por ende se deben muestrear concentraciones que representen al menos 20 equivalentes de la proteína (Ver sección [4.1.3](#)).

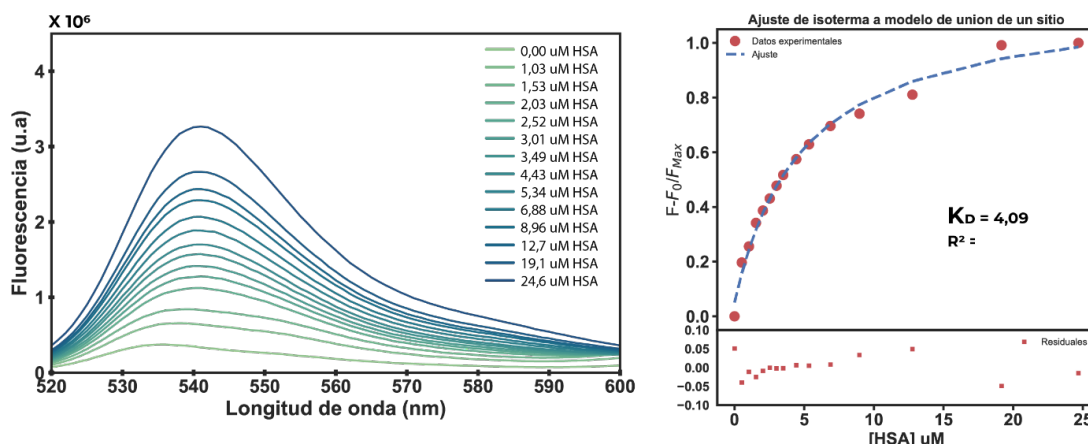


Figura 4.6 Titulación de I-BDP (0,1 μM) con HSA a) Espectros de fluorescencia de la titulación. b) Isotherma de titulación ($K_D = 4,09 \mu\text{M}$ y $R^2 = 0,99$).

Los espectros de fluorescencia obtenidos de los sucesivos agregados de titulante (Figura 4.6.a) muestra un aumento en la señal de un 600%. La isoterma de titulación (Figura 4.6.b) es ajustada con los distintos modelos de unión ligando-proteína descritos en la sección 4.1.4.2 (modelo 1, modelo 2 y modelo comercial para un sitio y modelo comercial para dos sitios).

La tabla 4.1 presenta los resultados de los distintos ajustes realizados. Aunque el modelo comercial para dos sitios muestra un valor adecuado de R^2 (0,987), el grado de incerteza en la determinación de las K_D tiende a infinito, por lo que este modelo se descarta y se asume una estequiometría 1 a 1. Al comparar entre los tres modelos de unión a un sitio, se obtienen valores similares de K_D y R^2 superiores a 0,95. La falta de información sobre las ecuaciones subyacentes y las aproximaciones potenciales empleadas en el proceso de ajuste hace que el modelo comercial se descarte. Esto, junto con la ausencia de mejoras significativas en comparación con los modelos propios, hace que esta opción no sea la adecuada.

Tabla 4.1. Estudio de ajustes de isotermas mediante distintos modelos

	K_D (1) μM	K_D (2) μM	R^2	AIC
Un sitio (modelo 1)	4,89 +/- 2,43	-	0,990	-97,99
Un sitio (modelo 2)	4,09 +/- 0,34	-	0,987	-99,64
Un sitio (comercial)	4,094 +/- 0,85	-	0,987	-95,46
Dos sitios (comercial)	0,53 +/- INF	5,26 +/- INF	0,996	-104,9

K_D (1) = primer constante de disociación

K_D (2) = segunda constante de disociación para el modelo de dos sitios

AIC = criterio de Información de Akaike

En cuanto a los modelos propios (ver sección 4.1.1, modelo 1 y modelo 2), ambos muestran valores de R^2 similares entre sí. Por lo tanto, se utiliza un criterio adicional, el Criterio de Información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés, Akaike Information Criterion). Este criterio busca identificar el modelo que mejor explica los datos con el menor número de parámetros, penalizando tanto la complejidad del modelo (número de parámetros) como la falta de ajuste (verosimilitud). Un modelo con un AIC más bajo se considera más adecuado. El modelo 2 da un AIC menor y los intervalos de confianza mucho más acotados, indicando que es más efectivo en relación con las variables utilizadas. Esto es coherente, ya que es una versión simplificada del modelo 1, con menos variables. Por lo tanto, se optará por el modelo 2 para el resto de las isothermas en este trabajo.

La K_D para **I-BDP** en relación con HSA es de $4,09 \mu\text{M}$ para una réplica, y $3,23 \mu\text{M}$ para el duplicado, valores comparables a los reportados en bibliografía ($3 \mu\text{M}$).

Se repite la titulación, pero midiendo anisotropía de fluorescencia en lugar de intensidad. La anisotropía de fluorescencia es independiente de la concentración (ver capítulo 3.1.3), por lo que las K_D obtenidas utilizando esta propiedad de fluorescencia sirven como referencia para ver cuan exacto es el método de intensidad, puesto que la anisotropía no se ve afectada por los fenómenos de agregación.

La titulación se realiza utilizando el mismo protocolo secuencial previo y se toman espectros variando los polarizadores en el camino de emisión y excitación. Luego, se calcula un valor de anisotropía para cada punto de la titulación. A partir de estos valores se obtiene la isoterma mostrada en la figura 4.7. Los datos no ajustan con el modelo de dos sitios, pero si al modelo de un sitio, obteniéndose una $K_D = 3,3 \mu\text{M}$. Comparando este valor respecto al obtenido utilizando intensidad de fluorescencia ($3,66 \mu\text{M}$ en promedio) se puede concluir que el ensayo de fluorescencia es robusto, incluso con los problemas de variabilidad entre medidas, y la agregación del fluoróforo en solución acuosa.

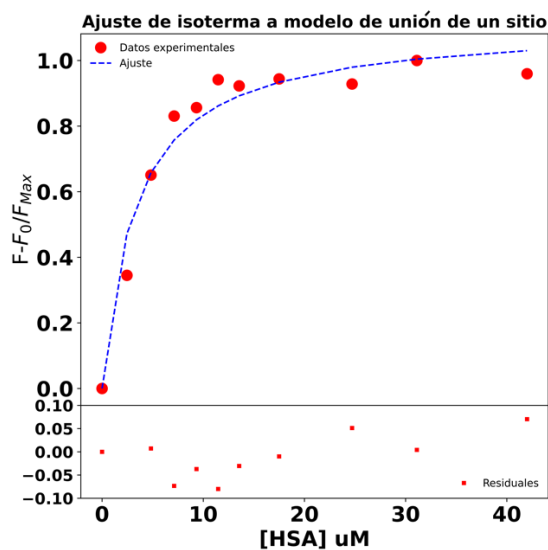


Figura 4.7 Isoterma de titulación obtenida por anisotropía de fluorescencia para el sistema **I-BDP-HSA**. Los valores obtenidos fueron $K_D = 3,39 \pm 0,7$ y $R^2 = 0,962$.

Ensayo de desplazamiento

Confirmada la unión del fluoróforo a la proteína, se realiza un ensayo de desplazamiento que consta en añadir a una solución que contiene HSA y **I-BDP** un ligando específico de cada sitio (warfarina e ibuprofeno).

En primer lugar, se realiza una determinación cualitativa de medida única para estudiar si hay cambios o no en la intensidad de fluorescencia (Figura 4.8.a). Se observa que en presencia de warfarina la intensidad decrece un 40 %, mientras que, con ibuprofeno, el cambio es poco significativo respecto a la variabilidad experimental (<10%). De esta manera se determina que el **I-BDP** es desplazado por la warfarina, y en consecuencia su intensidad de fluorescencia decrece. Este es un resultado prometedor para confirmar la hipótesis de la dinámica de los cambios de intensidad de fluorescencia, en relación con si el fluoróforo está unido a la proteína, o ha sido desplazado.

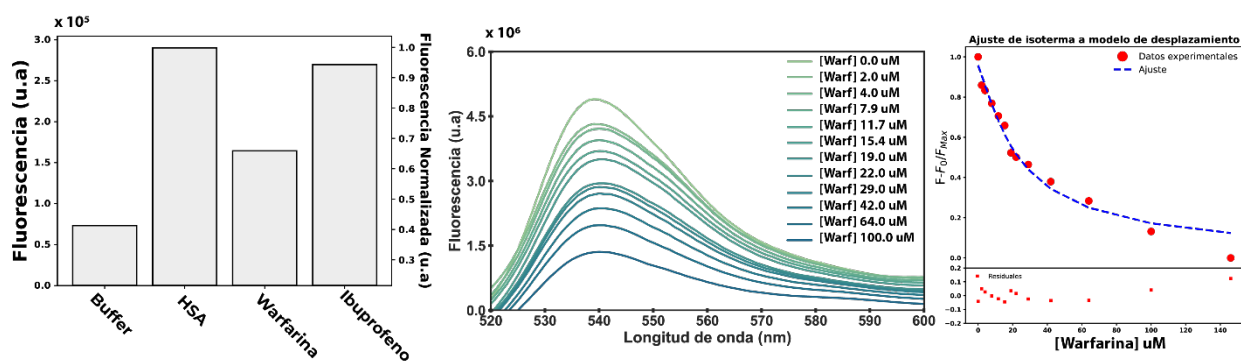


Figura 4.8 Sistema I-BDP-HSA. a) Ensayo cualitativo de desplazamiento, b) Espectros de emisión para el ensayo de desplazamiento con warfarina, c) Isotherma de titulación. Valores obtenidos: $K_D = 6,1 \mu\text{M}$ $R^2 = 0,97$.

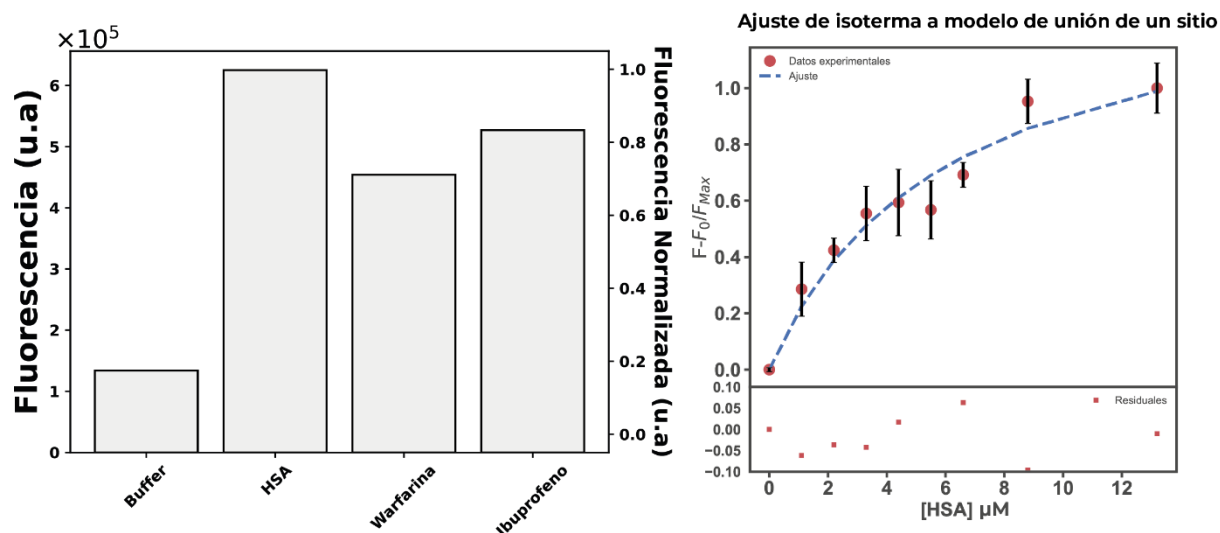
Se realiza una titulación de desplazamiento que consiste en titular una solución con contiene $10 \mu\text{M}$ de HSA y $0,15 \mu\text{M}$ del **I-BDP**, mientras que la solución titulante se encuentra compuesta por la misma concentración de HSA y fluoróforo, y además contiene warfarina $3,24 \text{ mM}$. Se incuba durante 5 minutos entre cada medida y el porcentaje final de DMSO es 5%. Los espectros de fluorescencia (Figura 4.8.b) muestran un marcado decrecimiento en la emisión que tiende a estabilizarse a medida que aumenta la concentración de la warfarina. Al realizar el ajuste con el modelo analítico de desplazamiento (Sección 4.1.4.3), se observa una $K_D = 6,15 \mu\text{M}$ para la warfarina. Los valores reportados en bibliografía para este compuesto oscilan entre 5 y $6 \mu\text{M}$,¹⁷⁻¹⁹ por lo que la metodología adoptada arroja valores precisos de K_D considerando las limitaciones del método.

4.2.1.2. Determinaciones con BDP-Morfolina

El segundo fluoróforo a estudiar es **BDP-Morfolina**. La figura 4.9 muestra la respuesta de fluorescencia de esta sonda en buffer, HSA, y adicionando los dos ligandos competitivos correspondientes a cada sitio de la proteína (warfarina e ibuprofeno). Las medidas se realizaron en buffer Tris (50 mM , $\text{pH} = 7,2$), y una concentración final de $20 \mu\text{M}$ de HSA. La concentración de la molécula fluorescente es $0,1 \mu\text{M}$ en todos los casos. La respuesta de fluorescencia es similar a la que presenta **I-BDP**, por lo que se podría confirmar que el fragmento morfolina de la molécula, no modifica sustancialmente la capacidad de unión de la sonda.

Por otro lado, se realizó una titulación de fluorescencia con medidas independientes, por triplicado en el lector de placas. Esta metodología es

más rápida y reproducible, pero requiere una mayor cantidad de proteína, que es habitualmente el recurso más escaso. La K_D fue de $5,33 \mu\text{M}$ siendo del mismo orden que la obtenida para **I-BDP**. Este resultado destaca que la titulación secuencial es confiable puesto que se obtienen valores comparables con los obtenidos empleando una metodología más robusta, como lo es la titulación de medidas independiente en lector de placas, que permite medir con mayor rapidez un mayor número de réplicas.



4.2.1.3. Determinaciones con H-BDP

Existen reportes en donde se explora la unión de **H-BDP** y análogos similares con HSA, BSA (Sero Albumina bobina) y también con la proteína Streptavidina.²⁰⁻²² En todos los casos se reporta una emisión de fluorescencia que decrece y se sugiere que ocurre FRET entre el fluoróforo y los triptófanos de las proteínas. Por otro lado, se determina una estequiometría 1 a 1 y una K_D en el rango de $1-10 \mu\text{M}$ para la proteína BSA. Estas determinaciones se realizaron utilizando las ecuaciones de Stern-Volmer para el quenching de fluorescencia.²³ Por otro lado, el sitio de unión se sugirió mediante simulaciones de docking molecular, indicando afinidad por el sitio IIA (sitio de Warfarina) pero no de manera experimental.

Para extender la información sobre este sistema, se realizó una determinación cualitativa de **H-BDP** a una concentración de $0,5 \mu\text{M}$ en

buffer Tris (50 mM, pH = 7,2), midiendo su intensidad de fluorescencia al adicionar HSA (17 μ M) y ligandos específicos de los sitios de la proteína (warfarina e ibuprofeno), similar a la determinación realizada para **I-BDP**. La intensidad de fluorescencia decreció en un 65 % al adicionar la proteína (Figura 4.10.a), en línea con los reportes previos. Tanto warfarina como ibuprofeno indujeron un aumento en la emisión de fluorescencia (240 % y 50 % respectivamente).

Para confirmar la estequiometría de unión, se realizó una titulación de fluorescencia secuencial de **H-BDP** (0,5 μ M) con HSA (77 μ M) en buffer Tris (50 mM, pH 7,2), incubando durante 10 minutos tras cada adición (Figura 4.10.b). La isoterma se ajusta con el modelo 2 de unión a un sitio, obteniéndose una $K_D = 1,31 \mu$ M, mientras que el ajuste con el modelo de dos sitios no es efectivo ya que los intervalos de confianza tienden a infinito.

Las determinaciones cualitativas muestran aumento en la intensidad de fluorescencia al adicionar warfarina e ibuprofeno. Sin embargo, el aumento es 5 veces mayor para el primer ligando respecto al segundo. Estos cambios pueden explicarse mediante dos fenómenos distintos. Por un lado, a partir de confirmar que la estequiometria es 1:1, se puede llegar a la conclusión de que el fluoróforo se une al sitio de warfarina (IIA). Esto se ve reflejado en el aumento en la intensidad de fluorescencia cuando se adiciona el ligando específico, warfarina. Por otro lado, si bien la presencia de ibuprofeno también induce un aumento en la emisión, existen reportes en los que se determina que este fármaco provoca cambios conformacionales en la proteína.²⁴ Considerando que se reporta una transferencia de energía entre la proteína y el fluoróforo (FRET) y que esta transferencia es dependiente de la distancia entre el aceptor y el dador²⁵ se puede concluir que los aumentos en la intensidad de fluorescencia inducidos por ibuprofeno se encuentran asociados a una disminución de FRET por el cambio conformacional y no por desplazamiento de fluoróforo.

Estos resultados confirman que la unión del fluoróforo es específica al sitio de warfarina y que los cambios conformacionales inducidos por el ibuprofeno en el sitio IIA afectan la eficiencia de quenching por FRET, resultando en un aumento de la intensidad de fluorescencia. Los resultados obtenidos refuerzan la validación de la metodología empleada puesto que reproducen los comportamientos previamente reportados en literatura, y se obtuvo información adicional.

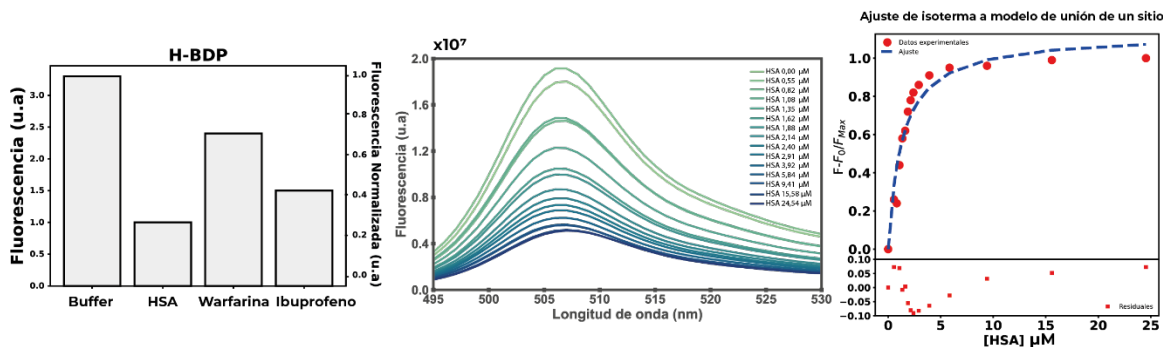


Figura 4.10. Sistema H-BDP-HSA a) *Ensayo cualitativo de desplazamiento* b) *Espectros de emisión para la titulación de fluorescencia de unión,* c) *Isoterma de titulación* ($K_D = 1,31 \pm 0,22 \mu\text{M}$; $R^2 = 0,93$).

4.2.2. Sistema Anhidrasa Carbónica humana II

Con el sistema hCAII se comienza a aplicar la metodología desarrollada en las secciones anteriores para HSA, pero utilizando las sondas diseñadas específicamente para esta proteína.

4.2.2.1. Determinaciones con sonda BDP-Amida

La sonda **BDP-Amida** se toma como modelo para la proteína hCAII y se realizan una serie de determinaciones cualitativas de manera similar a como se realizaron con **I-BDP** en HSA. Primero, se realizan tres espectros de fluorescencia independientes de **BDP-Amida** variando el entorno: buffer HEPES (50 mM, pH = 7,2), DMSO y finalmente en una solución 0,17 μM de la proteína hCAII. La concentración de la sonda es 0,1 μM en todos los casos. En buffer, la respuesta de fluorescencia es un 91% más baja que en DMSO (Figura 4.11). Por otro lado, en presencia de la proteína, la intensidad de fluorescencia aumenta en 3,7 veces respecto a la intensidad en buffer HEPES. Esta respuesta es similar a la observada para el sistema **I-BDP-HSA** en la sección 4.2.1.1.

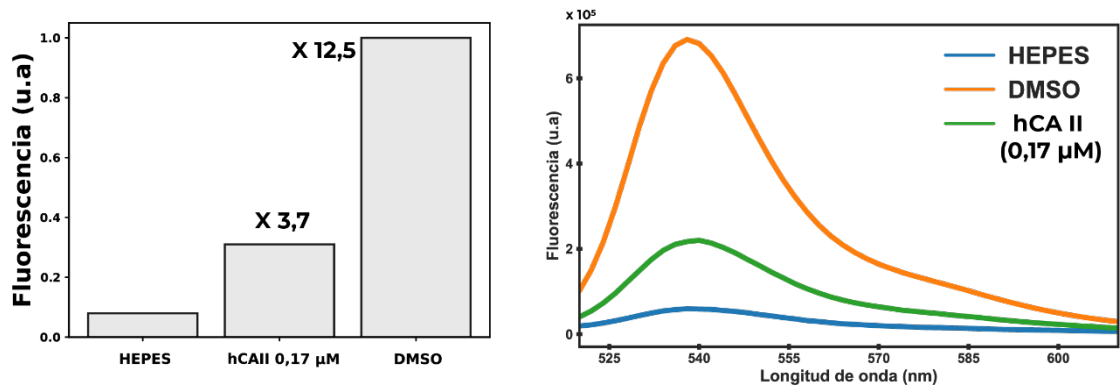


Figura 4.11 Espectros de emisión de fluorescencia de **BDP-amida** (0,1 μM) en HEPES, DMSO y hCAII 0,17 μM. El grafico de barras muestra la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión (540 nm)

Se realiza un segundo experimento que consiste en determinar la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de máxima emisión (540 nm) en función del tiempo. Estas medidas se realizan de forma independiente para soluciones 0,1 μM de **BDP-Amida** y distintos porcentajes de DMSO (1, 5, 10 y 100%) en buffer HEPES 50 mM. Por otro lado, para la solución 1% de DMSO, luego de 35 minutos se adiciona hCAII (Figura 4.12, izquierda). En los resultados de este experimento se observa que la intensidad de fluorescencia varía considerablemente (al menos 200%) con el aumento de la concentración de DMSO. Este comportamiento se asocia a que la sonda para este sistema presenta una limitada solubilidad en solución acuosa, incluso a concentraciones tan bajas como 0,1 μM. Esta baja solubilidad se le atribuye a la presencia del grupo sulfonamida.

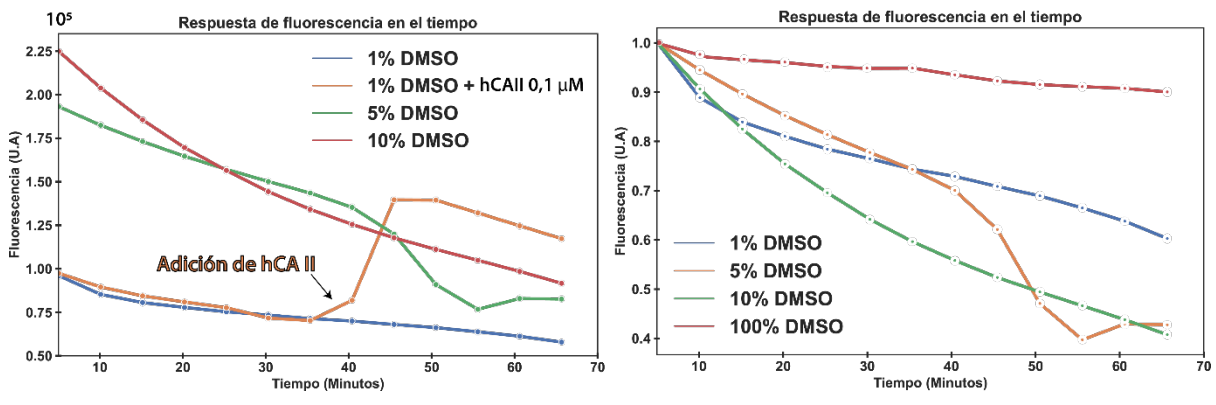


Figura 4.12. Intensidad de emisión de **BDP-Amida** a $\lambda_{em} = 540$ nm versus tiempo en soluciones acuosas a distintas concentraciones de DMSO. Valores absolutos de emisión (Izquierda) y normalizadas (Derecha).

Por otro lado, se observa que a partir de un 5% de DMSO, el aumento de solubilidad es discreto, puesto que la diferencia en la señal entre 5 y 10 % de DMSO representa un 16% de aumento. Es importante destacar que las proteínas no suelen soportar porcentajes de DMSO mayores al 10%.²⁶ En la intensidad de fluorescencia normalizada en DMSO (Figura 4.12, derecha), se visualiza que la emisión de fluorescencia no es estable en el tiempo y presenta una deriva a la baja. Esta deriva se observa también en DMSO puro, pero con menor velocidad, lo que denota nuevamente la insolubilidad de la sonda por la presencia de la sulfonamida. Finalmente, al adicionar la proteína a la solución con 1 % de DMSO, se alcanza un máximo a los diez minutos, que se mantiene estable por otros 7 más. Este dato es relevante puesto que da una pauta de que, a tiempos de incubación mayores a 20 minutos la señal puede atenuarse.

Para verificar que la especificidad de la sonda **BDP-Amida** hacia hCAII se encuentra asociada con la presencia del grupo sulfonamida, se realiza una determinación cualitativa de la fluorescencia del fluoróforo **I-BDP**. Esto también confirma que el fluoróforo no interactúa con la proteína. Para esto se realizan agregados de hCAII a una solución de **I-BDP** (0,15 μ M) en buffer HEPES 50 mM. Los espectros de emisión (Figura 4.13.a) muestran que la intensidad de fluorescencia no aumenta, si no que disminuye levemente debido a la formación de agregados. Se repite el experimento registrando la emisión a 540 nm en función del tiempo (Figura 4.13.b) y no se observan aumentos en la intensidad de fluorescencia. Las bajas escalonadas en la emisión de fluorescencia se deben al efecto de la dilución en cada agregado puesto que, para este caso, la solución titulante no contiene fluoróforo.

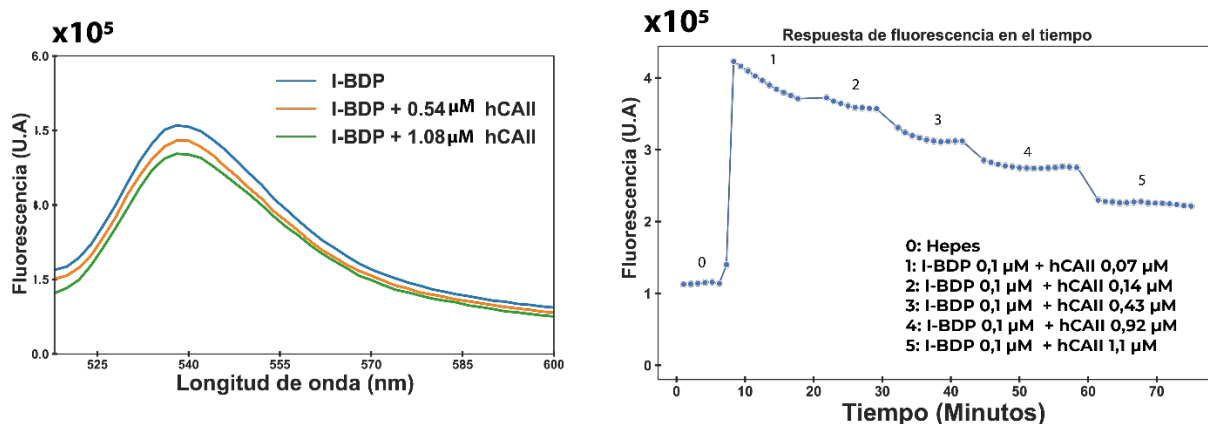


Figura 4.13 a) Espectros de emisión de **I-BDP** ($0,15 \mu\text{M}$) en presencia de **hCAII**. b) Intensidad de emisión de **I-BDP** a $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ versus tiempo con adiciones sucesivas de **hCAII**.

Con estos resultados se puede concluir que la sonda **BDP-Amida** interacciona con la proteína **hCAII** por la presencia del grupo benzosulfonamida puesto que el fluoróforo por sí solo (**I-BDP**) no muestra aumentos en la intensidad de fluorescencia en presencia de la macromolécula, como si lo hace con **HSA**.

Titulación de fluorescencia:

Las medidas cualitativas expuestas antes, muestran una correlación entre el aumento de la intensidad de fluorescencia de la sonda cuando se introduce el sistema proteico a la solución, pero no son prueba suficiente para confirmar una unión de la sonda al bolsillo hidrofóbico de la proteína. Para ello, se realizan titulaciones de fluorescencia tanto secuenciales como independientes.

Para tener un punto de partida, se lleva a cabo una primera titulación semi-cuantitativa para determinar el rango óptimo de concentraciones de proteína a adicionar necesaria para tener una isoterma que permita calcular, en titulaciones posteriores, una constante de disociación más precisa. La solución a titular consta de **BDP-Amida** $0,1 \mu\text{M}$ en **HEPES** (50 mM , $\text{pH} = 7,2$) con un 10% de **DMSO** para aumentar la solubilidad. Los tiempos de incubación son de diez minutos.

Los espectros de emisión muestran un aumento gradual de la emisión a concentraciones crecientes de la proteína **hCAII** (Figura 4.14). Al representar la isoterma de titulación se observa que se alcanza una meseta siendo este el comportamiento esperado en un ensayo de unión ligando-

proteína de este tipo. Es importante destacar que, en la zona de la meseta, se observa una mayor variabilidad en las medidas de fluorescencia. Este comportamiento se repite al realizar diversos ensayos, lo que se traduce en cierta irreproducibilidad de la determinación. Este comportamiento también se observó en las titulaciones de **I-BDP** con HSA (Sección 4.2.1.1), pero en menor medida. En lo que respecta al rango de concentraciones de hCAII, es conveniente explorar concentraciones más altas que las realizadas en este primer ensayo puesto que el muestreo no se extiende demasiado en la zona de la meseta, y se adicionaron sólo 2,5 equivalentes de proteína.

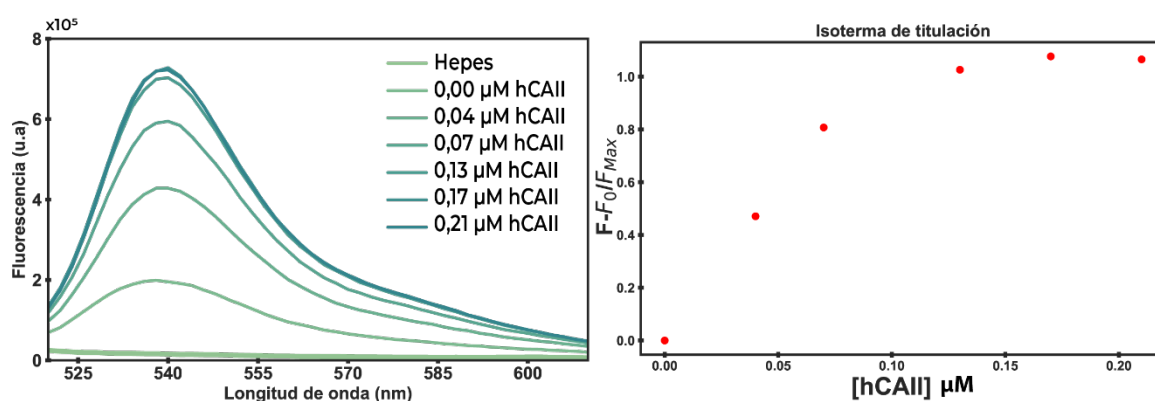


Figura 4.14. Sistema **BDP-Amida-hCAII** a) Espectros de fluorescencia y b) Isotherma para titulación de fluorescencia cualitativa

Medición en función del tiempo

Adicionalmente se realiza una titulación secuencial, registrando la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión (540 nm). Este ensayo tiene como objetivo registrar las fluctuaciones de la señal a lo largo del tiempo. Se realizan agregados de hCAII cada 10 minutos y luego se registra la intensidad de fluorescencia en intervalos de 7 minutos (Figura 4.15.a).

El comportamiento de la titulación en el tiempo muestra que la fluorescencia no se mantiene estable dentro de cada medida y la señal presenta una deriva a la baja. La isoterma de titulación (Figura 4.15.b) se determina tomando los últimos puntos de cada periodo de tiempo. El ajuste se realiza con el modelo 2 de unión a un sitio y se determina una K_D de 0,29 μM . Si se realiza el ajuste a un modelo de unión de dos sitios, se obtiene un buen ajuste, pero los intervalos de confianza en los valores de K_D tienden a infinito. Este experimento muestra cierto grado de imprecisión, que se evidencia a partir de 0,50 μM de hCAII, en donde se cambia la pipeta por una de mayor volumen y se observa un salto en la emisión de fluorescencia.

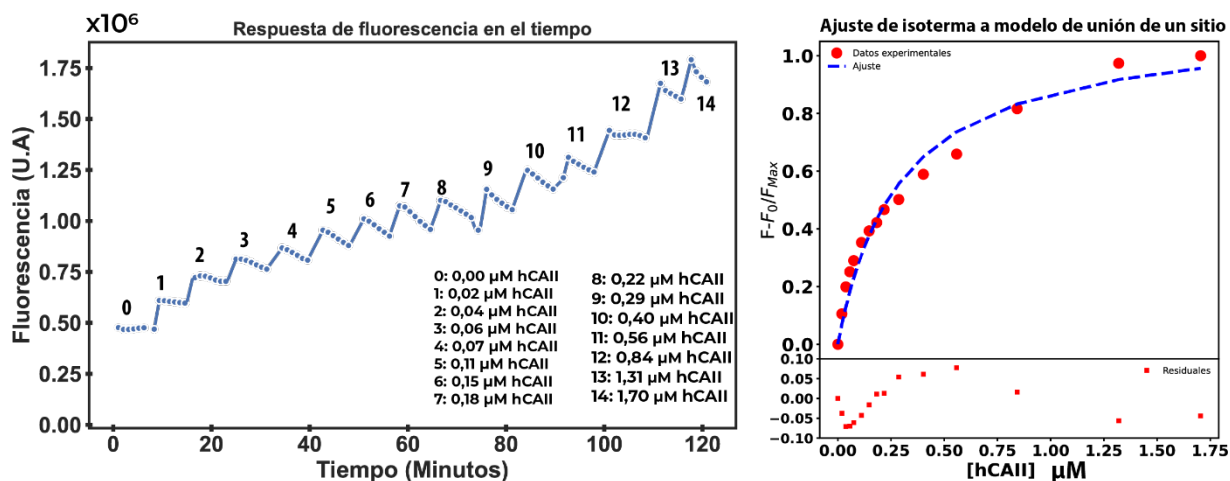


Figura 4.15. Titulación de **BDP-Amida** ($0,1 \mu\text{M}$) con hCAII a) Respuesta de fluorescencia ($\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$) en el tiempo de la titulación. b) Isotherma de titulación ($K_D = 0,29 \pm 0,04 \mu\text{M}$; $R^2 = 0,97$).

Titulación independiente

Posteriormente, se realiza una titulación de medidas independiente por triplicado, para obtener un valor de K_D más confiable. Esto es importante puesto que el modelo de unión de ligandos competitivos depende de dicha K_D . Al realizar el triplicado se obtienen algunos puntos “outsiders” y nuevamente se observa un alto grado de variabilidad entre las medidas. Esto se ve reflejado en las barras de error mostradas en la figura 4.16.a y en el inset de la misma figura donde se muestran todos los datos obtenidos. Si se comparan las barras de error con las de la figura 4.16.a correspondiente a la titulación de **BDP-Morfolina** con HSA, es evidente que el sistema **BDP-Amida/hCAII** muestra mayor grado de variabilidad, concluyendo que el efecto de la solubilidad es muy marcado para este tipo de sondas.

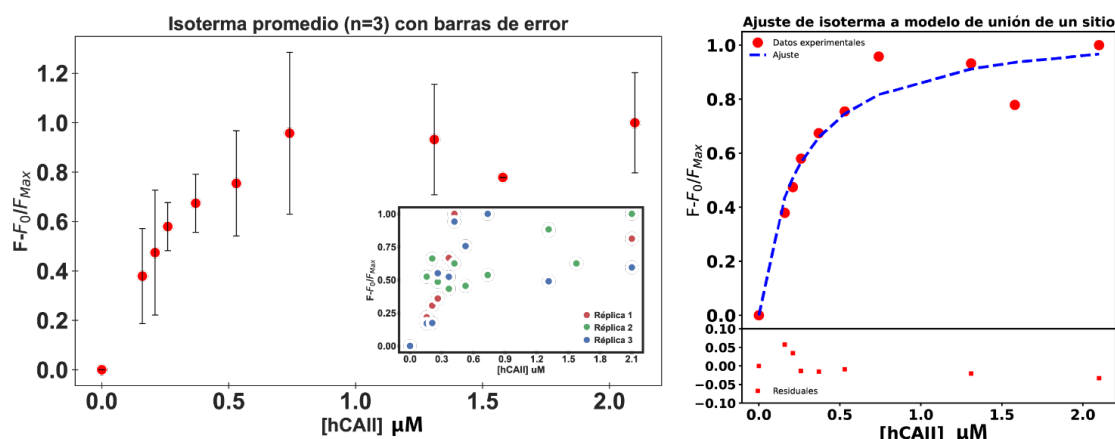


Figura 4.16. Titulación de medidas independientes de **BDP-Amida** ($0,1 \mu\text{M}$) con hCAII a) Respuesta de fluorescencia promedio ($\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$) para el triplicado. En el inset: datos crudos de cada replica. b) Isotherma de titulación ($K_D = 0,23 \pm 0,05 \mu\text{M}$; $R^2 = 0,94$).

De esta manera, se obtiene la isoterma de titulación y se lleva a cabo el ajuste utilizando el modelo de un sitio obteniéndose valores de $K_D = 0,23 \mu\text{M}$ (Figura 4.16.b). Por otro lado, el ajuste con el modelo de dos sitios arroja intervalos de confianza infinitos confirmando una estequiometria 1 a 1. Los valores reportados de K_D para este tipo de moléculas varían entre $0,05 \mu\text{M}$ para el ligando L-Amida hasta $0,47 \mu\text{M}$ cuando el ligando es acoplado con grupos más voluminosos como azúcares.²⁷

Considerando que las constantes obtenidas se encuentran dentro del rango reportado en bibliografía que se obtienen valores similares entre la titulación secuencial y el triplicado de medidas independientes ($0,29$ y $0,23 \mu\text{M}$ respectivamente), se puede concluir que el ensayo es robusto, incluso con el alto grado de imprecisión intrínseco que se da en estas sondas fluorescentes.

Ensayo de desplazamiento de BDP-Amida en hCAII

Se realiza una titulación de desplazamiento utilizando como ligando específico de hCAII a la molécula ethoxzolamide (**EZA**), un potente inhibidor de la proteína estudiada.

Esta determinación se lleva a cabo partiendo de una solución que contiene una concentración de **BDP-Amida** $0,1 \mu\text{M}$ en HEPES (50 mM , $\text{pH} = 7,2$) junto con hCAII $2 \mu\text{M}$ y 10% de DMSO. Por otro lado, la solución titulante contiene además de la sonda y proteína, EZA a una concentración de $14,25 \mu\text{M}$. La respuesta de fluorescencia al adicionar cantidades crecientes

de **EZA** (Figura 4.17) muestra un marcado decrecimiento hasta reducirse en un 90%. La isoterma de desplazamiento presenta un comportamiento similar al de las determinaciones realizados para el sistema **I-BDP-HSA** utilizando el ligando warfarina (sección 4.2.1.1) como competidor. El ajuste se realiza usando un modelo analítico de unión competitiva y la K_D de la sonda = $0,23 \mu\text{M}$ y se determina una constante de disociación para EZA de $K_D = 11 \text{ nM}$. Los valores reportados en bibliografía oscilan entre 3 y 8 nM. Si bien los valores de K_D representan hasta dos veces el valor promedio de lo reportado en bibliografía,^{28, 29} si se analiza el valor en términos energía libre (-10,8 kcal/mol para 11 nM; y -11,4 kcal/mol para 4 nM) la variación es del 5%, obteniéndose de esta manera una correcta determinación de dicho valor considerando el error experimental intrínseco para este sistema.

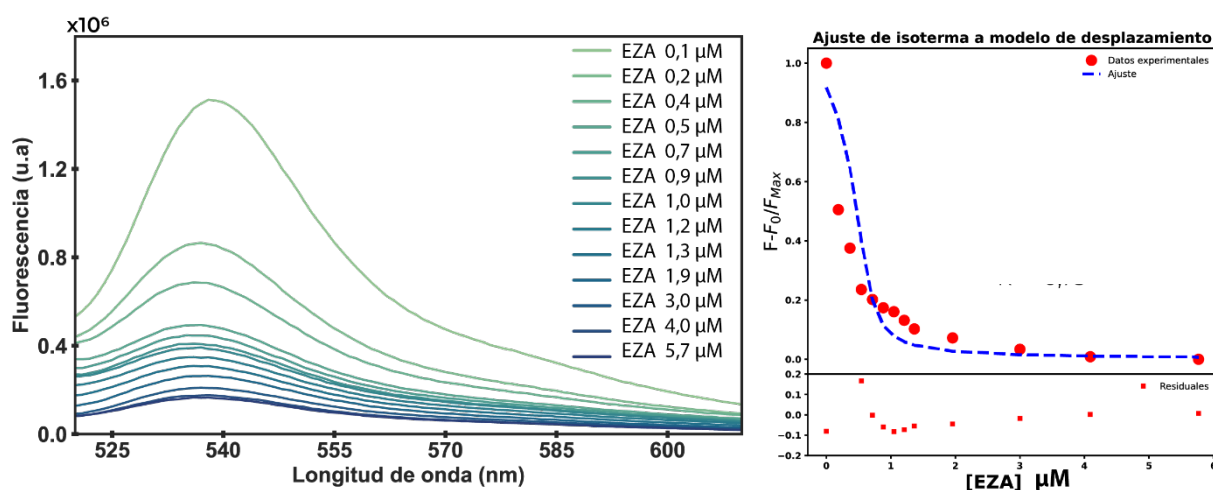


Figura 4.17. Titulación de desplazamiento **BDP-Amida** ($0,1 \mu\text{M}$) en hCAII con el ligando EZA. a) Espectros de fluorescencia. b) Isotherma de titulación ($K_D = 0,011 \mu\text{M}$ y $R^2 = 0,75$).

4.2.2.2. Determinaciones con sonda BDP-Éster

Inicialmente, se realiza una titulación secuencial con la sonda **BDP-Éster** para identificar si hay alguna variación en el comportamiento respecto a **BDP-Amida** por presentar distintos grupos funcionales en el linker (amida vs éster). La solución a titular está compuesta por **BDP-Éster** $0,15 \mu\text{M}$ en HEPES 50 mM y 5% de DMSO. Se incubaba durante 5 minutos entre medidas. El comportamiento de la emisión a lo largo de la titulación (Figura 4.18) es similar al observado para **BDP-amida**, es decir, aumentos progresivos en la intensidad. Por otro lado, se realizó un ajuste del modelo de unión de un sitio obteniéndose una $K_D = 0,37 \mu\text{M}$. Este valor se encuentra en el orden del

determinado para el análogo amida, concluyendo que, para este par de sondas derivadas de ácido, el cambio en el grupo funcional del linker no modifica sustancialmente la capacidad de las sondas para unirse a la hCAII.

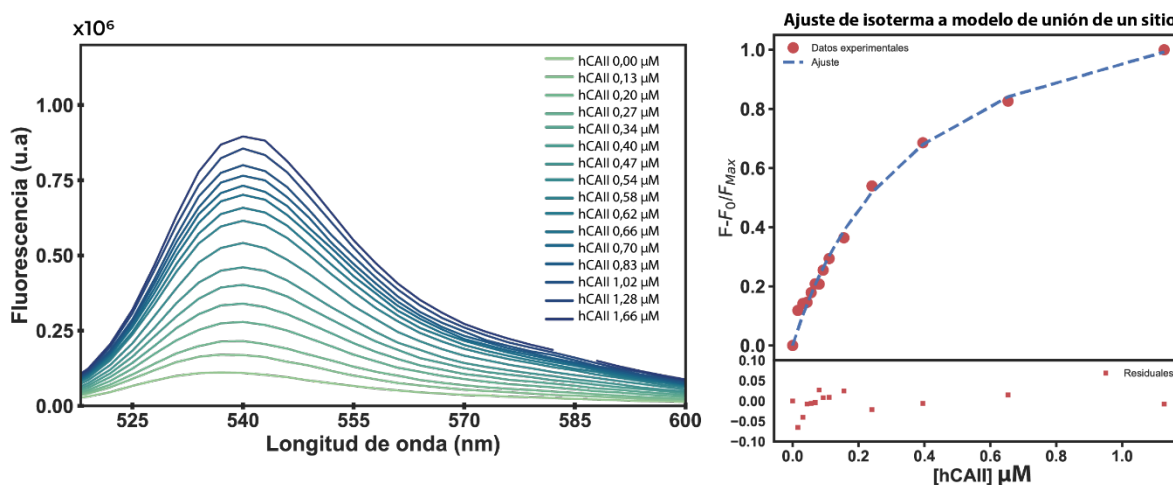


Figura 4.18. Titulación de **BDP-Éster** ($0,15 \mu\text{M}$) con hCAII a) Espectros de fluorescencia de la titulación. b) Isotherma de titulación ($K_D = 0,37 \pm 0,06 \mu\text{M}$; $R^2 = 0,99$).

4.2.2.3. Sonda BDP-Amina

La sonda **BDP-Amina** fue sintetizada con la intención de mostrar el impacto que tiene la longitud y rigidez del espaciador en la respuesta de fluorescencia puesto que el ligando dispone de dos átomos más, y mayor libertad conformacional por tratarse de un grupo amino alifático en lugar de amida. Mediante un ensayo cualitativo similar a los realizados para el resto de las sondas no se observaron cambios en la emisión de fluorescencia. Además, se determina la respuesta de este fluoróforo en presencia de la proteína HSA y nuevamente no se observan cambios en la intensidad de fluorescencia (Figura 4.19). En la sección 4.2.2.5 se hace un análisis estructural a partir de simulaciones computacionales en donde se propone una hipótesis para la falta de respuesta de la sonda en presencia de ambas proteínas.

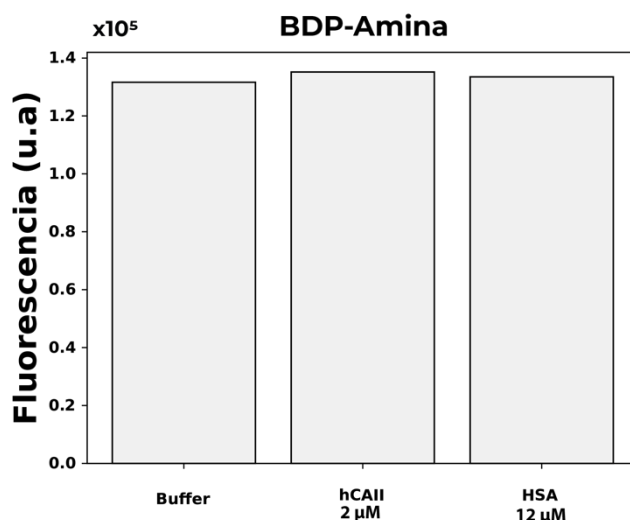


Figura 4.19. Intensidad de fluorescencia de **BDP-Amina** (0,1 μM) en HEPES (50 mM, pH = 7,2), hCAII (2 μM) y HSA (12 μM) a $\lambda_{em} = 540$ nm,

4.2.2.4. Determinaciones con sonda 3HC-Amina

Medidas de 3HC-Amino en distintos solventes

La sonda **3HC-Amina** es una molécula derivada de 3-hidroxicromona por lo que la sensibilidad al entorno se rige por un principio distinto al de los BODIPYs expuestos antes. Se realizan una serie de espectros de fluorescencia de la sonda en solventes de distinta polaridad tanto próticos como no próticos. Se espera un solvatocromismo similar al de su precursor **FE**. A cada espectro se le realiza una deconvolución espectral para determinar tanto la posición de las bandas N y T como sus áreas bajo la curva. Para el caso de los solventes próticos se realiza el mismo procedimiento, pero adicionando la banda A (ver capítulo 3.1.6).

En los espectros de fluorescencia (Figura 4.20.a y b) se puede observar como a medida que aumenta la polaridad del solvente, la banda N se desplaza a mayores longitudes de onda y aumenta respecto a T. Este efecto puede notarse de manera marcada en la figura 4.20.c en donde los espectros se encuentran ordenados por polaridad creciente. Por otro lado, para los alcoholes, la separación de bandas deja de ser evidente y se obtiene un espectro que parece presentar una sola banda. Este es el efecto combinado entre el solapamiento espectral de la banda N sobre la banda T que se da en solventes polares y la aparición de la banda aniónica A que se dan en solventes próticos como lo son los alcoholes.

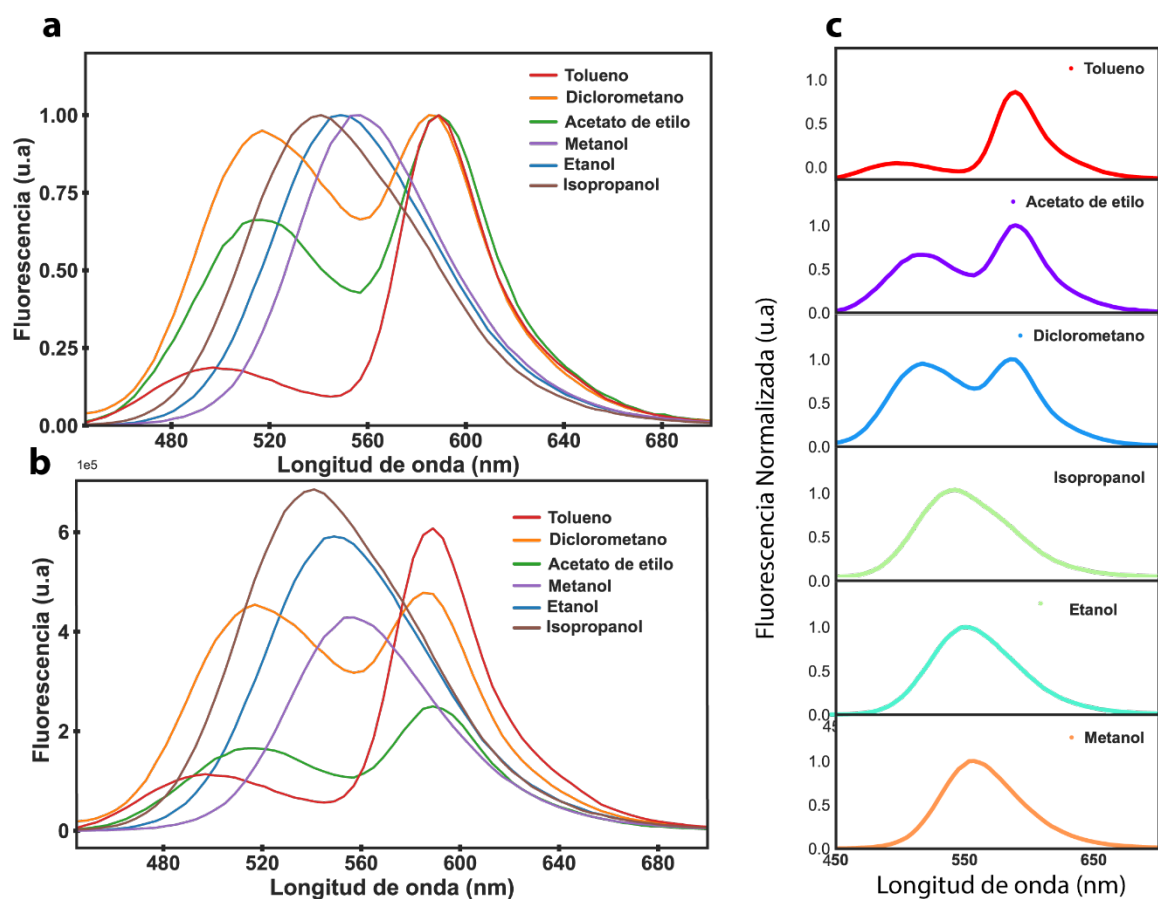


Figura 4.20 Espectros de emisión para la sonda 3HC-Amina en distintos solventes orgánicos próticos y no próticos. a) Con escala normalizada, b) con la escala absoluta. c) Visualización de los espectros apilados en orden creciente de polaridad (de arriba abajo).

Las deconvoluciones espectrales muestran dos correlaciones lineales entre el parámetro de polaridad $E_T(30)$ y la posición de la banda por un lado y con la relación de áreas N/T por el otro (Figura 4.21). La posición de la banda T no muestra correlación con la polaridad. Estos resultados se encuentran en sintonía con los reportados previamente para fluoróforos de esta familia.³⁰

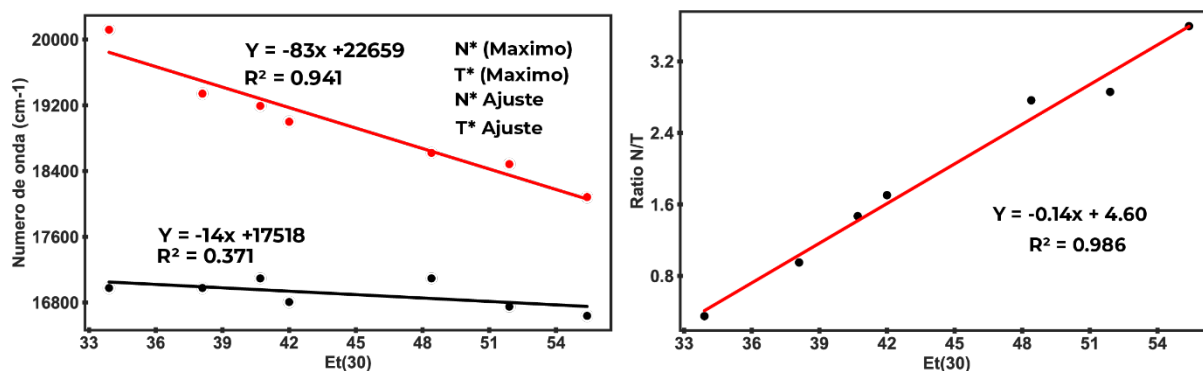


Figura 4.21. Valores obtenidos de las deconvoluciones espectrales de **3HC-amina** en función del parámetro de polaridad Et(30) para: a) Posición de la banda N y T; b) Relación de áreas N/T.

Determinación cualitativa

Se realizan una serie de medidas cualitativas para caracterizar la respuesta de fluorescencia de **3HC-Amina** en presencia de la proteína hCAII. Para esto se realiza una medida de la sonda a una concentración de 0,5 μM en buffer HEPES (50 mM, pH = 7,2) y se adiciona una solución 0,80 μM de la proteína hCAII (Figura 4.22,a). Al adicionar la proteína, la intensidad de fluorescencia aumenta en un 400% respecto de la emisión en buffer. De esta manera se confirma que hay un cambio de entorno en la sonda, atribuible a la presencia del sistema proteico introducido.

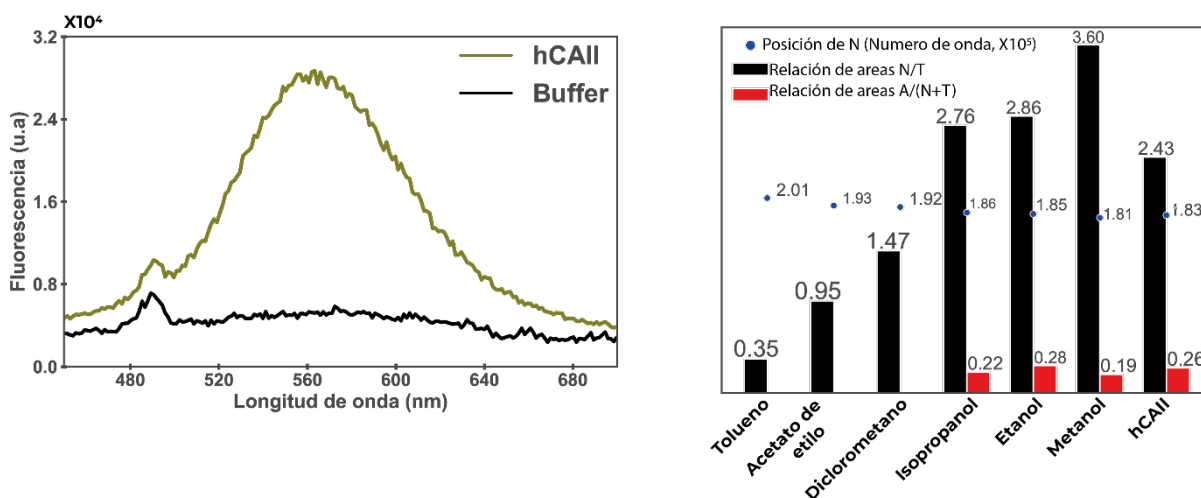


Figura 4.22 a) Espectros de emisión de **3HC-Amina** (0,5 μM μM) en buffer HEPES y al adicionar hCAII (0,80 μM). **b)** comparación de los valores obtenidos de: posición de N (punto azul), relación de áreas entre banda N y T (barras negras) y banda A/(N+T) (bandas rojas) para todos los solventes medidos junto con hCAII.

La forma del espectro de la sonda en presencia de hCA II es comparativamente similar a los espectros en los distintos alcoholes, lo que denota un entorno polar y en presencia de donadores de protón. Por otro lado, la deconvolución espectral muestra que la banda N, su relación de áreas N/T y A/N+T de la sonda en presencia de hCA II se posicionan en rangos de polaridad situados entre etanol e isopropanol (Figura 4.22.b).

Titulación secuencial

Adicionalmente, se realiza una titulación secuencial de la sonda a una concentración 0,5 μM y 5% de DMSO en buffer HEPES. Los espectros de la titulación muestran un aumento paulatino en la intensidad de fluorescencia (Figura 4.23). La isoterma de titulación obtenida se ajusta con el de unión de un sitio, obteniéndose una $K_D = 0,62 \mu\text{M}$. Este valor representa una menor afinidad, pero se encuentra del orden de los obtenidos para **BDP-Amida** y **BDP-Ester** (0,23 y 0,37 μM respectivamente) La isoterma no ajusta al modelo de dos sitios, confirmando la estequiometría de unión 1 a 1.

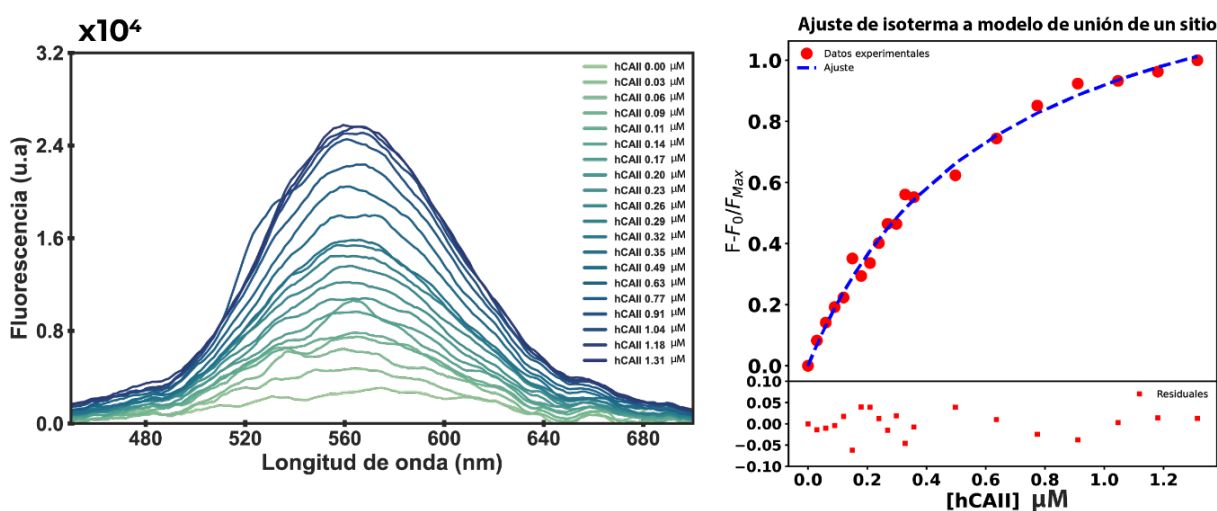


Figura 4.23. Titulación de **3HC-Amina** (0,5 μM) con hCAII a) Espectros de fluorescencia de la titulación. b) Isotherma de titulación ($K_D = 0,62 \pm 0,05 \mu\text{M}$ y $R^2 = 0,99$).

De esta manera se concluye que la sonda **3HC-Amino** es funcional para detectar la proteína hCAII, y para caracterizar el entorno de los bolsillos hidrofóbicos.

4.2.2.5. Análisis computacional de modos de unión

Modo de unión de BDP-Amida y 3HC-Amina a hCAII

Se realizó un docking molecular para las moléculas **BDP-Amida** y **3HC-Amina** (Figura 4.24 a y b, respectivamente) siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 3.2.1. En ambos casos, se observó que los fluoróforos quedan expuestos al solvente acuoso, independientemente de la longitud del espaciador entre el ligando y el fluoróforo. Esto concuerda con el espectro de emisión de **3HC-Amina** en hCAII (Figura 4.22), que muestra un entorno de polaridad intermedio entre etanol y propanol. Aunque el fluoróforo se encuentra expuesto al solvente acuoso, también interacciona con la superficie proteica, lo que le confiere cierta hidrofobicidad al entorno, similar a la observada en los alcoholes, donde existen puentes de hidrógeno en el grupo hidroxilo, pero también una región no polar.

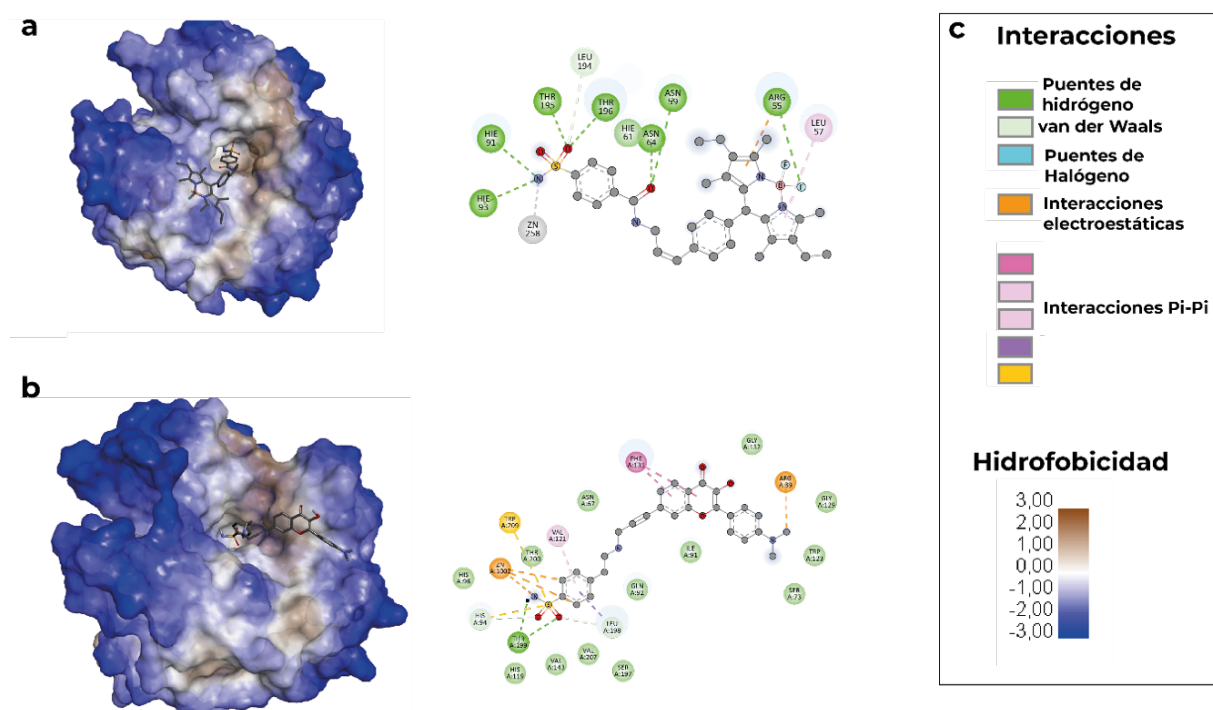


Figura 4.24. Pose de unión e interacciones específicas con residuos de hCAII para a) **BDP-Amida**, b) **3HC-Amina**. c). Códigos de colores

El análisis de las interacciones específicas entre las sondas y los residuos de la proteína revela que **BDP-Amida** presenta dos puentes de hidrógeno entre el carbonilo del grupo amida y los carboxilos de las asparaginas 64 y 59. Por el contrario, estas interacciones no se encuentran en **3HC-Amina**. Los valores experimentales de K_D respaldan esta observación, siendo $0,23 \mu\text{M}$ para **BDP-Amida** y $0,62 \mu\text{M}$ para **3HC-Amina**. Esto demuestra que hCAII muestra una mayor afinidad por **BDP-Amida**, lo

cual se debe a la presencia de interacciones fuertes, como lo son los puentes de hidrógeno.

Análisis conformacional de BDP-Amina

Se realizó una dinámica molecular (ver materiales y métodos) simulando 100 ns de la sonda **BDP-Amina** en el bolsillo hidrofóbico de la proteína hCAII para explorar si el complejo ligando-proteína es estable en el caso de existir unión. Esta sonda a pesar de contener el ligando específico para la proteína no muestra cambios experimentales en la emisión de fluorescencia en presencia de hCAII y tampoco lo hace para la proteína HSA (Figura 4.19).

Para determinar si el complejo es estable, se analiza la Desviación Media Cuadrática (RMSD por sus siglas en inglés, Root Mean Square Deviation) respecto a las estructuras de referencia iniciales. Por un lado, se considera el RMSD de la estructura proteica y por el otro el del ligando. Como muestra la figura 4.25.a el RMSD se estabiliza al principio de la simulación, y se mantiene en un rango estable tanto para la estructura de la proteína como para el ligando simulado. Esto indica que en el transcurso de los 100 ns de simulación el complejo ligando proteína muestra estabilidad. Por otro lado, las interacciones específicas entre el ligando y la proteína mostradas en la figura 4.25.b muestran incluso mayor cantidad de interacciones favorables respecto a la sonda **BDP-Amida** (Figura 4.25.a).

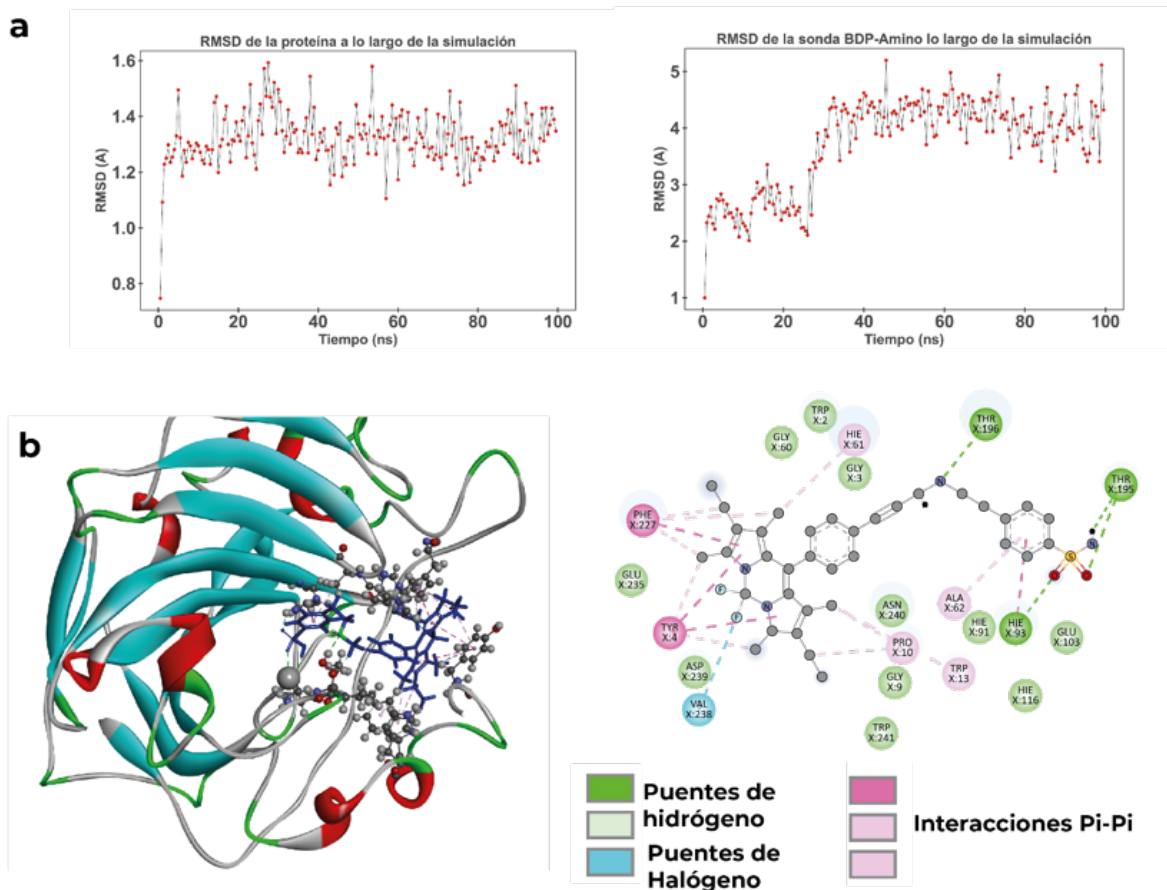


Figura 4.25. a) Desviación Media Cuadrática tomando como referencia el esqueleto de la proteína (izquierda) y la sonda (derecha). b) Modo de unión e interacciones específicas de **BDP-Amina** con hCAII.

Finalmente se realizó una exploración del espacio conformacional para **BDP-Amina** utilizando el método de cálculo CREST (Materiales y métodos). La motivación de esta simulación surge de la existencia de reportes en los que se encuentran BODIPYs meso sustituidos con espaciadores flexibles en los que se forman plegamientos intermolecularmente.^{31, 32}

La conformación más estable encontrada corresponde a la de una molécula plegada sobre si misma (Figura 4.26). Una hipótesis que se puede proponer es que la conformación encontrada es estable en solución acuosa, y que el costo energético necesario para acceder a una conformación óptima para la formación del complejo ligando-proteína es elevado. Esta hipótesis es apoyada por la evidencia que no se produce la unión tanto en hCAII en donde la afinidad se da por el extremo sulfonamida, ni en HSA que se da por el extremo BODIPY.

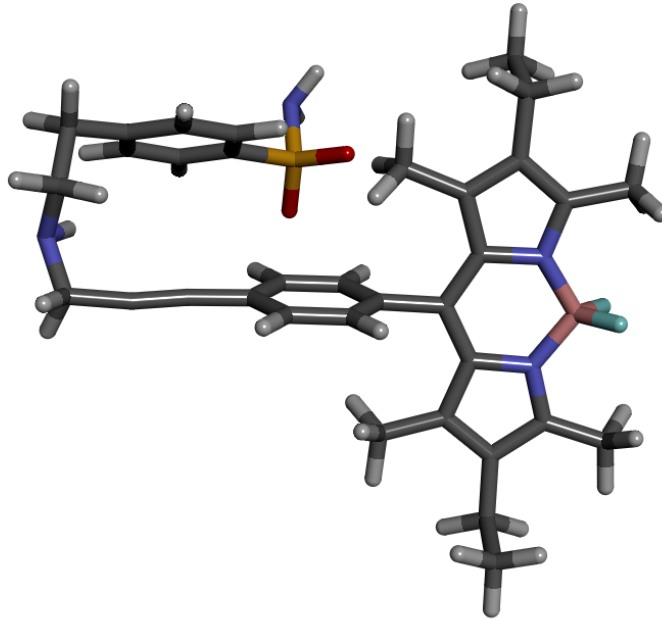


Figura 4.26. Conformación más estable para la sonda BDP-Amino encontrada con el software CREST.

4.2.3. Sistema Proteína de unión a ácidos grasos 2

4.2.3.1. Determinaciones con BDP-Ac

En primer lugar, se realiza una determinación de unión simple tomando dos medidas independientes de **BDP-Ac** en buffer Tris (50 mM, pH = 7,4, 150 mM KCl), y en una solución 9 μ M de FABP2 (Figura 4.27.a). La concentración de la sonda es 0,1 μ M en todos los casos. Al contrario de lo esperado para este tipo de sonda se observa un decrecimiento del 78 % en la intensidad de fluorescencia al adicionar la proteína. Por otro lado, el valor de la señal de fluorescencia obtenido con la sonda en buffer es mayor a las obtenidas para sondas que tienen fluoróforos similares como **I-BDP** o **BDP-Amida**.

Se realizan una serie de determinaciones de la sonda **BDP-Ac** en buffer a diferentes pH. Como muestra la figura 4.27.b, la emisión máxima se observa alrededor de pH = 7,5, siendo este el pH utilizado habitualmente en proteínas. Este resultado se condice con el hecho el grupo acilo de la sonda se encuentra desprotonado puesto que los pKa de los ácidos carboxílicos alifáticos rondan en las 4 unidades. La presencia de un grupo carboxilato aumenta solubilidad de la sonda explicando así la mayor intensidad de fluorescencia en buffer.

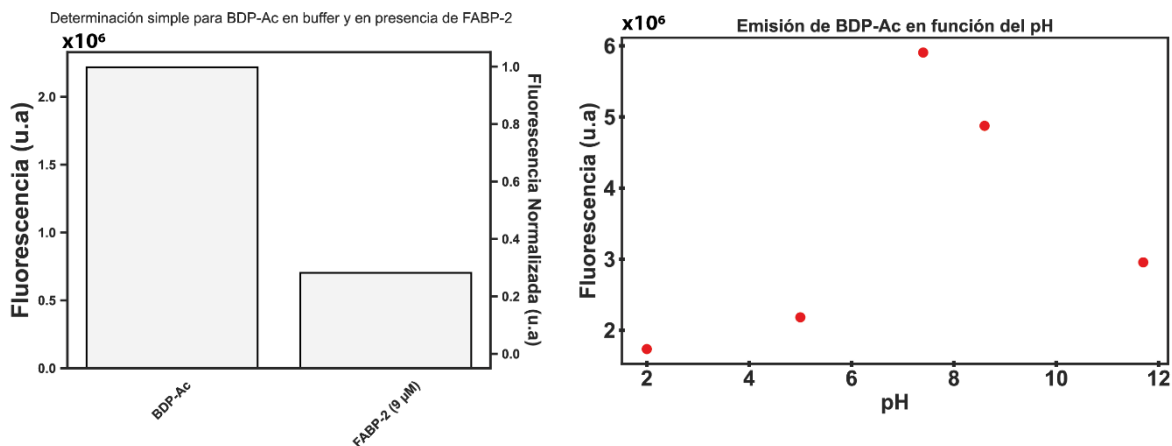


Figura 4.27. a) Determinación simple de **BDP-Ac** (0,1 μM) en Tris (50 mM, pH = 7,4, 150 mM KCl) y en una solución de FABP-2 (9 μM). b) Emisión de fluorescencia de **BDP-Ac** en función del pH a $\lambda_{em} = 540$ nm

Se lleva a cabo una titulación secuencial de **BDP-Ac** 0,1 μM en Tris (50 mM, pH = 7,4, 150 mM KCl) con una solución de la proteína FABP2 (9 μM). Los tiempos de incubación fueron de diez minutos. La intensidad de fluorescencia decrece a cantidades crecientes de la proteína, hasta alcanzar una meseta (Figura 4.28). Este comportamiento es similar al mostrado por **H-BDP** en HSA (sección 4.2.1.3), con la diferencia que el comportamiento no es esperado para esta sonda. La isoterma de titulación se ajusta con el modelo de unión a un sitio, obteniendo una $K_D = 2,36$ μM. Al intentar ajustar con el modelo de dos sitios, los intervalos de confianza son infinitos, indicando una estequiometría de 1:1.

Los valores bibliográficos de K_D para ácidos carboxílicos en este sistema corresponden a ácidos grasos de más de 12 carbonos, mostrando valores submicromolares.³³ Por otro lado, existen reportes de fluoróforos acoplados a ácidos alifáticos de cadena corta que no muestran afinidad por la proteína (Figura 4.29.a).³⁴ De esta manera se puede concluir que si bien el ácido carboxílico utilizado no aporta la afinidad que aportan sus análogos de cadena larga, la sonda en si muestra una afinidad promedio por la proteína. Esta conclusión es apoyada por los valores de constantes de disociación de otros fluoróforos que se unen a FABP2 como ANS (7,4 μM) y ligandos con ácidos carboxílicos con estructuras rígidas como ácido fenofibrico (3,7 μM)³⁵,³⁶ (Figura 4.29b y c)

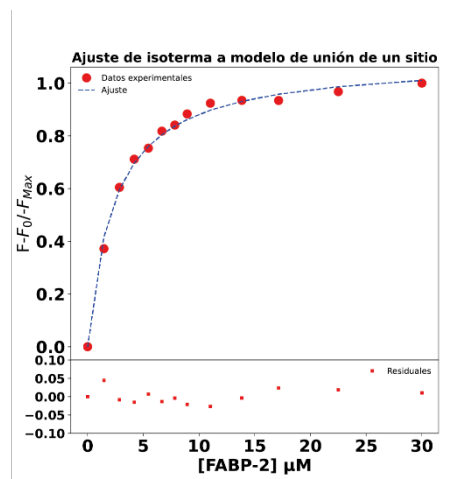
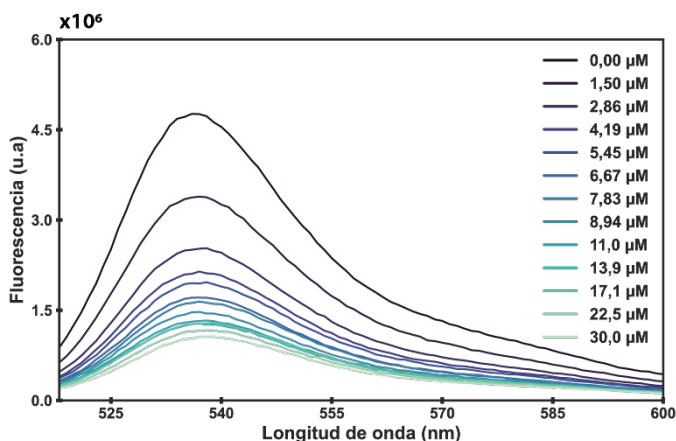


Figura 4.28 Titulación de **BDP-Ac** ($0,1 \mu\text{M}$) con **FABP-2** a) Espectros de emisión. b) Isotherma de titulación ($K_D = 2,36 \pm 0,35 \mu\text{M}$; $R^2 = 0,98$).

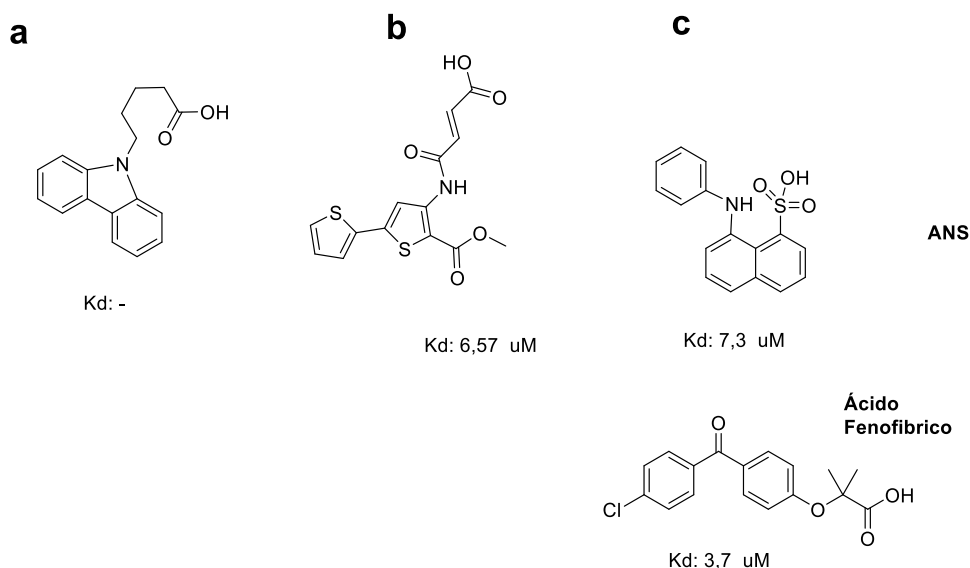


Figura 4.29. Estructuras de ligandos reportados en literatura para **FABP2**.

Finalmente, para encontrar una explicación estructural al quenching de la fluorescencia de **BDP-Ac** en presencia de **FABP2**, se realiza un docking molecular según la metodología mostrada en la sección 3.2.1. La figura 4.30 muestra que el sitio de unión de la proteína tiene forma similar a un barril en el cual la sonda puede ingresar completamente, a diferencia de lo observado en **hCAII** donde el fluoróforo quedaba expuesto a la esfera de solvatación de la proteína. Por otro lado, al analizar las interacciones específicas, queda en evidencia que el grupo carboxilato hace puente de hidrogeno con la Arginina 106 y que el fragmento **BODIPY** experimenta

múltiples interacciones pi-pi con los residuos del sitio de unión. Si bien no hay triptófanos en esta proteína, hay dos tirosinas (70 y 117) que interaccionan con el BODIPY. El efecto de estos residuos es similar al de los triptófanos siendo los principales quenchers en proteínas.³⁷ Se puede concluir que al formarse el complejo ligando-proteína se produce el quenching de la sonda por lo que la intensidad decrece hasta la saturación de los sitios de unión.

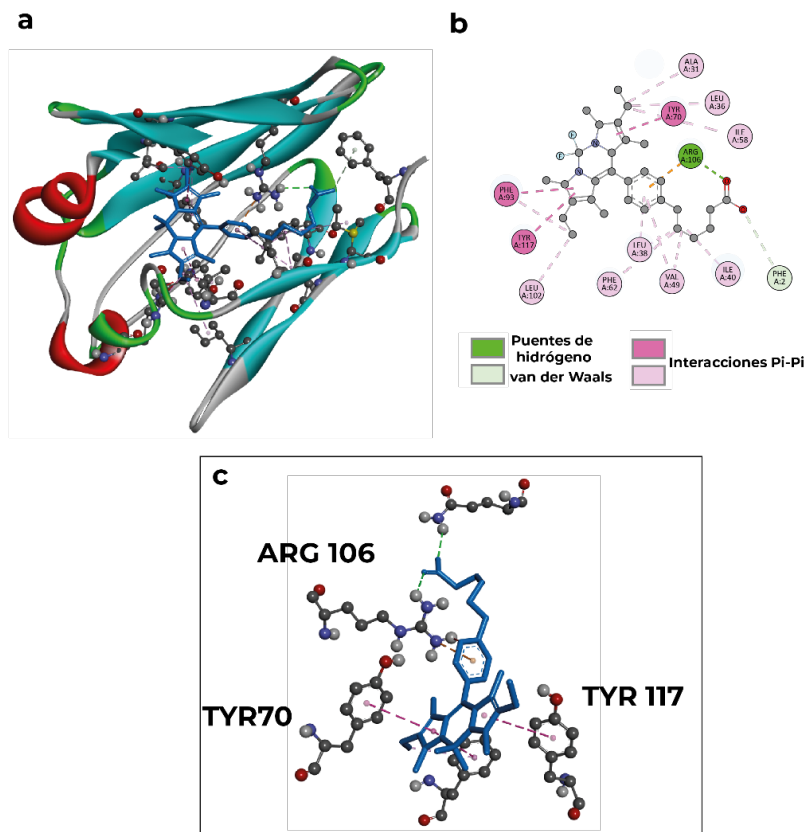


Figura 4.30. a y c) Pose de **BDP-Ac** (azul) en el sitio de unión de la proteína FABP2. b) Interacciones específicas de la sonda con los residuos de la proteína.

4.3. Conclusiones

La metodología propuesta fue optimizada y validada utilizando un sistema proteico que une moléculas pequeñas de manera no específica (HSA). Los resultados obtenidos se compararon con la información bibliográfica disponible, demostrando la precisión y robustez del enfoque implementado.

Se exploraron diversas las técnicas de fluorescencia para I-BDP/HSA (intensidad, anisotropía y tiempos de vida estacionarios de fluorescencia), permitiendo una evaluación integral de las propiedades intrínsecas de fluorescencia sin depender de la concentración. Las determinaciones de tiempo de vida mostraron que el aumento de la intensidad de fluorescencia en BODIPYs está más relacionado con un aumento en la solubilidad que con cambios de volumen libre en el entorno del rotor. Se realizó una titulación con detección de anisotropía de fluorescencia utilizando el enfoque secuencial. Los valores obtenidos fueron consistentes con los obtenidos por intensidad, demostrando nuevamente la robustez del método, incluso ante la agregación de los fluoróforos.

Se determinó con una precisión del 1,2% el $\Delta G_{\text{unión}}$ de la warfarina por HSA, validando así la metodología para identificar inhibidores competitivos con K_D del orden de las sondas utilizadas.

En el caso del sistema **H-BDP/HSA**, se amplió la información disponible sobre el sitio de unión del fluoróforo. Se validó la estequiometría de unión a un único sitio, determinando corresponde al dominio IIA (sitio 1), y se confirmó indirectamente la existencia de FRET entre la proteína y el fluoróforo.

Una vez validada la metodología con HSA, se evaluaron las determinaciones de unión y desplazamiento utilizando sondas específicas para la proteína hCAII. Se obtuvieron constantes de disociación para las sondas **BDP-Amida**, **BDP-Éster** y **3HC-Amina** a partir de los dos tipos de determinaciones propuestas (secuencial e independiente), obteniendo resultados congruentes con la bibliografía. Posteriormente, utilizando **BDP-Amida**, se realizó un ensayo de desplazamiento con un inhibidor competitivo de K_D conocido y del orden de los sub-micromolar. Este ensayo permitió estimar con una precisión de 4,15 % de error el $\Delta G_{\text{unión}}$, validando así la metodología para identificar inhibidores competitivos con K_D menores al de la sonda utilizada.

Se realizaron deconvoluciones espectrales de la sonda **3HC-Amina** en distintos solventes orgánicos próticos y apróticos, además de hCAII lo que permitió caracterizar el entorno del sitio de unión. La conclusión es que el entorno es prótico pero presenta algo de hidrofobicidad. Estos resultados se contrastaron con estudios de docking molecular, mostrando que la región 3HC de la molécula está expuesta tanto al solvente como a zonas hidrofóbicas de la superficie proteica.

La sonda **BDP-Amina** no mostró respuesta de fluorescencia ni en hCAII ni en HSA. Las dinámicas moleculares mostraron estabilidad en el complejo ligando-proteína en los 100 ns simulados. Sin embargo, un estudio conformacional reveló que la conformación más estable es aquella en la que la molécula se encuentra plegada sobre sí misma, sugiriendo que el costo energético para romper las interacciones intermoleculares es mayor que el $\Delta G_{\text{unión}}$. Esto se respalda por la falta de unión con HSA donde la región molecular responsable del binding es diferente (BODIPY).

En el caso del sistema **BDP-Ac/FABP2**, se observó un comportamiento contrario al esperado, con un decrecimiento en la intensidad de fluorescencia. La constante de disociación, mayor a las reportadas para ácidos carboxílicos de cadena larga, sugiere que la sonda presenta afinidad por toda su estructura y no solo por el grupo ácido. Esto se correlación con los valores de K_D reportados para ligandos con ácidos y estructuras rígidas acopladas. El estudio del modo de unión de la sonda en el sitio de la proteína concluyó que el decrecimiento en la intensidad de fluorescencia se debe a que la sonda ingresa completamente a la proteína e interacciona con residuos de tirosinas (interacción p-p), que suelen producir quenching de fluoróforos en sistemas proteicos.

Tabla 4.2. Valores de K_D y $\Delta G^0_{\text{unión}}$ determinados comparados con referencia.

Molécula	K_D obtenida, μM ($\Delta G^0_{\text{unión}}$, Kcal/mol)	K_D referencia, μM ($\Delta G^0_{\text{unión}}$, Kcal/mol)	Error del $\Delta G^0_{\text{unión}}$ Kcal/mol(%)
I-BDP	4,09 (-5,96)	2,94 (-6,15) ¹¹	0,19 (3,1 %)
H-BDP	1,31 (-6,63)	1,97 (-6,40) ²⁰⁻²²	0,23 (3,6 %)
Warfarina	6,15 (-5,72)	5,5 (-5,79) ¹⁷⁻¹⁹	0,07 (1,2 %)
BDP-Amida/Éster	0,30 (-7,50)	0,1 (-8,15) ²⁷	0,65 (8,0 %)
3HC-Amina	0,6 (-7,05)	-	-
EZA	0,011 (-9,45)	0,0055 (-9,86) ^{28, 29}	0,41 (4,15 %)
BDP-Ac	2,9 (-6,16)	5,8 (-5,75) ^{35, 36}	0,41 (7.1 %)

Valores promediados respecto a los datos disponible en bibliografía.

Finalmente, al analizar todos los datos obtenidos de K_D en comparación con los datos bibliográficos y evaluar las energías libres (Tabla 4.2), se comprobó la precisión y robustez de la metodología adoptada. Independientemente del tipo de determinación (titulación secuencial única, titulación de medidas independientes con réplicas), la variación respecto a los datos bibliográficos no superó el 8%. Estos resultados indican que el desarrollo de un ensayo simple a partir de las sondas desarrolladas, con la metodología aplicada, es factible, obteniendo datos precisos de manera rápida y eficiente a pesar de la variabilidad experimental intrínseca. Además, los ligandos esperados en campañas de HTS suelen poseer K_D en el rango de micromolares hasta sub-micromolares. Considerando que los valores de las K_D obtenidas para las distintas sondas están en el rango de 1-5 μM y que la metodología permite identificar ligandos competitivos con K_D del mismo orden o inferiores, se puede concluir que el ensayo desarrollado es transferible a HTS.

4.4. Referencias

1. Turro NJ, Okubo T, Chung CJ. Analysis of static and dynamic host-guest associations of detergents with cyclodextrins via photoluminescence methods. *Journal of the American Chemical Society*. 1982;104(7):1789.
2. Tirapegui C, Jara F, Guerrero J, Rezende MC. Host-guest interactions in cyclodextrin inclusion complexes with solvatochromic dyes. *J Phys Org Chem*. 2006;19(11):786.
3. Fielding L. NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2007;51(4):219.
4. Blay V, Otero-Muras I, Annis DA. Solving the Competitive Binding Equilibria between Many Ligands: Application to High-Throughput Screening and Affinity Optimization. *Anal Chem*. 2020;92(18):12630.
5. Thordarson P. Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chem Soc Rev*. 2011;40(3):1305.
6. Klymchenko AS, Demchenko AP. Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer. *Phys Chem Chem Phys*. 2003;5(3):461.
7. Wilcox CS. Design, Synthesis, and Evaluation of an Efficacious Functional Group Dyad. *Methods and Limitations in the Use of NMR for Measuring Host- Guest Interactions*. *ChemInform*. 1992;23.
8. Hirose K. A Practical Guide for the Determination of Binding Constants. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*. 2001;39(3):193.
9. Er JC, Vendrell M, Tang MK, Zhai D, Chang Y-T. Fluorescent Dye Cocktail for Multiplex Drug-Site Mapping on Human Serum Albumin. *ACS Combinatorial Science*. 2013;15(9):452.
10. Golianová K, Havadej S, Verebová V, Uličný J, Holečková B, Staničová J. Interaction of Conazole Pesticides Epoxiconazole and Prothioconazole with Human and Bovine Serum Albumin Studied Using Spectroscopic Methods

and Molecular Modeling. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2021; 22(4).

11. Jameson LP, Smith NW, Annunziata O, Dzyuba SV. Interaction of BODIPY dyes with bovine serum albumin: a case study on the aggregation of a click-BODIPY dye. *Phys Chem Chem Phys*. 2016;18(21):14182.
12. Liu X, Chi W, Qiao Q, Kokate SV, Cabrera EP, Xu Z, et al. Molecular Mechanism of Viscosity Sensitivity in BODIPY Rotors and Application to Motion-Based Fluorescent Sensors. *ACS Sensors*. 2020;5(3):731.
13. Hawe A, Sutter M, Jiskoot W. Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. *Pharm Res*. 2008;25(7):1487.
14. Bisballe N, Laursen BW. What is Best Strategy for Water Soluble Fluorescence Dyes?—A Case Study Using Long Fluorescence Lifetime DAOTA Dyes. *Chemistry – A European Journal*. 2020;26(68):15969.
15. Singh P, Mittal LS, Kaur S, Kaur S, Bhargava G, Kumar S. Self-assembled small molecule based fluorescent detection of serum albumin proteins: Clinical detection and cell imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018;255:478.
16. Shen B, Jung KH, Ye S, Hoelzel CA, Wolstenholme CH, Huang H, et al. A dual-functional BODIPY-based molecular rotor probe reveals different viscosity of protein aggregates in live cells. *Aggregate*. 2023;4(3):e301.
17. Lázaro E, Lowe PJ, Briand X, Faller B. New Approach To Measure Protein Binding Based on a Parallel Artificial Membrane Assay and Human Serum Albumin. *J Med Chem*. 2008;51(7):2009.
18. Giannetti AM, Wong H, Dijkgraaf GJP, Dueber EC, Ortwine DF, Bravo BJ, et al. Identification, Characterization, and Implications of Species-Dependent Plasma Protein Binding for the Oral Hedgehog Pathway Inhibitor Vismodegib (GDC-0449). *J Med Chem*. 2011;54(8):2592.
19. Rullo M, Cipolloni M, Catto M, Colliva C, Miniero DV, Latronico T, et al. Probing Fluorinated Motifs onto Dual AChE-MAO B Inhibitors: Rational Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Early-ADME Studies. *J Med Chem*. 2022;65(5):3962.

20. Marmé N, Knemeyer J-P, Sauer M, Wolfrum J. Inter- and Intramolecular Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan. *Bioconjugate Chem.* 2003;14(6):1133.
21. Ksenofontov AA, Bocharov PS, Antina EV. Interaction of tetramethyl-substituted BODIPY dye with bovine serum albumin: Spectroscopic study and molecular docking. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* 2019;368:254.
22. Ksenofontov AA, Bocharov PS, Ksenofontova KV, Antina EV. Water-Soluble BODIPY-Based fluorescent probe for BSA and HSA detection. *J Mol Liq.* 2022;345:117031.
23. Moreno MJ, Loura LMS, Martins J, Salvador A, Velazquez-Campoy A. Analysis of the Equilibrium Distribution of Ligands in Heterogeneous Media—Approaches and Pitfalls. *International Journal of Molecular Sciences [Internet].* 2022; 23(17).
24. Ploch-Jankowska A, Pentak D. A Comprehensive Spectroscopic Analysis of the Ibuprofen Binding with Human Serum Albumin, Part I. *Pharmaceuticals [Internet].* 2020; 13(9).
25. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* NY: Springer New York; 2006.
26. Arakawa T, Kita Y, Timasheff SN. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. *Biophys Chem.* 2007;131(1):62.
27. Wilkinson BL, Bornaghi LF, Houston TA, Innocenti A, Supuran CT, Poulsen S-A. A Novel Class of Carbonic Anhydrase Inhibitors: Glycoconjugate Benzene Sulfonamides Prepared by “Click-Tailing”. *J Med Chem.* 2006;49(22):6539.
28. Winum J-Y, Temperini C, El Cheikh K, Innocenti A, Vullo D, Ciattini S, et al. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Clash with Ala65 as a Means for Designing Inhibitors with Low Affinity for the Ubiquitous Isozyme II, Exemplified by the Crystal Structure of the Topiramate Sulfamide Analogue. *J Med Chem.* 2006;49(24):7024.

29. Dudutienė V, Zubrienė A, Smirnov A, Gylytė J, Timm D, Manakova E, et al. 4-Substituted-2,3,5,6-tetrafluorobenzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrases I, II, VII, XII, and XIII. *Bioorg Med Chem*. 2013;21(7):2093.
30. Giordano L, Shvadchak VV, Arrupe N, Falomir Lockhart LJ, Sánchez VM, Jovin TM. Tuning of environment-sensitive 3-hydroxychromone fluorophores based on strong donor substituents in positions 2 or 7. *Dyes and Pigments*. 2023;218:111479.
31. Rybczynski P, Smolarkiewicz-Wyczachowski A, Piskorz J, Bocian S, Ziegler-Borowska M, Kędziera D, et al. Photochemical Properties and Stability of BODIPY Dyes. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2021; 22(13).
32. Thakare S, Stachelek P, Mula S, More AB, Chattopadhyay S, Ray AK, et al. Solvent-Driven Conformational Exchange for Amide-Linked Bichromophoric BODIPY Derivatives. *Chemistry – A European Journal*. 2016;22(40):14356.
33. Martin GG, McIntosh AL, Huang H, Gupta S, Atshaves BP, Landrock KK, et al. The Human Liver Fatty Acid Binding Protein T94A Variant Alters the Structure, Stability, and Interaction with Fibrates. *Biochemistry*. 2013;52(51):9347.
34. Lehmann F, Haile S, Axen E, Medina C, Uppenberg J, Svensson S, et al. Discovery of inhibitors of human adipocyte fatty acid-binding protein, a potential type 2 diabetes target. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2004;14(17):4445.
35. Hertzog AV, Hellberg K, Reynolds JM, Kruse AC, Juhlmann BE, Smith AJ, et al. Identification and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of Fatty Acid Binding Proteins. *J Med Chem*. 2009;52(19):6024.
36. Patil R, Laguerre A, Wielens J, Headey SJ, Williams ML, Hughes MLR, et al. Characterization of Two Distinct Modes of Drug Binding to Human Intestinal Fatty Acid Binding Protein. *ACS Chemical Biology*. 2014;9(11):2526.
37. Callis PR. Binding phenomena and fluorescence quenching. II: Photophysics of aromatic residues and dependence of fluorescence spectra on protein conformation. *J Mol Struct*. 2014;1077:22.

CAPÍTULO 5

ESTIMACIÓN DE MOMENTOS

DIPOLARES EN 3-

HIDROXICORMONAS

ASIMÉTRICAS

5.1. Introducción

En los fluoróforos solvatocrómicos, como las 3HCs (Capítulo 1.1.2), la dependencia del entorno se puede medir mediante la diferencia en el momento dipolar entre el estado excitado y el fundamental, $\Delta\mu$, donde un mayor valor indica mayor sensibilidad al entorno. Dentro de los métodos experimentales para calcular esta magnitud, existen métodos espectroscópicos como el modelo propuesto por Lippert-Mataga^{1, 2} (L-M, ecuación 5,1) en donde se calcula $\Delta\mu$, a través del corrimiento de Stokes en diferentes solventes:

$$\tilde{\nu}_{abs} - \tilde{\nu}_{fluor} = \frac{2(\mu_e - \mu_g)^2 \Delta f}{hc a^3} \quad [5.1]$$

En donde el primer término es el corrimiento de Stokes, Δf es la polarizabilidad y a el radio de Onsager.

Una de las problemáticas de esta metodología es determinar el radio de Onsager a utilizar. Este valor habitualmente es calculado usando dos enfoques: considerando el diámetro de la molécula de un extremo al otro, o se considera la distancia entre el dador y aceptor de carga. El segundo enfoque es considerado más acertado.³ La estimación de esta magnitud es trivial en moléculas esféricas o cilíndricas en las que la transferencia de carga ocurre entre un dador y un aceptor, localizados en los extremos opuestos de la molécula (como **FE** y **7AHC**, figura 5.1) pero, es problemático cuando la molécula es no lineal, asimétrica y se encuentra influenciada por otros grupos electrónicos.

En este capítulo se explora la influencia de distintos grupos electrónicamente acoplados a 3HCs sustituidas en las posiciones 2 y 7 (Figura 5.1). La síntesis de estas moléculas junto con su caracterización espectroscópica se detalla en un trabajo publicado.⁴ Estos compuestos se dividen en dos series: una en la que el grupo dialquilanilino se encuentra unido al carbono 7 de la 3-HC (serie **7AHC**) y otra en la que está unido al carbono 2 (serie **FE**). Se determinaron diversas propiedades moleculares básicas y se calcularon momentos dipolares teóricos utilizando métodos de simulación computacional cuántica (QM). Estos datos se contrastaron con valores experimentales obtenidos por métodos espectroscópicos para estudiar el efecto que tiene la elección del radio de Onsager sobre esta magnitud.

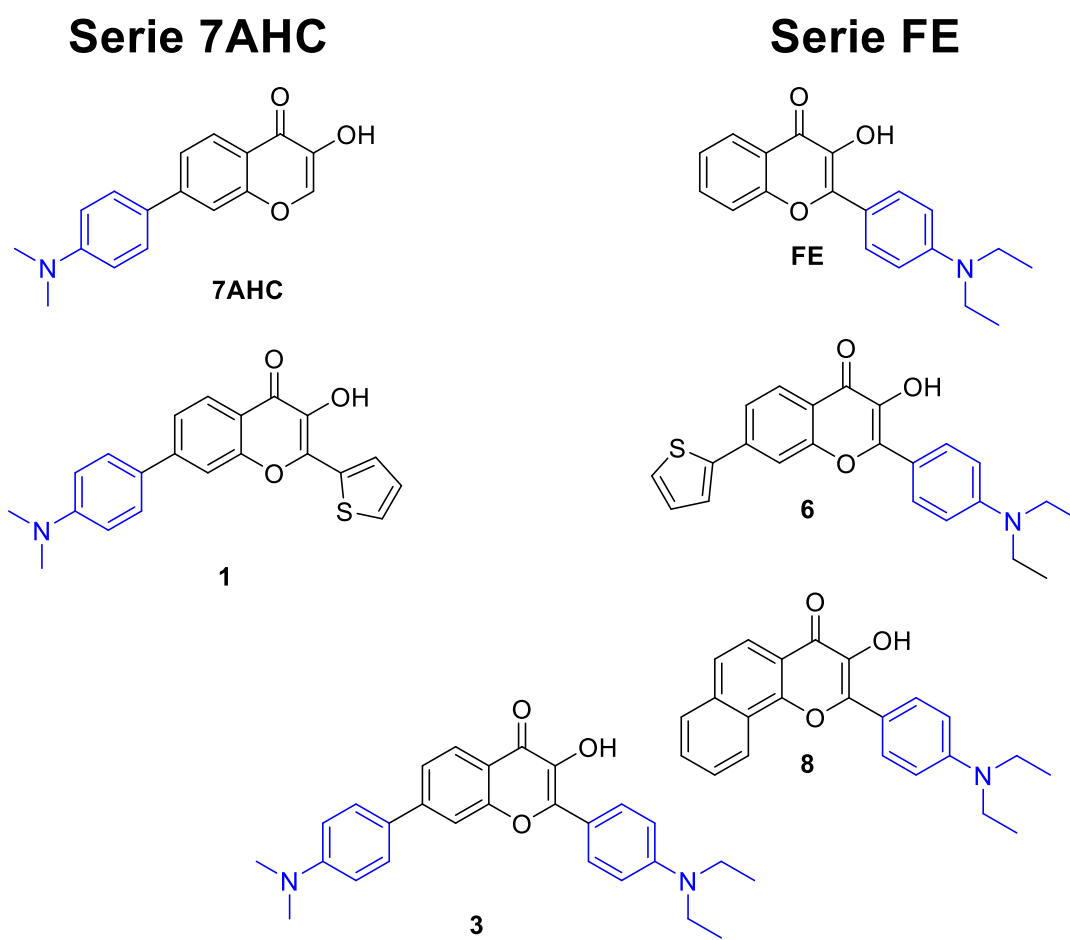


Figura 5.1. Estructuras de las moléculas estudiadas. En azul se muestra el grupo dialquilanilino.

5.2. Resultados estructurales teóricos

Los cálculos se realizaron utilizando el software Gaussian 09. La metodología adoptada se expone en el capítulo 3.2.3. Las deconvoluciones espectrales realizadas se muestran al final del capítulo.

5.2.1. Optimización de geometría y análisis estructural

Para obtener los momentos dipolares teóricos es necesario realizar una optimización de la estructura molecular. Los valores estructurales relevantes (distancias, ángulos y diedros, figura 5.2) de las optimizaciones geométricas son expuestas en la tabla 5.1.

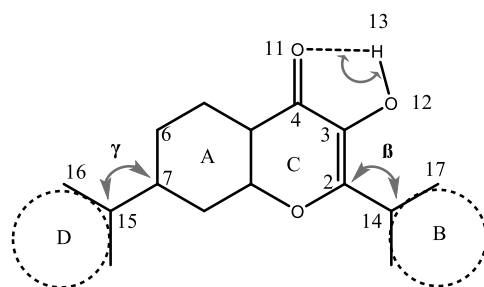


Figura 5.2 Muestra la numeración de átomos clave, el nombre de los fragmentos moleculares y ángulos diedros

Para todas las moléculas estudiadas los enlaces O(12)-H(13) (oxidrilo) y C(4)-O(11) (carbonilo) se alargan en el estado excitado (S_1) respecto al estado fundamental (S_0). El enlace O(11)-H(13) (puente de hidrógeno intramolecular) se acorta en S_1 . Estos cambios indican un fortalecimiento del puente de hidrógeno intramolecular en el estado excitado. Sin embargo, para las moléculas **7AHC** y **1**, el puente de hidrógeno se acorta menos y presenta una mayor longitud comparado con el resto de las moléculas. Para las moléculas con sustituyentes en la posición 2, el enlace C(2)-C(15) se acorta y los ángulos diedros β tienden a disminuir, llevando a una geometría más planar. Para las moléculas con sustituyentes en la posición 7, el enlace C(7)-C(14) también se acorta y los ángulos diedros γ tienden a cambiar, pero no a planarizarse, excepto en el caso de la molécula 6, donde el anillo tiofeno en posición 7 rota, generando planaridad en S_1 . El acortamiento de los enlaces C(2)-C(15) y C(7)-C(14) concuerda con la idea de una transferencia de carga en el estado excitado.

Tabla 5.1. Distancias de enlace L (Å), ángulos \angle (°) y diedros Ψ (°) para las estructuras en estado fundamental (S_0) y el primer estado excitado (S_1)

	FE			7AHC			1			3			6			8		
	$S_0(N)$	$S_1(N^*)$	Δ	$S_0(N)$	$S_1(N^*)$	Δ	$S_0(N)$	$S_1(N^*)$	Δ	$S_0(N)$	$S_1(N^*)$	Δ	$S_0(N)$	$S_1(N^*)$	Δ	$S_0(N)$	$S_1(N^*)$	Δ
L (C4-O11)	1,23	1,25	+0,02	1,23	1,26	0,03	1,23	1,26	0,03	1,23	1,25	0,02	1,23	1,24	0,01	1,23	1,25	0,01
L (O12-H13)	0,98	1,01	+0,03	0,97	0,98	0,01	0,98	0,98	0,00	0,98	1,01	0,03	0,98	1	0,02	0,98	1,00	0,02
L (O11-H13)	1,94	1,73	-0,21	2,05	1,94	-0,11	1,98	1,97	-0,01	1,94	1,73	-0,21	1,95	1,77	-0,18	1,94	1,74	-0,2
L (C2-C14)	1,45	1,44	-0,01	-	-	-	1,44	1,40	-0,03	1,45	1,43	-0,02	1,45	1,44	-0,01	1,45	1,44	-0,01
L (C7-C15)	-	-	-	1,49	1,47	-0,01	1,47	1,47	-0,00	1,47	1,45	-0,02	1,46	1,42	-0,04	-	-	-
\angle (O11-H13-O12)	121	128	7	118	123	5	120	123	3	121	128	7	121	127	6	121	128	7
Ψ β (C3-C2-C14-C17)	6,2	-0,1	-6,3	-	-	-	-0,2	-1,1	-0,9	9,4	3,4	-6,0	8,6	3,2	-5,4	12,5	4,3	-8,3
Ψ γ (C6-C7-C15-C16)	-	-	-	33,8	39,7	5,9	34,3	31,9	-2,4	34,4	20,7	-13,7	-27,3	0,4	-26,9	-	-	-

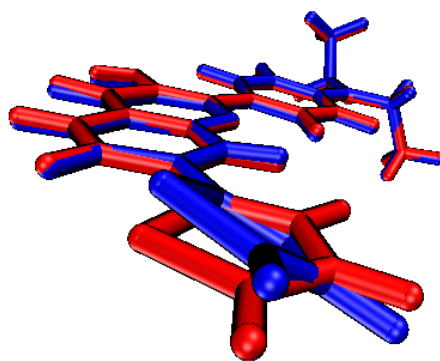


Figura 5.3. Estructuras minimizadas en estado fundamental (azul) y excitado (rojo) para la molécula **6**.

5.2.2. Análisis de interacciones no covalentes:

Para la descripción de interacciones no covalentes, se utilizan dos magnitudes denominadas Gradiente de Densidad Reducida (RDG, por sus siglas en inglés, reduced density gradient, ecuación 5.2) y una función denominada Ω (Ecuación 5.3) que integra la densidad electrónica $\rho(r)$ y la matriz Hessiana de esta (λ_2).⁵

$$\frac{1}{2(3\pi r^2)^{1/2}} \frac{|\nabla\rho(r)|}{\rho(r)^{4/3}} \quad [5.2]$$

$$\Omega = \text{Sign}(\lambda_2)\rho(r) \quad [5.3]$$

Los valores de RDG entre 0 y 0,5, describen interacciones débiles o no covalentes, como en el caso de un puente de hidrógeno. Por otro lado valores positivo de Ω representan un efecto repulsivo, mientras que un valor negativo representa un efecto atractivo. A partir de la obtención de la densidad electrónica se pueden calcular estas dos magnitudes y graficarlas una en función de la otra. La figura 5.4 muestra un diagrama genérico de este tipo en donde cada tipo de interacción es remarcada con un círculo de color.

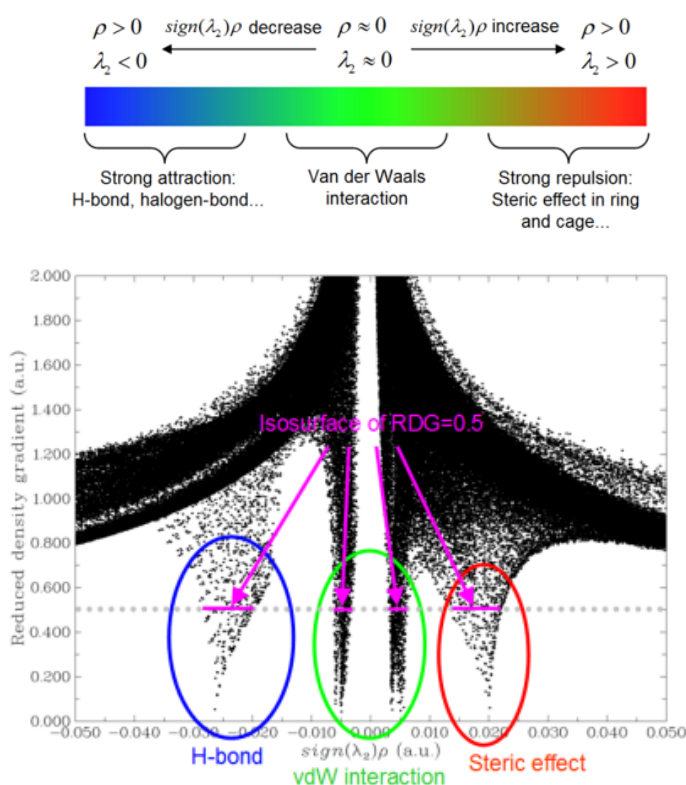


Figura 5.5. Arriba: Referencia en escala de colores del tipo de fuerza de interacción descrito por Ω . Abajo: se muestra un grafico de RDG en función de Ω utilizado para el análisis de interacciones no covalentes. Se indica que tipo de interacción representa cada “punta”.

La punta de la izquierda en la figura 5.4 (remarcada en azul) representa la fortaleza de los puentes de hidrógeno, de modo tal que para valores más negativos de Ω ($\text{Sign}(\lambda_2)$, eje x) el enlace de hidrógeno es más fuerte. Para todas las moléculas de la serie **FE**, Ω toma valores más negativos en $S_1(N^*)$ (Figura 5.5), lo que indica un puente de hidrógeno más fuerte en el estado excitado. Para **7AHC**, los valores se vuelven menos negativos, en concordancia con la distancia O(11)-H(13) mostrada en la tabla 5.1. Para **1**, no observamos un cambio en el valor de Ω .

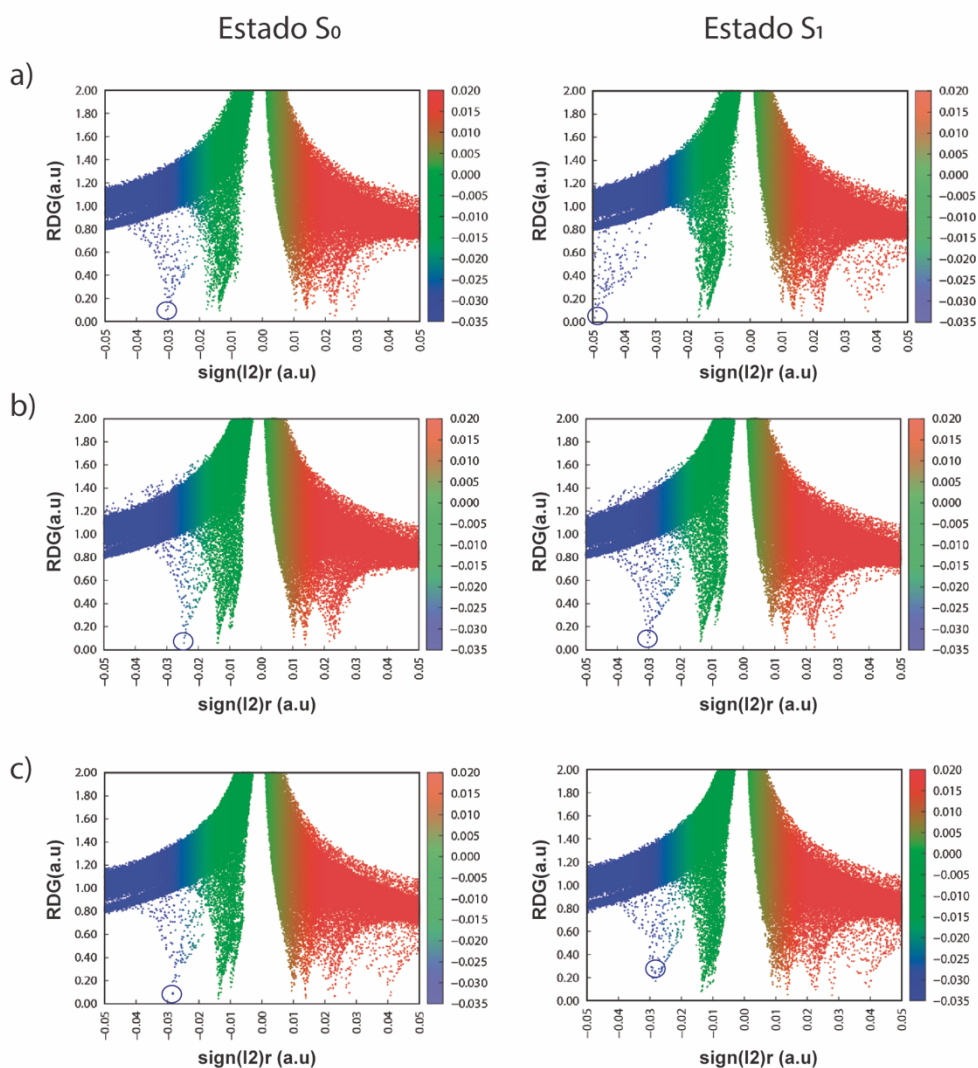


Figura 5.6. Gráfico de la función $\text{sign}(l_2)r$ versus RDG para a) **FE, 3, 6 y 8**, b) **7AHC** y c) **1** en estado fundamental y excitado. Los valores para la punta que representa al puente de hidrógeno son marcadas con un círculo azul.

5.2.3. Análisis de orbitales moleculares de frontera

Con el fin de tener una noción pictórica de la distribución de la densidad electrónica y del carácter de transferencia de carga de las transiciones, los orbitales moleculares de frontera (FMOs por sus siglas en inglés, frontier molecular orbitals) se muestran en la figura 5.6. En todos los casos, el orbital HOMO muestra carácter π , y el LUMO π^* lo que indica una transición π - π^* . Para **FE, 3, 6 y 8**, la densidad electrónica del HOMO se centra en el grupo dietilamino en la posición 2. Por otro lado, **7AHC y 1** muestran la densidad electrónica centrada en el grupo dietilamino unido a la posición 7

para el mismo orbital, La densidad electrónica en el orbital LUMO está centrada en el grupo carbonilo para todos los casos,

Este resultado muestra una transferencia electrónica desde el grupo dador más fuerte (dialquilamino) hacia el carbonilo. Por otro lado, si el grupo se encuentra como sustituyente en ambas posiciones, 2 y 7, la transferencia se da preferentemente por el grupo sustituyente en 2. Esto es evidente al analizar **1** y **6**: el orbital HOMO está centrado en el grupo dialquilamino independientemente de la posición, pero para **3**, que tiene los mismos grupos en las posiciones 2 y 7, el HOMO se encuentra en el grupo unido en la posición 2. Esto es un primer indicio de que la molécula **3** puede enmarcarse en la serie **FE**.

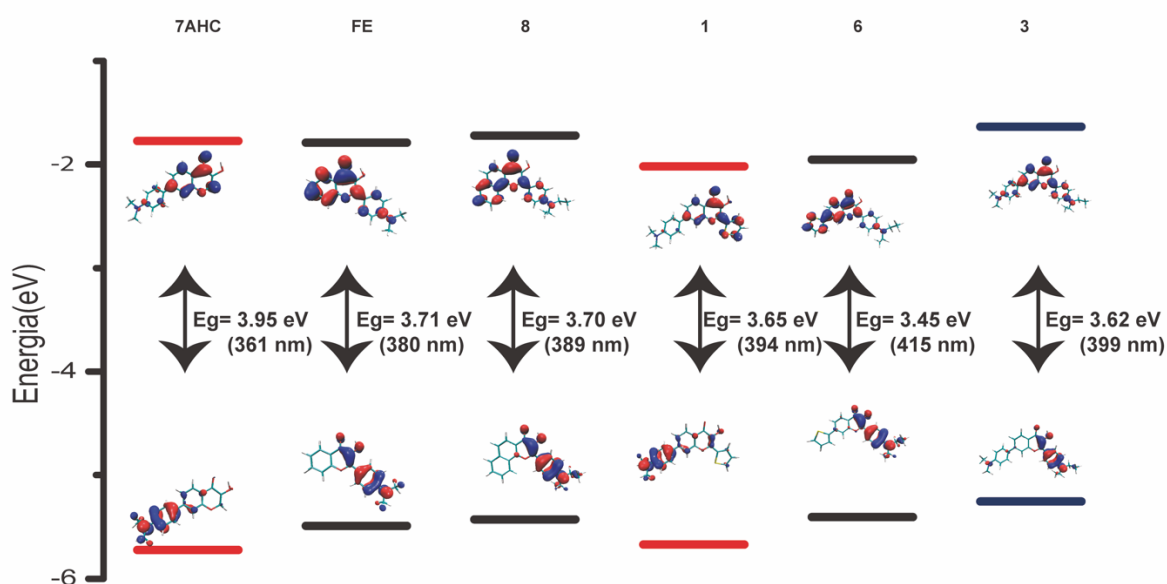


Figura 5.7 Orbitales moleculares de frontera para **7AHC**, **FE**, **1**, **3**, **6** y **8** ordenados por gap HOMO-LUMO.

5.2.4. Densidad de carga

Las distribuciones de densidad de carga se calcularon mediante la suma de las cargas de Mulliken para diferentes fragmentos moleculares, como se muestra en la tabla 5-2, y sus diferencias se representan en la figura 5.7. Los resultados son los siguientes:

Para **7AHC**, en el estado excitado S_1 el carbonilo se vuelve positivo y el oxidrilo negativo, haciéndose más ácido en lugar de más básico. Aunque las simulaciones muestran transferencia de carga y acortamiento del enlace del puente de hidrógeno, la repulsion electroestática entre el carbonilo que se vuelve positivo y el proto, explican la ausencia de ES IPT en **7AHC**.⁶

Para el resto de las moléculas estudiadas, el carbonilo se vuelve más negativo y, por lo tanto, más básico en S_1 . En **1**, ambos sustituyentes se vuelven positivos en el estado excitado, lo cual, junto con el análisis de FMOs, explica la emisión dual de esta molécula, diferenciándose de **7AHC**.⁴ Esto deja en evidencia la influencia que tiene el grupo tiofeno unido en la posición 2.

En la molécula **6**, el tiofeno en posición 2 se vuelve más negativo en S_1 . Esta observación junto con el análisis de FMOs y la tendencia a planarizarse, sugiere que la transferencia de carga se encuentra más deslocalizada en comparación con **FE**.

Esta es la primera observación destacable respecto a la problemática planteada, puesto que se evidencia el hecho de que cada par de sustituyentes deslocaliza más o menos la carga respecto a las moléculas que le dan origen (**FE** o **7AHC**). Este cambio en la deslocalización puede tener un efecto marcado en el radio de Onsager real que hay que tener en cuenta a la hora de calcular el momento dipolar.

Tabla 5-2: Distribución de densidad de carga para el estado fundamental y excitado de todas las moléculas estudiadas, Numeración de átomos y rotulo de anillos según la figura 5,2, Δ se refiere a la diferencia entre la densidad de carga en el estado excitado y en el estado fundamental.

Densidad de carga						
	FE	7AHC	1	3	6	8
	$S_0(N)S_1(N^*) \Delta$	$S_0(N)S_1(N^*) \Delta$	$S_0(N)S_1(N^*) \Delta$	$S_0(N)S_1(N^*) \Delta$	$S_0(N)S_1(N^*) \Delta$	$S_0(N)S_1(N^*) \Delta$
A + C	-0,18 -0,34 -0,16	-0,31 -0,52 -0,21	0,15 0,04 -0,12	-0,12 -0,19 -0,07	+0,31 +0,25 -0,28	0,14 0,06 -0,08
B	-0,72 -0,67 +0,05	- - -	-0,77 -0,45 +0,28	-0,70 -0,67 +0,03	-0,70 -0,65 +0,05	-0,69 -0,64 0,05
D		-0,63 -0,55 0,07	-0,63 -0,54 +0,09	-0,63 -0,63 0,01	-0,63 -0,75 -0,13	-0,51 -0,38 0,13
O12	-0,25 -0,22 +0,03	-0,25 -0,27 -0,02	-0,25 -0,25 -0,01	-0,26 -0,22 +0,04	-0,25 -0,22 +0,03	-0,25 -0,22 0,03
O11	-0,37 -0,39 -0,02	-0,35 -0,43 0,08	-0,36 -0,43 -0,07	-0,37 -0,4 -0,03	-0,37 -0,38 -0,01	-0,37 -0,39 -0,02
O1		-0,06 -0,09 -0,03	-0,06 -0,09 -0,02	-0,06 -0,09 -0,03	-0,06 -0,09 -0,03	-0,07 -0,10 -0,04
X(B)	-0,06 -0,09 -0,03		-0,03 0,01 +0,04	-0,03 +0,01 +0,03	-0,02 +0,01 +0,04	-0,03 0,02 0,04
X(D)	-0,03 0,00 0,03	-0,03 0,11 0,14	0,14 0,06 -0,08	-0,03 -0,02 +0,01	+0,13 +0,06 -0,07	

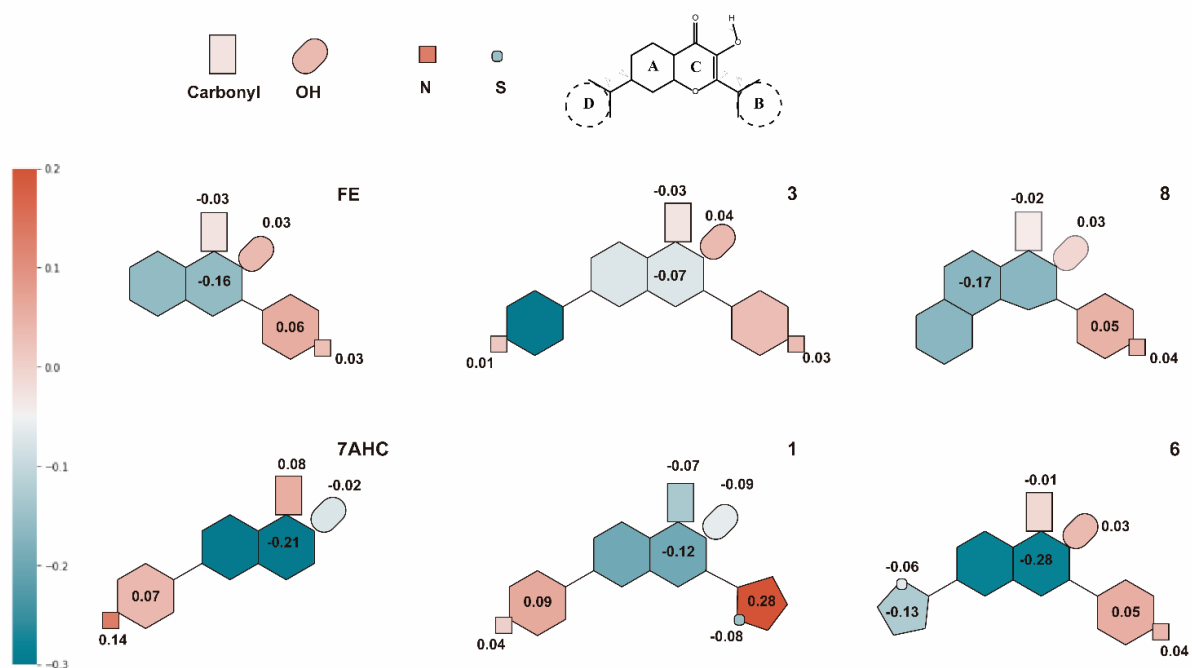


Figura 5.8. Diferencia de densidad de carga entre S_0 y S_1 para las moléculas estudiadas. Los valores y escala de colores representan la diferencia de densidad de carga para cada fragmento.

5.2.5. Momentos dipolares

Se calcularon los momentos dipolares para los estados S_0 y S_1 y se obtuvieron los $\Delta\mu$ teóricos (Tabla 5-3). Los vectores de los momentos dipolares para cada estado se representan en la figura 5.8. De manera general se observa que los momentos dipolares de las moléculas **1**, **6** y **8** varían en la misma dirección que sus análogos monosustituidos **7AHC** y **FE**. Notablemente la molécula **3** muestra el menor valor de $\Delta\mu$ (5,1 D). Los vectores de momento dipolar, junto con los FMOs, sugieren que es una molécula de la serie **FE**, con un momento dipolar atenuado debido a la influencia del grupo dador fuerte unido en la posición 7.

Tabla 5.3. Momentos dipolares calculados (μ) para los estados S_0 , S_1 y $\Delta\mu$ para todos los compuestos optimizados.

Momento Dipolar μ (D)																	
FE			7AHC			1			3			6			8		
$S_0(N)$	$S_1(N^*)$	$\Delta\mu$	$S_0(N)$	$S_1(N^*)$	$\Delta\mu$	$S_0(N)$	$S_1(N^*)$	$\Delta\mu$	$S_0(N)$	$S_1(N^*)$	$\Delta\mu$	$S_0(N)$	$S_1(N^*)$	$\Delta\mu$	$S_0(N)$	$S_1(N^*)$	$\Delta\mu$
5.7	13.9	8.2	7.3	24.8	17.5	6.6	25.8	19.2	7.4	12.5	5.1	6.4	18.0	11.6	6.0	16.4	10.3

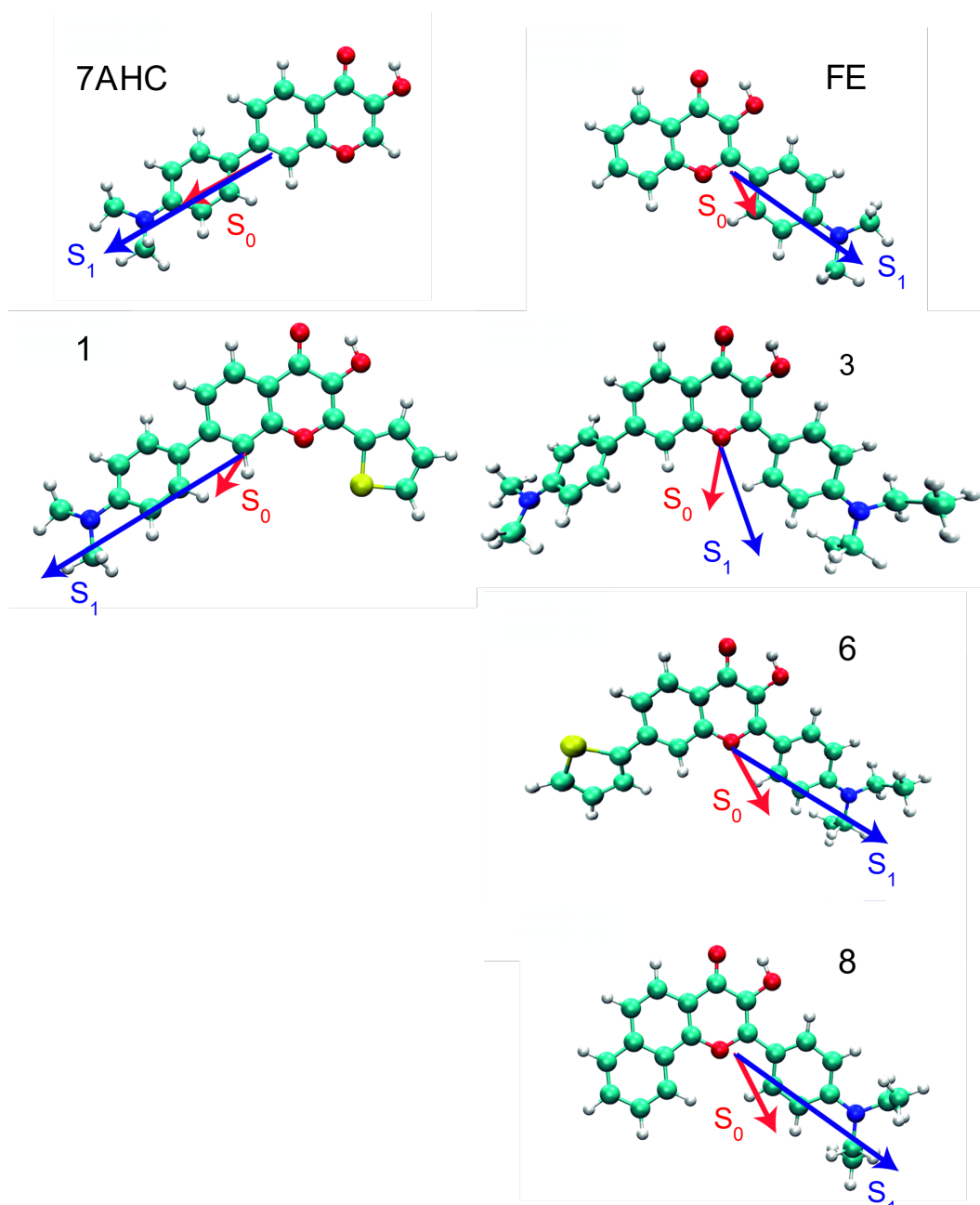


Figura 5.9. Momentos dipolares calculados para el estado fundamental S_0 en rojo y excitado S_1 en azul para **7AHC, Fe, 1,3,6** y **8**. La dirección de la flecha va de carga negativa a positiva.

5.3. Determinación de momentos dipolares experimentales

La diferencia del momento dipolar entre el estado fundamental y excitado fue estimada al aplicar la ecuación de L-M (Ecuación 5.1, sección 5.1)

a un gráfico del corrimiento de Stokes versus la función de polarizabilidad (Ecuación 5.4):

$$\Delta f = \frac{(\varepsilon - 1)}{(2\varepsilon + 1)} - \frac{(n^2 - 1)}{(2n^2 + 1)} \quad [5.4]$$

El radio de Onsager fue fijado (Figura 5.9) como 8,89 Å para las moléculas que tienen grupos dimetilamino en posición 2 (Serie **FE**) y 10,75 Å para los que tienen dicho grupo en posición 7 (Serie **7AHC**)

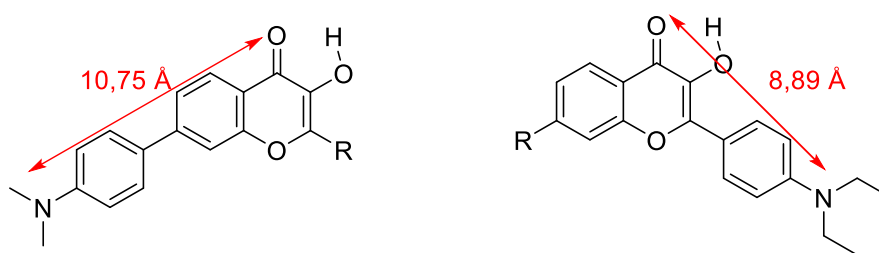


Figura 5.10. Radio de Onsager considerado como la distancia entre el grupo dador y el carbonilo.

Para determinar correctamente las longitudes de onda de emisión para las moléculas que presentan emisión dual utilizadas en el cálculo del corrimiento de Stokes se realizaron deconvoluciones espectrales para cada molécula en los diferentes solventes utilizados. Para esto se utilizó una función Log-normal (LN) tal como se describe en el capítulo 3.1.6. Las deconvoluciones espectrales se muestran en la sección 5.6. La longitud de onda de absorción se extrae directamente de los espectros de absorción. Esta información se encuentra publicada en (Cita)

5.4. Comparación de los valores experimentales y teóricos

Las diferencias entre los valores teóricos y experimentales se muestran en la tabla 5-4. Estas son mínimas para las moléculas que no tienen sustituyentes, como **FE** y **7AHC** (5-10%) mostrando una mayor concordancia entre los datos simulados y los obtenidos experimentalmente.

Tabla 5.4. $\Delta\mu$ teóricos y experimentales para las moléculas estudiadas

Serie 7AHC				Serie FE			
Dye	$\Delta\mu_{LM}$	$\Delta\mu_{CC}$	$\Delta\Delta\mu$	Dye	$\Delta\mu_{LM}$	$\Delta\mu_{CC}$	$\Delta\Delta\mu$
7AHC	15,9 ^a	17,5	1,6	FE	8,0	8,2	0,2
1	13,8	19,2	5,4	3	7,8	5,1	-2,7
				6	8,1	11,6	3,5
				8	8,1	10,3	2,2

$\Delta\mu_{LM}$ = Momento dipolar experimental y $\Delta\mu_{CC}$ = Momento dipolar teórico.
Valores en Debye

Para las series **FE** y **7AHC** a medida que aumenta la deslocalización de la molécula, las diferencias entre los valores teóricos y experimentales también aumentan (Figura XX). Por otro lado, para **3**, el valor experimental es menor que el simulado, lo que contrasta con el comportamiento observado en el resto de las moléculas.

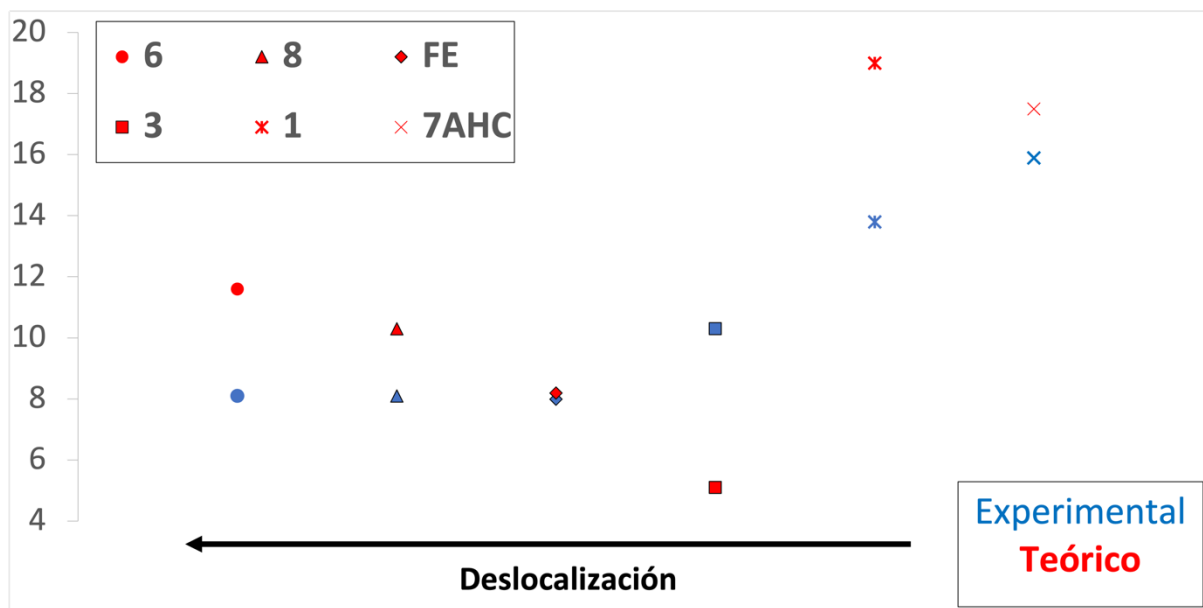


Figura 5.11. Momentos dipolares experimentales y teóricos para las moléculas estudiadas. El ordenamiento va por grado de deslocalización creciente de derecha a izquierda

Considerando de manera integral todos los resultados obtenidos de las simulaciones, se puede concluir que se comete un error al considerar radios de Onsager fijos para el cálculo del momento dipolar en todas las moléculas de la serie. Esta conclusión es clara para la progresión de moléculas **FE**, **8** y **6** en las que a medida que aumenta la deslocalización le

diferencia del valor simulado con el experimental aumenta. Esto sugiere subestimación del radio de Onsager. Particularmente la molécula **6** muestra la transferencia de carga más extendida que sus compañeras de serie. En el otro extremo, el compuesto **3**, muestra una diferencia negativa entre los $\Delta\mu$ experimentales y teóricos. La deslocalización es menos extendida debido a que dos donantes fuertes compiten por la transferencia de carga desde una posición opuesta. Si bien la transferencia de carga es más efectiva desde la posición 2 el radio de Onsager considerado debería ser más corto que en **FE**.

5.5. Conclusiones

Se realizaron simulaciones computacionales tanto en estado fundamental como excitado N^* para dos series de 3HCs que presentan transferencia de carga desde distintas posiciones. También se calcularon los momentos dipolares utilizando métodos espectroscópicos basados en la ecuación de L-M.

Las simulaciones permitieron determinar las variaciones de propiedades clave como parámetros geométricos, interacciones intermoleculares, FMOS y distribuciones de carga que dejan en evidencia el efecto que tienen los distintos grupos sustituyentes en la distancia de transferencia de carga. Los resultados obtenidos concuerdan con la información experimental y explican el comportamiento de fluorescencia para la serie **FE**. Por otro se encuentra que la ausencia de ESIPT en **7AHC** se asocia a que en el estado excitado no se ve favorecida la transferencia del protón puesto que el carbonilo (carbono 4) se vuelve positivo y el oxidrilo (carbono 3) negativo, haciéndose más ácido en lugar de más básico.

Se contrastaron los datos teóricos de los momentos dipolares con los experimentales. Para los últimos, se consideró un radio de Onsager fijo correspondiente para la distancia entre el dador y el aceptor de carga para las moléculas base **7AHC** y **FE**. Se llega a la conclusión de que considerar el radio de Onsager de esta manera en moléculas que tienen más de un grupo electrónico acoplado deriva en un error en la determinación de los momentos dipolares. Este hecho queda en evidencia en moléculas como **6** y **1** en las que la deslocalización se extiende a regiones moleculares más alejadas del aceptor de electrones, o **3** en donde sucede lo contrario. En ambos casos los momentos dipolares se subestima o sobreestima respectivamente.

Se concluye que para determinar el radio de Onsager en moléculas que no tienen el par dador-aceptor en los extremos de la molécula o en las que existen otros grupos que afectan electrónicamente a la molécula es de vital importancia determinar la distancia a la cual se da la transferencia de carga. Esta distancia deja de ser puntual entre dos átomos (dador y aceptor) y se puede visualizar como una densidad de carga que migra de una región de la molécula hacia otra.

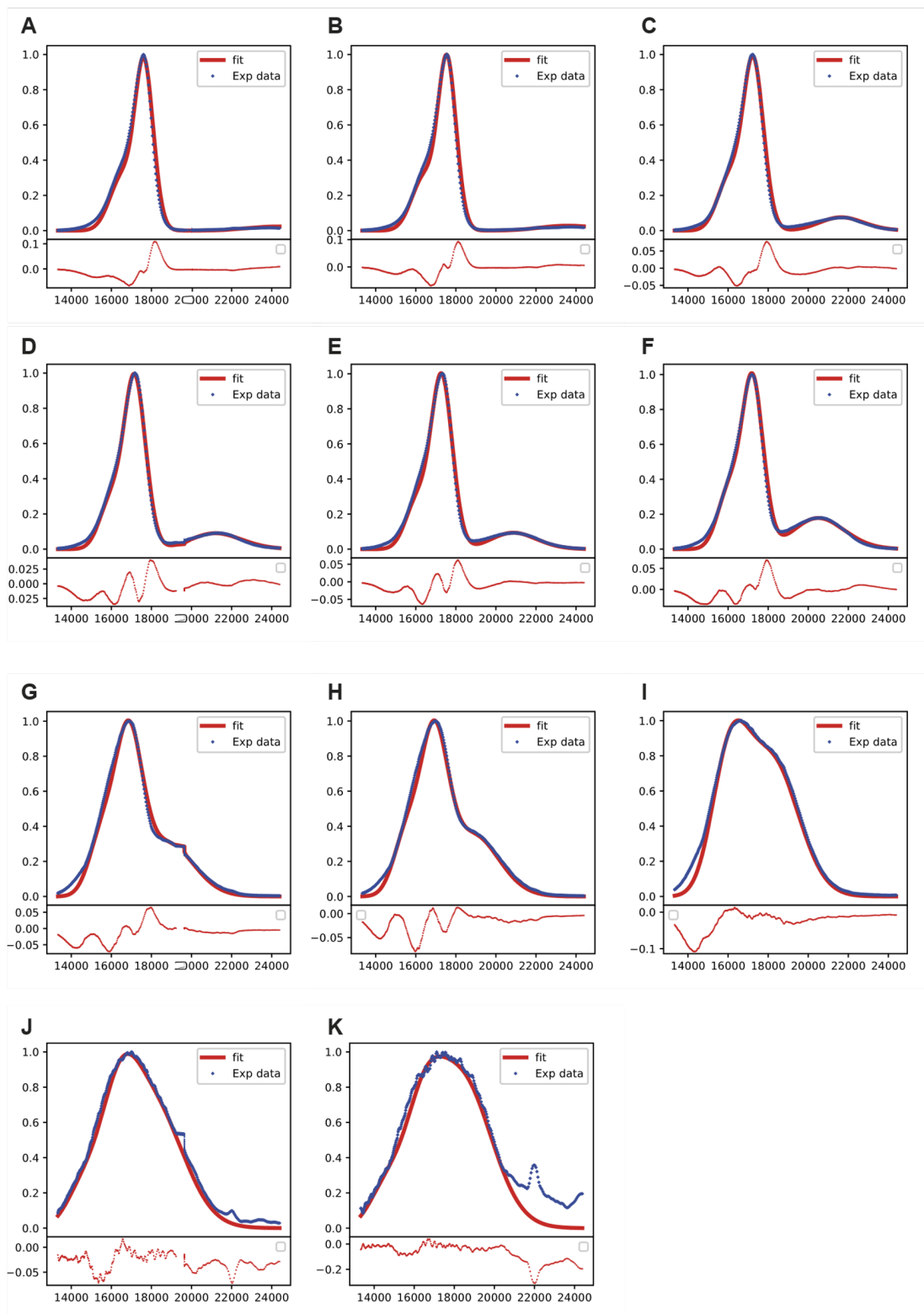


Figura 5.12. Deconvolución espectral de **1** en (A) Heptano, (B) Metilciclohexano, (C) *p*-Xileno, (D) Tolueno, (E) Dietil éter, (F) Dioxano, (G) THF, (H) Acetato de etilo (I) DCM, (J) Acetona y (K) DMSO

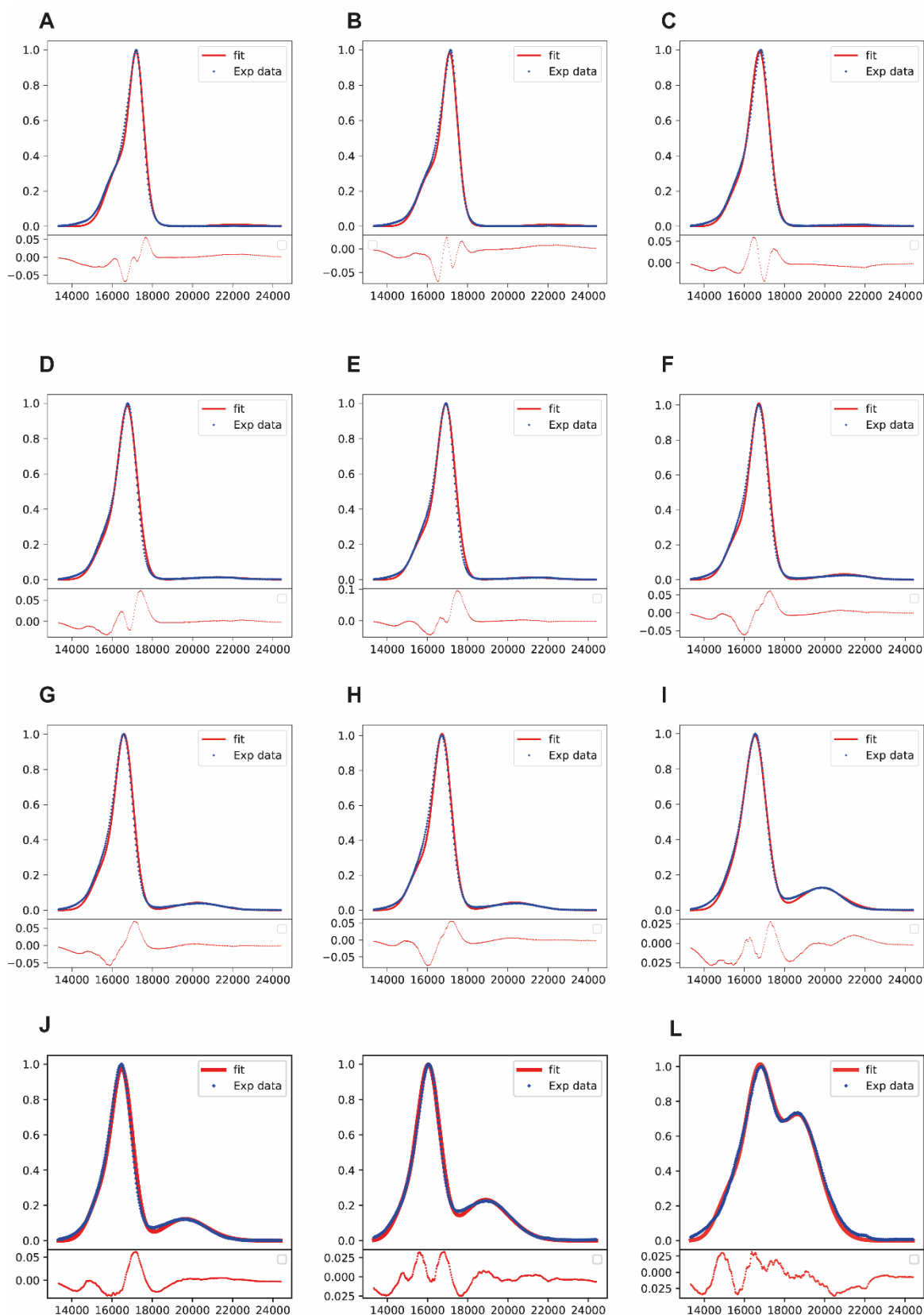


Figura 5.11. Deconvolución espectral de **3** en (A) Heptano, (B) Metilciclohexano, (C) p-Xileno, (D) Tolueno, (E) Dietil éter, (F) Dioxano, (G) THF, (H) Acetato de etilo (I) DCM, (J) Acetona y (K) DMSO y (L) Etanol.

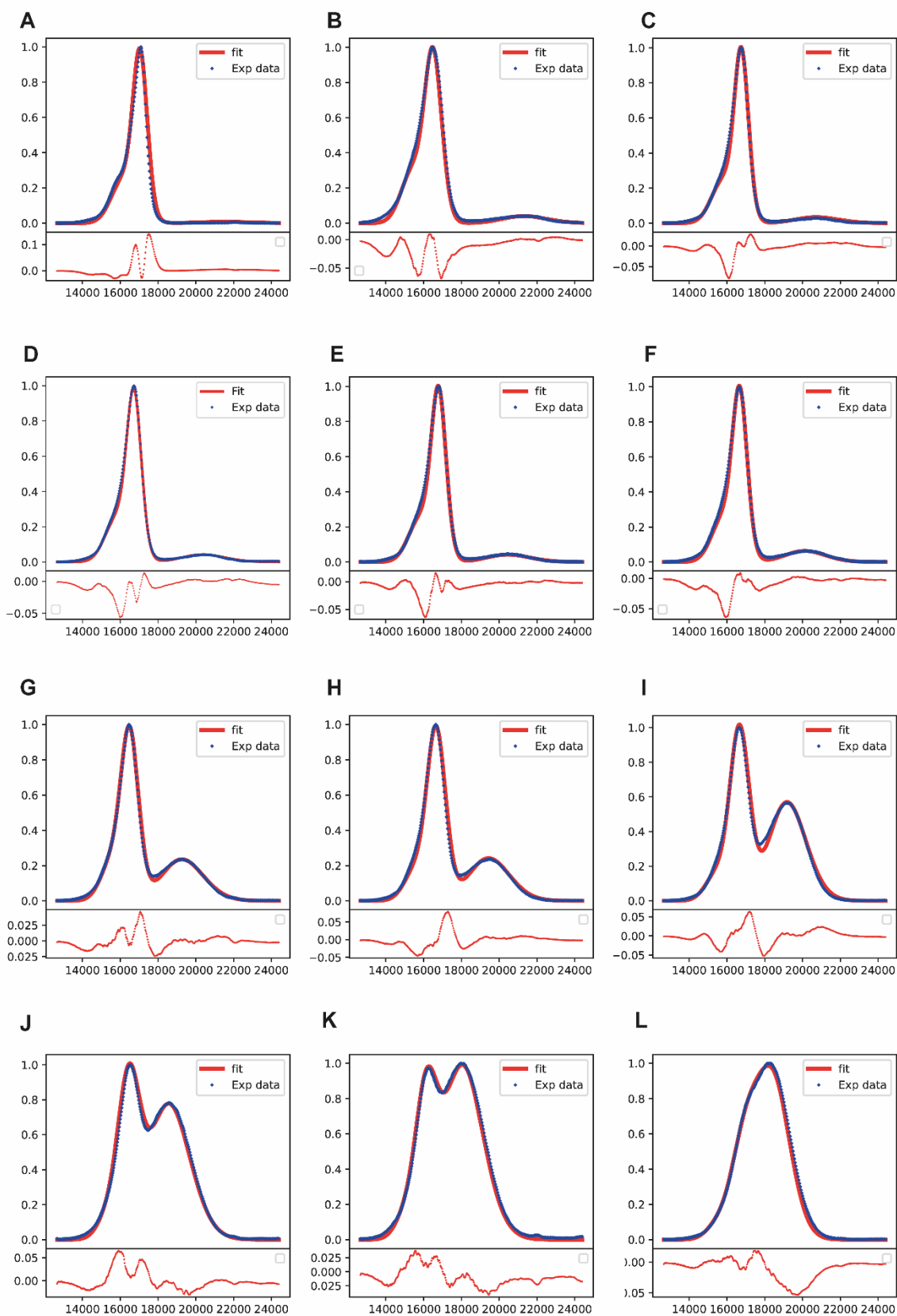


Figura 5.12. Deconvolución espectral de **6** en (A) Heptano, (B) Metilciclohexano, (C) p-Xileno, (D) Tolueno, (E) Dietil éter, (F) Dioxano, (G) THF, (H) Acetato de etilo (I) DCM, (J) Acetona y (K) DMSO y (L) Etanol.

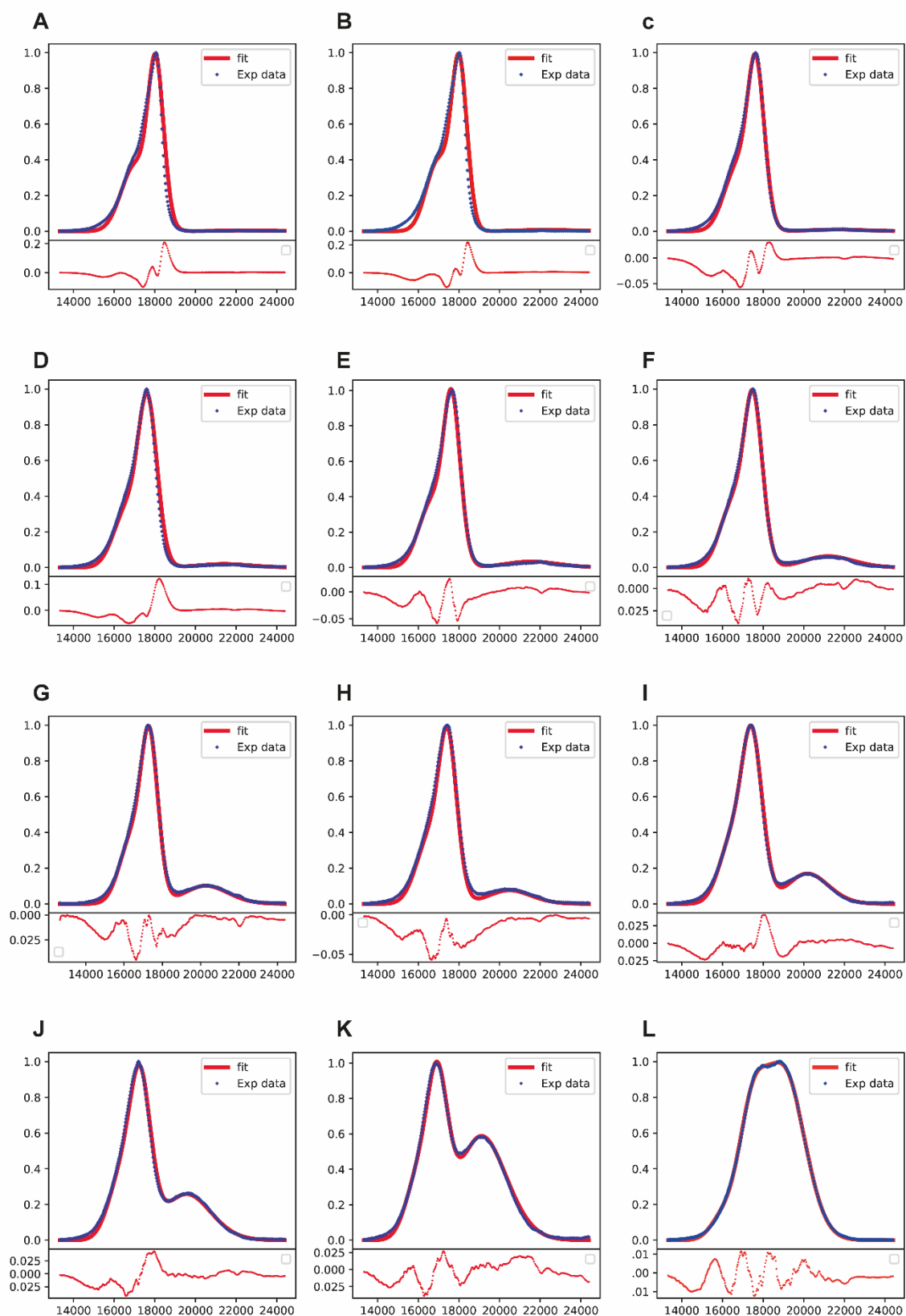


Figura 5.13. Deconvolución espectral de **8** en (A) Heptano, (B) Metilciclohexano, (C) p-Xileno, (D) Tolueno, (E) Dietil éter, (F) Dioxano, (G) THF, (H) Acetato de etilo (I) DCM, (J) Acetona y (K) DMSO y (L) Etanol.

5.6. Referencias

1. Lippert E. Spektroskopische Bestimmung des Dipolmomentes aromatischer Verbindungen im ersten angeregten Singulettzustand. Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie. 1957;61(8):962.
2. Mataga N, Kaifu Y, Koizumi M. Solvent Effects upon Fluorescence Spectra and the Dipolemoments of Excited Molecules. Bull Chem Soc Jpn. 1956;29:465.
3. Mukherjee S, Chattopadhyay A, Samanta A, Soujanya T. Dipole moment change of NBD group upon excitation studied using solvatochromic and quantum chemical approaches: Implications in membrane research. The Journal of Physical Chemistry. 1994;98(11):2809.
4. Giordano L, Shvadchak VV, Arrupe N, Falomir Lockhart LJ, Sánchez VM, Jovin TM. Tuning of environment-sensitive 3-hydroxychromone fluorophores based on strong donor substituents in positions 2 or 7. Dyes and Pigments. 2023;218:111479.
5. Kumar PSV, Raghavendra V, Subramanian V. Bader's Theory of Atoms in Molecules (AIM) and its Applications to Chemical Bonding. Journal of Chemical Sciences. 2016;128(10):1527.
6. Giordano L, Shvadchak VV, Fauerbach JA, Jares-Erijman EA, Jovin TM. Highly Solvatochromic 7-Aryl-3-hydroxychromones. J Phys Chem Lett. 2012;3(8):1011.

Capítulo 6

Resumen

El desarrollo de nuevos fármacos es un proceso complejo y altamente costoso que suele llevar más de una década desde las etapas iniciales de investigación hasta la aprobación por parte de la autoridad regulatoria. Las campañas de cribado tienen como objetivo encontrar hits factibles para ser optimizados en etapas posteriores, pero no necesariamente listas para salir al mercado. Encontrar moléculas promisorias de manera precisa en una campaña de HTS mejora significativamente el proceso subsecuente de desarrollo de fármacos, permitiendo un enfoque más eficiente y dirigido en las etapas de optimización.

Uno de los principales desafíos de la implementación del HTS es el desarrollo de ensayos que puedan determinar con exactitud qué molécula de la biblioteca a testear produce el efecto biológico deseado. La metodología debe ser estadísticamente robusta, reproducible y de bajo costo. En particular, los ensayos de fluorescencia destacan por su elevada sensibilidad, rápida respuesta y carácter no destructivos para la muestra. Estos ensayos requieren el desarrollo de sondas fluorescentes que se unan a la proteína de estudio y que, en presencia de una molécula que actúa sobre el blanco proteico, produzcan un cambio en la emisión de fluorescencia.

Existen dos enfoques principales para la detección de proteínas: el enzimático, en el que el cambio de fluorescencia se da por una reacción enzimática, y el no enzimático, en el que el cambio ocurre por la unión de la sonda a la proteína. El enfoque no enzimático es el menos explorado en la literatura y, por ende, cuenta con menos aplicaciones comerciales. Sin embargo, presenta ventajas al permitir el estudio de una mayor diversidad de proteínas y ser extrapolable a otros blancos biológicos mediante la modificación de la región molecular de la sonda que proporciona la selectividad.

El objetivo de esta tesis fue, en primer lugar, sintetizar sondas fluorescentes sensibles al entorno aplicables a la detección de sistemas proteicos no enzimáticos. En segundo lugar, se buscó desarrollar un método de fluorescencia robusto, reproducible, confiable y aplicable en un HTS.

En la introducción se detallan los conceptos básicos del recorrido de una molécula para llegar a ser un fármaco comercial, con énfasis en el uso de HTS como herramienta primaria para identificar moléculas prometedoras a ser optimizadas. También se explican los principios de la

espectroscopía de fluorescencia y como esta técnica puede proporcionar información sobre el entorno de un fluoróforo. Finalmente, se presenta información sobre los dos tipos de fluoróforos utilizados en este trabajo: 3-hidroxicromonas, sensibles a la polaridad del entorno, y BODIPYs meso sustituido, sensibles a la viscosidad o volumen libre del medio.

En el Capítulo 2 se presentaron las síntesis de distintas sondas fluorescentes sensibles al entorno derivadas de 3-hidroxicromonas y BODIPYs. Para la síntesis de ambos, se exploraron tanto los enfoques tradicionales y actuales. Los BODIPYs fueron sintetizados usando como precursores aldehídos y derivados de ácido. En el caso de estos últimos, se analizó el uso de cloruros de ácido comerciales y sintetizados en el laboratorio, encontrando que la síntesis en el laboratorio introdujo impurezas que disminuyeron la eficiencia de la reacción. Para la síntesis del fluoróforo Br-3HC, la implementación de rutas modernas de síntesis, como el uso de pirrolidina o catalizadores de transferencia de fase no mejoró los rendimientos.

Para la síntesis de las sondas fluorescentes, se exploró la reacción de acoplamiento de Sonogashira utilizando ioduros y bromuros de arilo acoplados a los fluoróforos. Para estos últimos se hizo un análisis de la reactividad y optimización de la síntesis. Se lograron obtener siete sondas fluorescentes: cinco específicas para la proteína hCAII, una para FABP2 y una última derivada de morfolina, útil para estudiar liposomas.

En cuanto a la obtención de las sondas específicas para hCAII, los rendimientos fueron inferiores a los esperados en la reacción de Sonogashira. Los ligandos derivados de sulfonamidas presentaron problemas de solubilidad, lo que afectó negativamente los rendimientos finales.

En el Capítulo 4, la metodología propuesta fue optimizada y validada utilizando un sistema proteico que une moléculas pequeñas de manera no específica (HSA). Se utilizaron tres de los fluoróforos generados (I-BDP, H-BDP y BDP-morfolina), para los cuales se realizaron múltiples titulaciones, detectando intensidad de fluorescencia como señal. Los resultados obtenidos se compararon con la información bibliográfica disponible, demostrando la precisión y robustez del enfoque implementado.

El comportamiento intrínseco de fluorescencia fue explorado para el sistema I-BDP/HSA, utilizando anisotropía y tiempos de vida de fluorescencia, que no dependen de la concentración de fluoróforo como sí lo hace la intensidad. Los resultados de tiempo de vida mostraron que el aumento de la intensidad de fluorescencia en BODIPYs está más relacionado con un incremento en la solubilidad que con cambios en el volumen libre en el entorno del rotor. Además, la titulación detectando anisotropía fue consistente con los resultados obtenidos utilizando intensidad de fluorescencia, lo que refuerza la robustez del método, incluso ante fenómenos de agregación de los fluoróforos.

Se determinó con una precisión del 1,2% el $\Delta G_{\text{unión}}$ de la warfarina por HSA, validando así la metodología para identificar inhibidores competitivos con K_D del orden de las sondas utilizadas.

En el caso del sistema H-BDP/HSA, se amplió la información disponible sobre el sitio de unión del fluoróforo. Se validó la estequiometría de unión a un único sitio, determinando que corresponde al dominio IIA (sitio 1), y se confirmó indirectamente la existencia de FRET entre la proteína y el fluoróforo.

Una vez validada la metodología con HSA, se evaluaron las determinaciones de unión y desplazamiento utilizando sondas específicas para la proteína hCAII. Se obtuvieron constantes de disociación para las sondas BDP-Amida, BDP-Éster y 3HC-Amina a partir de los dos tipos de determinaciones propuestas (secuencial e independiente), obteniéndose resultados congruentes respecto a moléculas similares reportadas en bibliografía. Posteriormente, utilizando BDP-Amida, se realizó un ensayo de desplazamiento con un inhibidor competitivo de K_D conocida y del orden de los sub-micromolar. Este ensayo permitió estimar con una precisión de 4,15 % de error el $\Delta G_{\text{unión}}$, validando así la metodología para identificar inhibidores competitivos que muestran un rango de K_D que va de micromolar, a submicromolar.

Se realizaron deconvoluciones espectrales de la sonda 3HC-Amina en distintos solventes orgánicos próticos y apróticos, además de hCAII, lo que permitió caracterizar el entorno del sitio de unión. Los resultados obtenidos indicaron que el entorno al que se une la sonda es prótico pero presenta algo de hidrofobicidad. Esta observación experimental se contrastó con estudios

de docking molecular, que mostraron un entorno expuesto al solvente, pero en las inmediaciones de las zonas hidrofóbicas de la superficie proteica.

La sonda BDP-Amina no mostró respuesta de fluorescencia ni en hCAII ni en HSA. Se realizaron dinámicas moleculares que mostraron estabilidad en el complejo ligando-proteína en los 100 ns simulados. Sin embargo, un estudio conformacional a partir de métodos computacionales semi-empíricos reveló que la conformación más estable es aquella en la que la molécula se encuentra plegada sobre sí misma, sugiriendo que el costo energético para romper las interacciones intermoleculares es mayor que el $\Delta G_{\text{unión}}$. Esto se respalda por la falta de unión con HSA donde la región molecular responsable del binding es diferente (BODIPY).

En el caso del sistema BDP-Ac/FABP2, se observó un comportamiento contrario al esperado, con un decrecimiento en la intensidad de fluorescencia. La constante de disociación, (mayor a las reportadas para ácidos carboxílicos de cadena larga), sugiere que la sonda presenta afinidad a la proteína por toda su estructura en sí, y no solamente por la región del ácido carboxílico. Esto se correlaciona con los valores de K_D reportados para ligandos con ácidos de cadena corta y estructuras rígidas acopladas. El estudio del modo de unión de la sonda en el sitio de la proteína concluyó que el decrecimiento en la intensidad de fluorescencia se debe a que la sonda ingresa completamente a la proteína e interacciona con residuos de tirosinas (interacción pi-pi). Estos residuos suelen producir quenching de fluoróforos en sistemas proteicos.

Finalmente, al comparar en conjunto todos los valores obtenidos de K_D con los datos bibliográficos y convertirlos a energías libres, se confirmó la precisión y robustez de la metodología adoptada. Aunque el objetivo principal de esta tesis no es el de desarrollar una metodología para determinar la K_D con precisión, la exactitud obtenida resalta la robustez del método. Esto es así puesto que los valores de K_D son la única métrica disponible para comparar los resultados obtenidos con datos reportados en bibliografía.

Independientemente del tipo de determinación (titulación secuencial única o medidas independientes con réplicas), el error en las determinaciones no superó el 8%. Estos resultados indican que el desarrollo de un ensayo simple a partir de las sondas desarrolladas, con la metodología

aplicada, es factible, obteniendo datos precisos de manera rápida y eficiente a pesar de la variabilidad experimental intrínseca. Dado que los valores de K_D obtenidos para las distintas sondas se encuentran en el rango de 1-5 μM y que la metodología permite identificar ligandos competitivos con K_D del mismo orden o inferiores, se puede concluir que el ensayo desarrollado es transferible a condiciones de HTS.

En el Capítulo 5 se realizaron simulaciones computacionales tanto en estado fundamental como excitado para dos series de 3HCs que presentan transferencia de carga desde distintas posiciones. También se calcularon los momentos dipolares utilizando métodos espectroscópicos basados en la ecuación de L-M. Las simulaciones permitieron determinar las variaciones de propiedades clave como parámetros geométricos, interacciones intermoleculares, FMOS y distribuciones de carga que dejan en evidencia el efecto que tienen los distintos grupos sustituyentes en la distancia de transferencia de carga. Los resultados obtenidos concuerdan con la información experimental y explican el comportamiento de fluorescencia para la serie FE. Por otro lado, se encontró que la ausencia de ES IPT en 7AHC se asocia a que en el estado excitado no se ve favorecida la transferencia del protón, puesto que el carbonilo (carbono 4) se vuelve positivo y el oxidrilo (carbono 3) negativo, haciéndose más ácido en lugar de más básico.

Se contrastaron los datos teóricos de los momentos dipolares con los experimentales. Para los últimos, se consideró un radio de Onsager fijo correspondiente para la distancia entre el dador y el aceptor de carga para las moléculas base 7AHC y FE. Se concluye que considerar el radio de Onsager de esta manera en moléculas que tienen más de un grupo electrónico acoplado deriva en un error en la determinación de los momentos dipolares. Este hecho queda en evidencia en moléculas como 6 y 1, en las que la deslocalización se extiende a regiones moleculares más alejadas del aceptor de electrones.

Trabajos publicados incluidos en esta Tesis:

- Giordano L, Shvadchak VV, Arrupe N, Falomir Lockhart LJ, Sánchez VM, Jovin TM. Tuning of environment-sensitive 3-hydroxychromone fluorophores based on strong donor substituents in positions 2 or 7. *Dyes and Pigments*. (2023), **218**, 111479.

Trabajos publicados no incluidos en esta Tesis:

- Leal ES, Pascual MJ, Adler NS, Arrupe N, Merwaiss F, Giordano L, et al. Unveiling tetrahydroquinolines as promising BVDV entry inhibitors: Targeting the envelope protein. *Virology*. (2024), **590**, 109968.

Dos trabajos en preparación