

Protocolo de tesis de maestría

Síntesis sustentable, caracterización química-fotofísica, y por DFT de BOSCHIBA derivadas de aminoácidos y su aplicación in vitro

Pablo E. Alanis González

19 de septiembre de 2023

Universidad Autónoma de Nuevo León, División de Posgrado

Resumen

Se sintetizarán una serie de Bases de Schiff de Boro (*del inglés "Boron Schiff Bases"*) (BOSCHIBA) derivadas de triptófano **1**, fenilalanina **2**, tirosina **3** y glicina **4**. Se caracterizarán por métodos espectroscópicos. Se realizarán cálculos *in silico* por medio de Teoría del funcional de la densidad (*del inglés "Density Functional Theory"*) (DFT) y Teoría del funcional de la densidad tiempo-dependiente (*del inglés "Time-Dependant Density Functional Theory"*) (TDDFT) para estudiar las propiedades fotofísicas de los compuestos y comprobar los mecanismos involucrados en el efecto supresor de la luminiscencia en dichos compuestos así como estudios de topológicos sobre estos. A su vez, se realizarán estudios de citotoxicidad y tinción *in vitro* para determinar su actividad biológica de los compuestos.

Índice

1	Introducción	1
2	Antecedentes	5
3	Análisis crítico de los antecedentes	5
4	Aporte científico	5
5	Hipótesis	7

6	Objetivos	7
6.1	Objetivo general	7
6.2	Objetivos específicos	7
7	Metodología	7
7.1	Síntesis	7
7.2	Determinación de propiedades ópticas	7
7.3	Determinación de citotoxicidad	7
7.4	Modelado molecular	7
7.4.1	Selección del funcional	7
7.4.2	Optimización	7
7.4.3	Obtención de espectro de emisión	7
8	Residuos	7
9	Análisis de costos	7
10	Procedimiento experimental	8
11	Planificación	8

1. Introducción

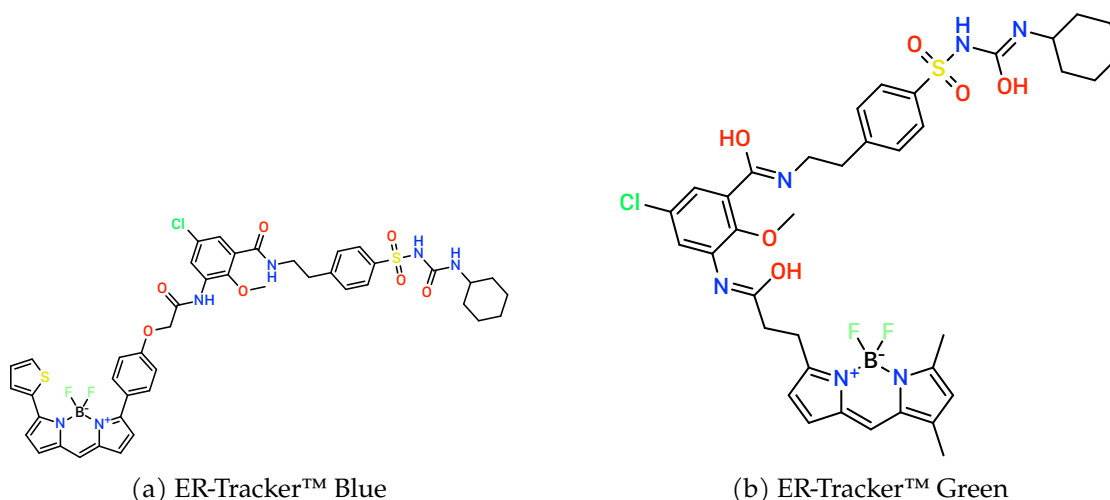
Recientemente, se ha acrecentado el interés por los compuestos fluorescentes de boro debido a su amplio campo de aplicaciones; (1) ya sea en sensores, como en tintas de seguridad, o bien los boron-dipyrromethene (BODIPY) comercialmente disponibles utilizados como agentes para la tinción celular, ER-Tracker™ Green y ER-Tracker™ Red (ver esquema 1).

Los Rotores Moleculares Fluorescentes (*Del inglés Fluorescent Molecular Rotor*) (FMR) son fluoróforos sensibles a la viscosidad que presentan una rotación libre que se vuelven fluorescentes, o en su defecto, aumentan la fluorescencia solo si su rotación se ve restringida. Algunas interacciones de carácter intramolecular para detener la rotación de los FMR son i. formar interacciones de hidrógeno,(2) ii. a través del impedimento estérico,(3) o iii. por la formación de complejos estables con iones metálicos.(4)

Se ha determinado que la polarización del solvente y la viscosidad del mismo afectan considerablemente la fluorescencia de los FMR. Esto es porque se limita la tasa de formación del complejo transferencia de carga intramolecular retorcida (*del inglés "twisted intramolecular charge transfer"*) (TICT), el cual se de-exita de forma *no-radiativa*, y se promueve la formación del complejo Local Excitado (*del inglés "locally excited"*) (LE), el cual fluórese. El efecto que tiene la polarización del solvente, aunque se sabe que es importante, no se ha logrado elucidar de forma aislada a la viscosidad.(5)

Diferentes estrategias para el diseño de FMR se han propuesto para realizar sensores de viscosidad altamente sensibles, por ejemplo, incorporando grupos rotacionales asimétricos,(6) rotadores con alta capacidad rotacional,(7) variación de puentes π -conjugados

Citar



Scheme 1: Los ER-Tracker™ Green y ER-Tracker™ Red de Thermo Fischer Scientific™ son BODIPY comerciales utilizados como agentes para la tinción celular.

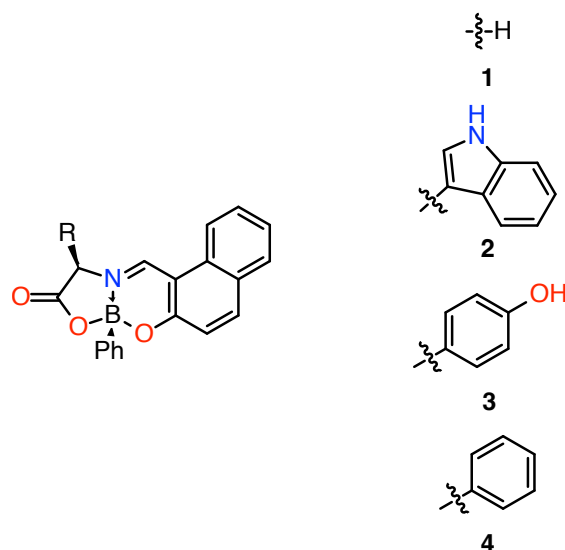
push-pull,⁽⁷⁾ la aplicación de rotadores di- o trímeros,⁽⁸⁾ y la introducción de dos rotadores con diferentes capacidades rotacionales y electrondonantes.⁽⁹⁾

Por lo que, obtener tanto una alta eficiencia de fluorescencia como un contraste fluorescente simultáneamente es muy difícil, debido a que, en muchos casos, las moléculas de alto rendimiento cuántico tienen una capacidad de contraste deficiente. El rendimiento cuántico y el contraste de fluorescencia de los FMR están inversamente correlacionados, una relación llamada "intensidad de fluorescencia—contraste".⁽¹⁰⁾

En la actualidad existe una amplia variedad de FMR derivados de compuestos de boro, donde los BODIPY y los dioxaborinos son los protagonistas debido a su elevado rendimiento cuántico, sin embargo, muestran algunas desventajas como la síntesis en varias etapas, condiciones de atmósfera anhidra y, en muchas ocasiones, una capacidad de contraste baja, aumentando escasamente el rendimiento cuántico del valor inicial.^(7, 11-13)

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha informado sobre la síntesis de BOSCHIBA y su uso como FMR en la detección de viscosidad y la bioimagen de células.⁽¹⁴⁾ Los resultados encontrados indican que los BOSCHIBA pueden aumentar hasta 34 veces su valor de rendimiento cuántico en medios de alta viscosidad, sin embargo, a pesar de teñir selectivamente el citoplasma en las células de melanoma, presentaron un bajo teñido atribuido principalmente a la baja solubilidad de los compuestos.

Para lograr mejorar el contraste de fluorescencia y la bioimagen celular, se diseñó una serie de BOSCHIBA derivados de aminoácidos (ver esquema 2), donde las moléculas presentan rotación libre a través del anillo fenilborónico, y el aminoácido podría dar una mayor compatibilidad y solubilidad en medios celulares. Los compuestos de boro fluorescentes **1-4** se obtuvieron por irradiación ultrasónica en combinación con una reacción multicomponente con altos rendimientos químicos (>90 %) y un tiempo de reacción corto de 20 min a 50 °C. Este método resulta más eficiente y rápido en comparación con



Scheme 2: Compuestos que se sintetizarán en esta investigación.

moléculas similares reportadas en la literatura.

Todos los compuestos fueron caracterizados completamente, tanto estructural como fotofísicamente. Las estructuras cristalinas obtenidas para los compuestos tirosina **3** y triptófano **1** muestran átomos de boro tetracoordinados con geometría tetraédrica ligeramente distorsionada y la formación de dos heterociclos fusionados de cinco y seis miembros debido a la coordinación N→B (ver ??). Las longitudes N→B, tirosina **3** de 1.569 Å y para triptófano **1** 1.566 Å sugieren una fuerte coordinación del nitrógeno con los átomos de boro porque son menores que la distancia covalente N→B estimada; esto se confirma por el carácter tetraédrico del 91.33 % y 93.07 %, respectivamente.

Otra evidencia confiable de la unión de coordinación N→B fue una señal ancha alrededor de $^{11}\text{B-NMR}$: δ 5.80; para todos los compuestos, indicativo de un átomo de boro tetracoordinado. El HRMS de los compuestos de boro mostró que el pico base corresponde al pico del ion molecular, y la primera fragmentación resulta en su ligando por pérdida del segmento fenilborónico (ver ESI).

Con el propósito de determinar la capacidad de detección de viscosidad, se midieron los espectros de fluorescencia de 1-4 en mezclas de metanol/glicerol a diferentes fracciones, donde, el compuesto **2** muestra que la intensidad de fluorescencia aumenta significativamente con un aumento de la fracción de glicerol (ver apartado 1), mientras que el resto de los compuestos no muestran un cambio significativo en su intensidad de fluorescencia (ver ESI). En el medio sin glicerol, el rendimiento cuántico de 2 es menor que 0.04 % y aumenta alrededor de 100 veces en alta fracción de glicerol con 0.40 % de rendimiento cuántico. Hasta hoy no había un alto sensibilizador de viscosidad.

Para lograr comprender mejor las propiedades fotofísicas en solución, se desarrollaron estudios *in silico* para las moléculas, utilizando el método B3LYP/6-31G(d,p), implementado en Gaussian 09. Explorando las estructuras de energía mínima de 1-4, obtenidas por

Conseguir
ESI

Conseguir
ESI

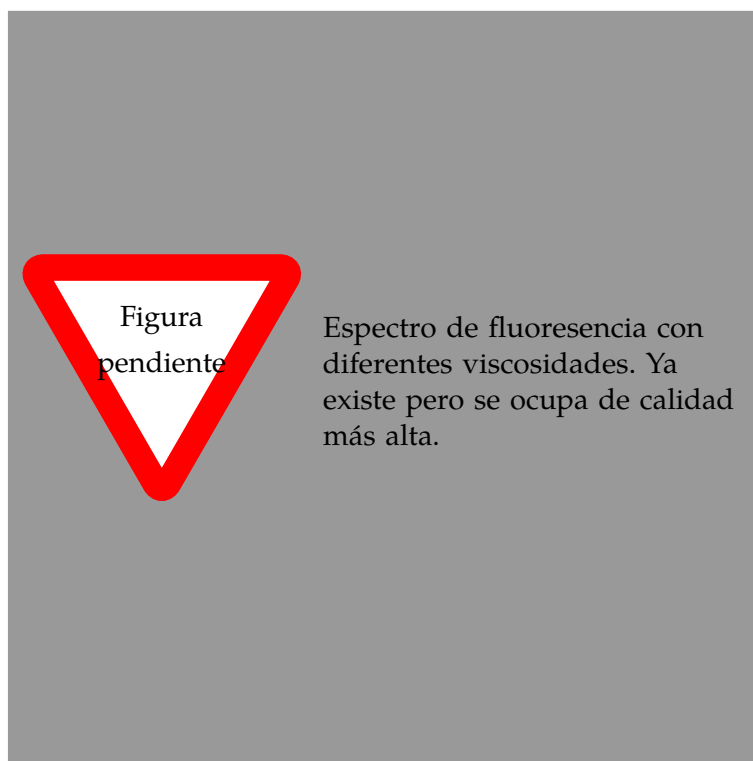


Figura 1: Espectro de fluorescencia del fenilalanina **2** con glicerol en diferentes proporciones. A mayor viscosidad se observa un aumento en la fluorescencia.

Superficie de Energía Potencial (*del inglés "Potential Energy Surface"*) (PES), el fragmento de triptófano en la molécula 2 genera una obstrucción estérica significativa en el anillo fenilborónico, causando un ángulo de torsión diédrico de 73.5°, a diferencia del resto de las estructuras (1, 3 y 4), donde el fragmento de aminoácido no causa ninguna obstrucción estérica y los ángulos de torsión diédricos están cerca de 55° (ver ESI). Además, se calcularon los Orbitales Naturales de Enlace (*del inglés "Natural Bond Orbitals"*) (NBO) para las estructuras optimizadas. Las principales transferencias de carga en todas las moléculas se dan por N→B, O1→B y O2→B, donde, los átomos de nitrógeno y oxígenos actúan como donadores de electrones y el átomo central de boro actúa como aceptor de electrones. En el caso de las moléculas 1, 3 y 4, que no tienen obstrucción estérica, se observan mayores transferencias de carga por grupos donador-aceptor debido a una mejor superposición de orbitales, en comparación con el compuesto 2 derivado del triptófano. Sin embargo, cuando el ángulo de torsión diédrico se modifica a 55° y se calculan los NBO, se recupera la superposición óptima de orbitales y se obtienen valores de transferencia de carga similares.

poner con comando reactant

Conseguir ESI

poner con comando reactant

En un medio de alta viscosidad, la molécula 2 no puede tener flexibilidad estructural o la obstrucción estérica podría suprimirse, permitiendo que la superposición orbital no se vea afectada. Este comportamiento del compuesto 2 podría explicar la disminución significativa del rendimiento cuántico experimental en solución y sugiere que el mecanismo de detección de viscosidad ocurre a través de la modificación de las propiedades de transferencia de carga intramolecular por la obstrucción estérica del triptófano.

poner con comando reactant

poner con comando reactant

Subsecuentemente, se calcularon las Energía de Emisión Vertical (*del inglés "Vertical Emission Energy"*) (VEE) para el primer estado excitado, al mismo nivel de teoría. Los valores de VEE obtenidos para 1-4 fueron (60.15, 41.83, 52.65 y 60.52) kcal/mol, respectivamente, mostrando valores de 2 inferiores al resto de los compuestos y coincidiendo con lo observado experimentalmente.

poner con comando reactant

En la apartado 1 se muestran los FMO involucrados para todos los compuestos sintetizados

poner con comando reactant

HOMO for 2 shows an electronic delocalization on the amino acid fragment and outside the fluorophore, unlike the rest of structures, where the HOMO shows an electronic delocalization across the naphthyl group and the new rings formed with boron atom. The LUMOs of all molecules are completely delocalized across the naphthyl and boron rings, without influence of the different amino acids. However, exploring the HOMO-1 it has similar electronic delocalization distribution that rest of compounds (see ESI), this behaviour could also explain the significant decrease of experimental quantum yield in the molecule derived from tryptophan and suggest HOMO-LUMO transition is responsible for fluorescence, nevertheless, even though HOMO-LUMO of 2 have highest energy value, the energy of these orbitals being the closest, suggesting greater mobility of the π electrons in conjugated system and better molecular stability.

El Orbital Molecular de mas alta energía (*del inglés "Highest Occupied Molecular Orbital"*) (HOMO) para el compuesto 2 muestra una deslocalización hacia el fragmento de aminoácido y fuera del fluoróforo; a diferencia de las otras estructuras donde el HOMO muestra deslocalización sobre el grupo naftilo y los anillos formados con el boro. Los Orbital Molecular no ocupado de más baja energía (*del inglés "Lowest Unoccupied Molecular*

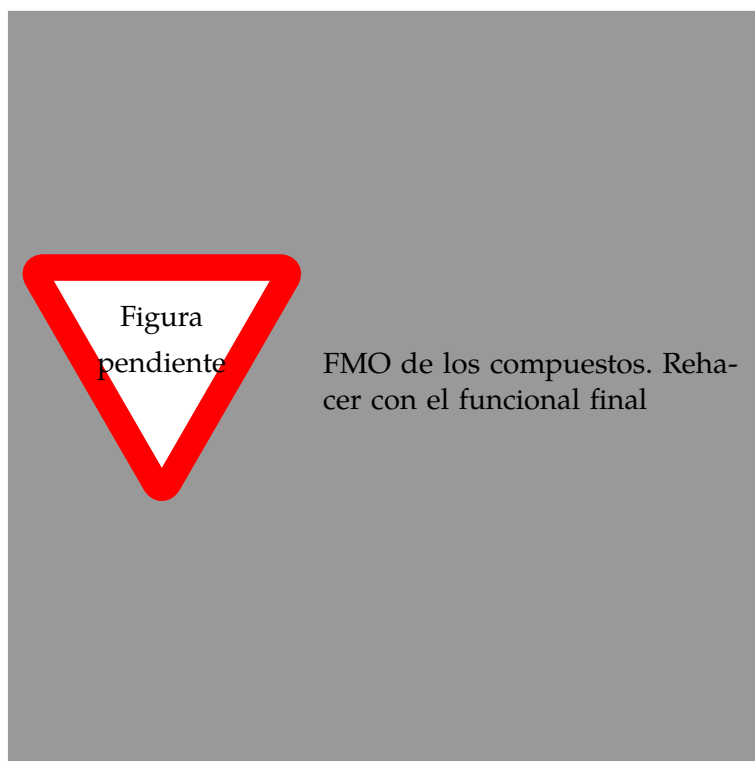


Figura 2: Orbitales Moleculares de Frontera (*del inglés "Frontier Molecular Orbitals"*) (FMO) de los compuestos sintetizados

Orbital'') (LUMO) de todos los compuestos estan completamente deslocalizados sobre el grupo naftilo y los anillos que contienen Boro, sin influencia de los diferentes aminoacidos. Sin embargo, al explorar el HOMO-1

2. Antecedentes

Hacer!

3. Análisis crítico de los antecedentes

Hacer!

4. Aporte científico

Hacer!

5. Hipótesis

Hacer!

6. Objetivos

Hacer!

6.1. Objetivo general

Hacer!

6.2. Objetivos específicos

Hacer!

7. Metodología

Hacer!

7.1. Síntesis

Hacer!

7.2. Determinación de propiedades ópticas

Hacer!

7.3. Determinación de citotoxicidad

Hacer!

7.4. Modelado molecular

Hacer!

7.4.1. Selección del funcional

Hacer!

7.4.2. Optimización

Hacer!

7.4.3. Obtención de espectro de emisión

Hacer!

8. Residuos

Hacer!

9. Análisis de costos

Hacer!

10. Procedimiento experimental

Hacer!

11. Planificación

Hacer!

Glosario

BODIPY BORON-DIPYRROMETHENE. 1–3

BOSCHIBA Bases de Schiff de Boro (*del inglés "Boron Schiff Bases"*). 1, 3

DFT Teoría del funcional de la densidad (*del inglés "Density Functional Theory"*). 1

FMO Orbitales Moleculares de Frontera (*del inglés "Frontier Molecular Orbitals"*). 5

FMR Rotores Moleculares Fluorescentes (*Del inglés Fluorescent Molecular Rotor*). 1–3

LE Local Excitado (*del inglés "locally excited"*). 2

NBO Orbitales Naturales de Enlace (*del inglés "Natural Bond Orbitals"*). 5

PES Superficie de Energía Potencial (*del inglés "Potential Energy Surface"*). 5

TDDFT Teoría del funcional de la densidad tiempo-dependiente (*del inglés "Time-Dependant Density Functional Theory"*). 1

TICT transferencia de carga intramolecular retorcida (*del inglés "twisted intramolecular charge transfer"*). 2

VEE Energía de Emisión Vertical (*del inglés "Vertical Emission Energy"*). 5

Referencias

1. M. Ibarra-Rodríguez *et al.*, *Applied Organometallic Chemistry* **33**, e4718, ISSN: 02682605 (abr. de 2019).
2. Y. Wu *et al.*, *Nature Communications* **9**, 1953, ISSN: 2041-1723 (16 de mayo de 2018).
3. A. Faulkner, T. Van Leeuwen, B. L. Feringa y S. J. Wezenberg, *Journal of the American Chemical Society* **138**, 13597-13603, ISSN: 0002-7863, 1520-5126 (19 de oct. de 2016).
4. R. Yadav *et al.*, *New Journal of Chemistry* **43**, 7109-7119, ISSN: 1144-0546, 1369-9261 (2019).
5. M. Haidekker, T. Brady, D. Lichlyter y E. Theodorakis, *Bioorganic Chemistry* **33**, 415-425, ISSN: 00452068 (dic. de 2005).
6. S.-C. Lee *et al.*, *Chemical Communications* **52**, 13695-13698, ISSN: 1359-7345, 1364-548X (2016).
7. J. Karpenko *et al.*, *Journal of Materials Chemistry C* **4**, 3002-3009, ISSN: 2050-7526, 2050-7534 (2016).
8. J. D. Kimball *et al.*, *RSC Advances* **5**, 19508-19511, ISSN: 2046-2069 (2015).
9. S. L. Raut *et al.*, *Physical Chemistry Chemical Physics* **18**, 4535-4540, ISSN: 1463-9076, 1463-9084 (2016).
10. S.-C. Lee *et al.*, *Chemistry – A European Journal* **24**, 13688-13688, ISSN: 0947-6539, 1521-3765 (18 de sep. de 2018).
11. N. Gupta *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* **4**, 1968-1977, ISSN: 2050-750X, 2050-7518 (2016).
12. L.-L. Li *et al.*, *Analytical Chemistry* **90**, 5873-5878, ISSN: 0003-2700, 1520-6882 (1 de mayo de 2018).
13. E. Kim *et al.*, *Organic & Biomolecular Chemistry* **14**, 1311-1324, ISSN: 1477-0520, 1477-0539 (2016).
14. M. Ibarra-Rodríguez *et al.*, *The Journal of Organic Chemistry* **82**, 2375-2385, ISSN: 0022-3263, 1520-6904 (3 de mar. de 2017).

Pendientes

■ Citar	2
Figura: Espectro de fluorescencia con diferentes viscosidades. Ya existe pero se ocupa de calidad más alta.	4
■ Conseguir ESI	4
■ Conseguir ESI	4
■ poner con comando reactant	5
■ Conseguir ESI	5
■ poner con comando reactant	5

■ poner con comando reactant	5
■ poner con comando reactant	5
■ poner con comando reactant	5
■ poner con comando reactant	5
■ Hacer!	5
■ Hacer!	5
■ Hacer!	5
Figura: FMO de los compuestos. Rehacer con el funcional final	6
■ Hacer!	7
■ Hacer!	7
■ Hacer!	7
■ Hacer!	7
■ Hacer!	7
■ Hacer!	7
■ Hacer!	7
■ Hacer!	7
■ Hacer!	7
■ Hacer!	7
■ Hacer!	7
■ Hacer!	7
■ Hacer!	7
■ Hacer!	8
■ Hacer!	8