

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

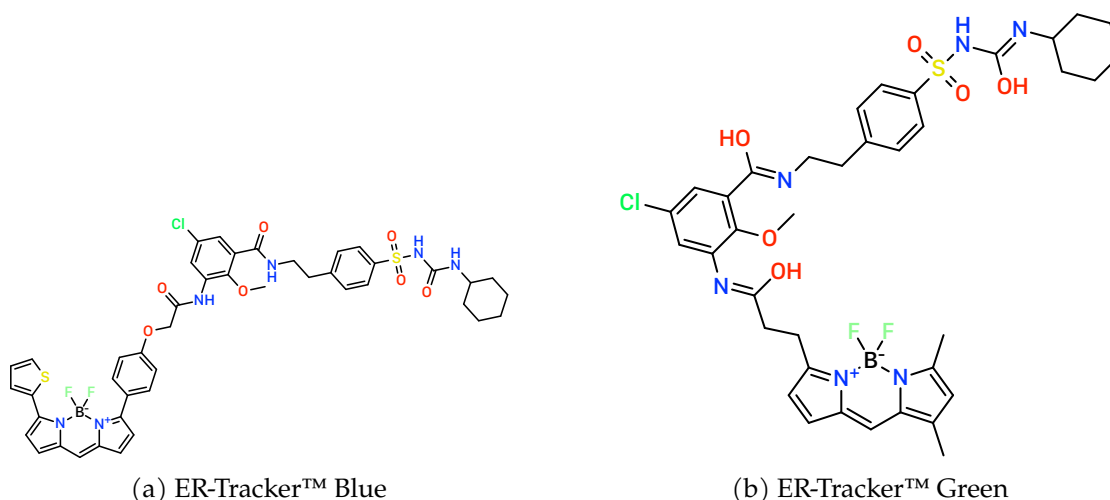
Se sintetizarán una serie de Bases de Schiff de Boro (*del inglés "Boron Schiff Bases"*) (BOSCHIBA) derivadas de triptófano **1**, fenilalanina **2**, tirosina **3** y glicina **4**. Se caracterizarán por métodos espectroscópicos. Se realizarán cálculos *in silico* por medio de Teoría del funcional de 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

Recientemente, se ha acrecentado el interés por los compuestos fluorescentes de boro debido a su amplio campo de aplicaciones; (**ibarra-rodriguezOrganoboronSchiffBases2019**) ya sea en sensores, como en tintas de seguridad, o bien los boron-DIPYrromethene (BO-DIPY) comercialmente disponibles utilizados como agentes para la tinción celular, ER-Tracker™ Green y ER-Tracker™ Red (ver ??).

Los Rotores Moleculares Fluorescentes (*Del inglés Fluorescent Molecular Rotor*) (FMR) son fluoróforos sensibles a la viscosidad que presentan una rotación libre que se vuelven



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

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, ([wuMultistageRotationalSpeed2018](#)) ii. a través del impedimento estérico, ([faulknerAllostericRegulationRotational2016](#)) o iii. por la formación de complejos estables con iones metálicos. ([yadavViscochromicMechanochromicUnsymmetri](#)

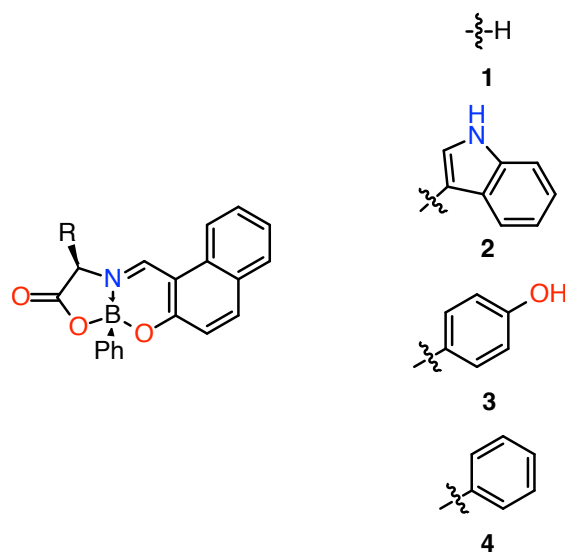
Citar

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 flúorese. 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. ([haidekkerEffectsSolventPolarity2005](#))

Diferentes estrategias para el diseño de FMR se han propuesto para realizar sensores de viscosidad altamente sensibles, por ejemplo, incorporando grupos rotacionales asimétricos, ([leePyrrolicMolecularRotors2016](#)) rotadores con alta capacidad rotacional, ([karpenkoPushPullDioxaborine2016](#)) variación de puentes π -conjugados *push-pull*, ([karpenkoPushPullDioxaborine2016](#)) la aplicación de rotadores di- o trímeros, ([kimballBODIPYBOD](#)) y la introducción de dos rotadores con diferentes capacidades rotacionales y electrondonantes. ([rautTriazinebasedBODIPYTrimer2016](#))

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". ([leeFrontCoverFluorescent2018](#))

En la actualidad existe una amplia variedad de FMR derivados de compuestos de



Scheme 2: Compuestos que se sintetizarán en esta investigación.

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. (karpenkoPushPullDioxaborine2016, guptaBodipyBasedFluorescent2016, liBODIPYBasedTwoPho kimBorondifluorideComplexesHemicurcuminoids2016)

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. (ibarra-rodriguezFluorescentMolecularRotors2017) 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 ??), 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 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

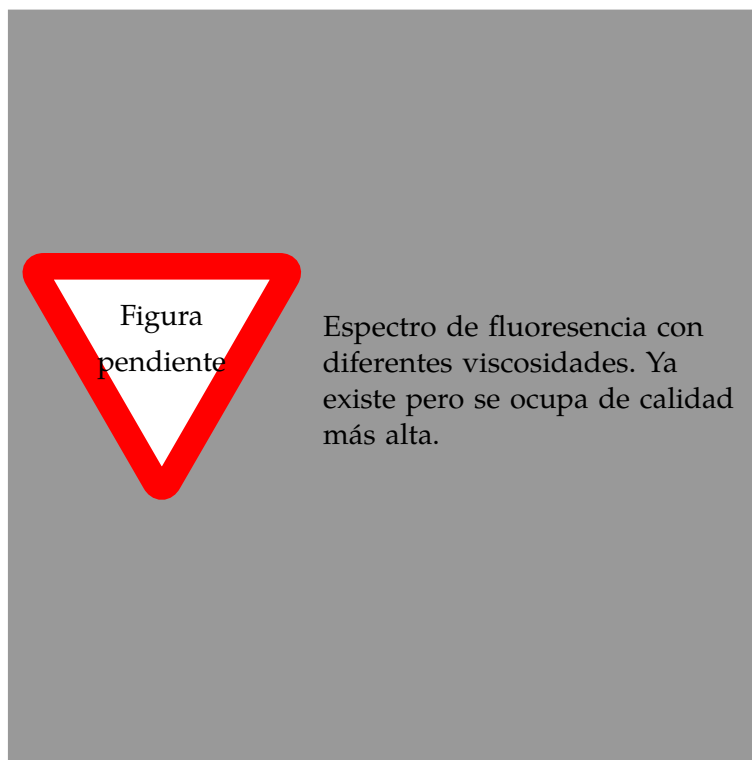


Figura 1: Espectro de fluorescencia del fenilalanina **2** con glicerol en diferentes proporciones. A mayor viscosidad se observa un aumento en la fluorescencia.

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 ??), 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

Conseguir
ESI

Conseguir
ESI

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 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

Isodensity surface plots of the HOMO-LUMO involved in the lowest transition of all compounds are depicted in Figure 4.

poner con comando reactant

En la ?? se muestran los Orbitales Moleculares de Frontera (*del inglés "Frontier Molecular Orbitals"*) (FMO) involucrados para todos los compuestos sintetizados

2. Antecedentes

Hacer!

3. Análisis crítico de los antecedentes

Hacer!

4. Aporte científico

Hacer!

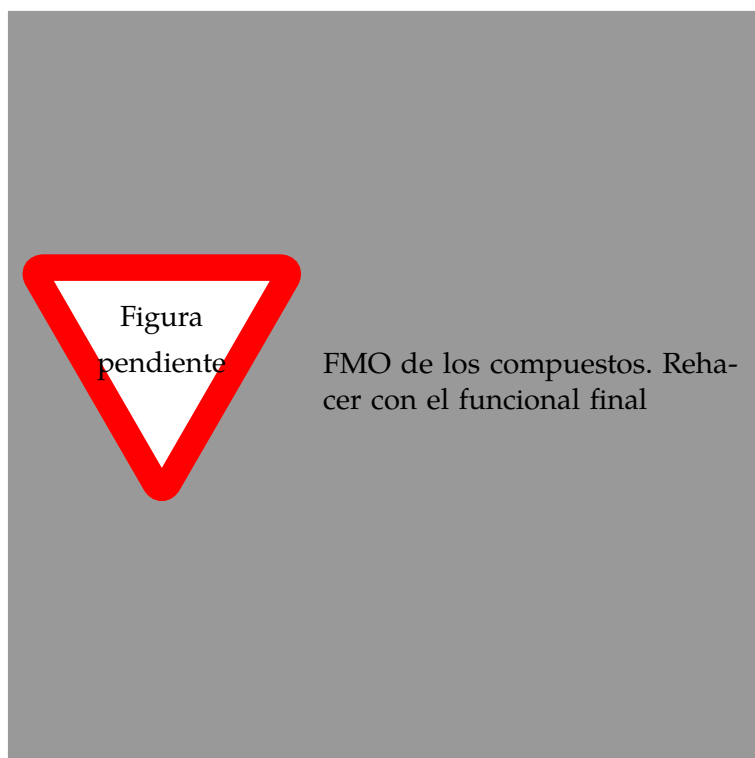


Figura 2: FMO de los compuestos sintetizados

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!

Pendientes