

**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**

**10 de octubre 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 glicina, L-triptófano, L-tirosina y L-fenilalanina. Se caracterizarán por métodos espectroscópicos y 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.

<b>No. de folio</b>	03-97179QMT-23-107
<b>Programa academico</b>	Maestría en Ciencias con orientación en química de los materiales
<b>Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento (LGAC)</b>	Materiales moleculares
<b>Lugar de realización</b>	Facultad de Ciencias Químicas, UANL

Aprueba: \_\_\_\_\_

Dr. Víctor Manuel Jiménez Pérez

Director de tesis

# Índice

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>2</b>
2.1	Análisis crítico de los antecedentes . . . . .	4
<b>3</b>	<b>Aportación científica</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>5</b>
<b>5</b>	<b>Objetivos y metas</b>	<b>5</b>
5.1	Objetivo general . . . . .	5
5.2	Objetivos específicos . . . . .	5
<b>6</b>	<b>Metodología</b>	<b>5</b>
6.1	Materiales . . . . .	5
6.2	Experimental . . . . .	6
6.2.1	Síntesis . . . . .	6
6.2.2	Determinación de propiedades ópticas . . . . .	6
6.2.3	Determinación de citotoxicidad . . . . .	6
6.2.4	Modelado molecular . . . . .	7
6.3	Disposición de residuos . . . . .	7
6.4	Costos . . . . .	8
6.4.1	Materiales . . . . .	8
6.4.2	Reactivos . . . . .	8
6.4.3	Métodos de caracterización . . . . .	8
<b>7</b>	<b>Planificación</b>	<b>10</b>

## Índice de figuras

1	Diagrama de Gantt de la investigación. . . . .	10
---	--	----

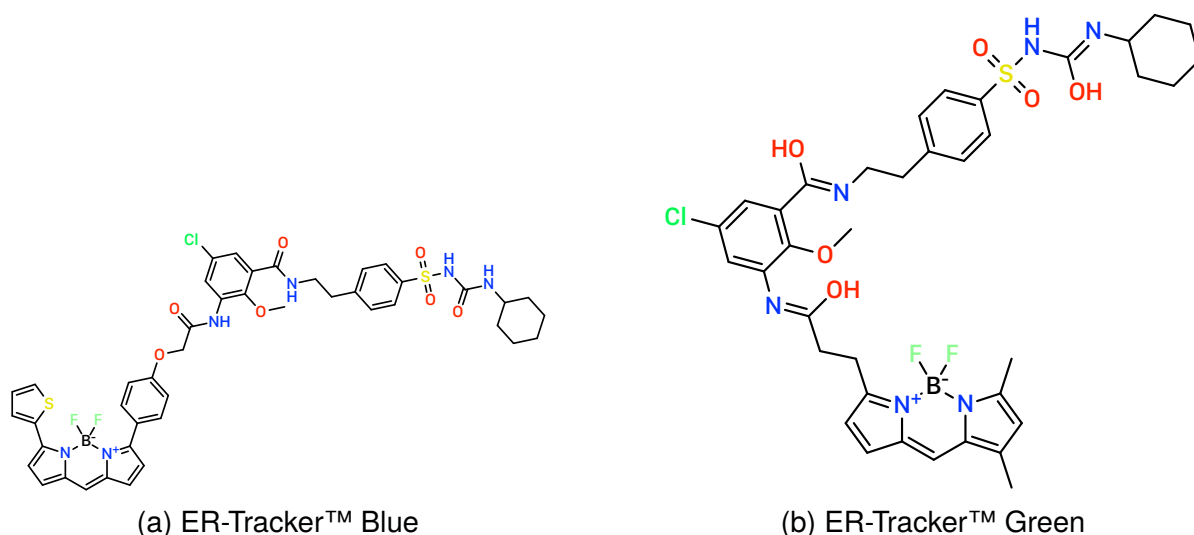
## Índice de tablas

1	Antecedentes de la investigación. . . . .	2
2	Instrumentos de caracterización. . . . .	5

3	Residuos. . . . .	7
4	Costos de los reactivos. . . . .	8
5	Costos de los metodos de cacterización. . . . .	9

## List of Schemes

1	ER-Trackers™ . . . . .	1
2	Compuestos que se sintetizarán en esta investigación. . . . .	3



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

## 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 Rotadores 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)

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.(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  $\pi$ -conjugados *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 tñido atribuido principalmente a la baja solubilidad de los compuestos.

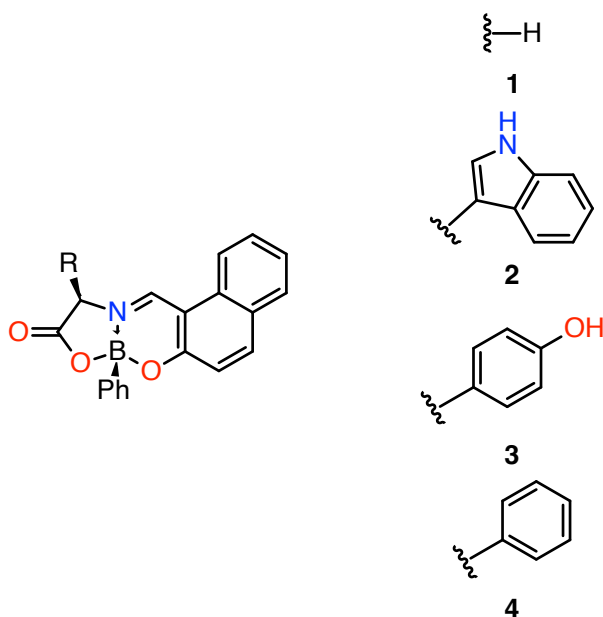
Para lograr mejorar el contraste de fluorescencia y la bioimagen celular, se diseñó una serie de BOSCHIBA derivados de aminoácidos (ver esquema 2), donde las moléculas presentan rotación libre a través del anillo fenilborónico, y el aminoácido podría dar una mayor compatibilidad y solubilidad en medios 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 moléculas similares reportadas en la literatura.

## 2. Antecedentes

Tabla 1: Antecedentes de la investigación.

Investigación	Aportación(es)	Referencia
---------------	----------------	------------

Continued on next page



Scheme 2: Compuestos que se sintetizarán en esta investigación.

Tabla 1: Antecedentes de la investigación. (Continued)

«Organotin Schiff Bases as Halofluorochromic Dyes: Green Synthesis, Chemio-Photophysical Characterization, DFT, and Their Fluorescent Bioimaging <i>in Vitro</i> »	Síntesis por MW de BOSCHIBA con Sn	(15)
«New Luminescent Organoboron Esters Based on Damnacanthal: One-Pot Multicomponent Synthesis, Optical Behavior, Cytotoxicity, and Selectivity Studies against MDA-MBA-231 Breast Cancer Cells»	Síntesis de BOSCHIBA por reacción <i>one-pot</i> multicomponente (3-MCR)	(16)
«Far-Red and Near-Infrared Boron Schiff Bases (BOSCHIBAs) Dyes Bearing Anionic Boron Clusters»	Síntesis de BOSCHIBA con clusters de boro	(17)
«Organoboron Schiff Bases as Cell-Staining Fluorescent Probes: Synthesis, Chemio-photophysical Characterization, DFT, and X-ray Structures: BOSCHIBAs, Low Cytotoxicity, High Photostability, Bioimaging»	Síntesis de BOSCHIBA y su uso como sondas fluorescentes	(1)
«One-Pot Microwave-Assisted Synthesis of Organotin Schiff Bases: An Optical and Electrochemical Study towards Their Effects in Organic Solar Cells»	Síntesis <i>one-pot</i> de BOSCHIBA	(18)
«Synthesis, Characterization, Photophysical Properties of New Fluorescent Boron Schiff Bases (BOSCHIBAs) and Their Application as Cytoplasm Staining Dyes <i>in Vitro</i> »	Síntesis de BOSCHIBA y su aplicación para teñir citoplasma	(19)

## 2.1. Análisis crítico de los antecedentes

Ibarra-Rodríguez *et al.* (1) investigaron la aplicación de BOSCHIBA en fluorescencia y bioimagen celular. Por su respuesta a la viscosidad, resultante en un aumento en el rendimiento cuántico, se propuso su uso para detección de células cancerígenas. Los autores mencionan que es importante para diseñar marcadores citoplasmáticos que sean fluorescentes, con propiedades fotofísicas adecuadas, fotoestables, con baja citotoxicidad y solubles en solventes polares para ser usados en biología celular moderna *in vitro* y *in vivo*; en esta investigación se lograron teñir las células cancerígenas B16F10, sin embargo, el teñido del citoplasma fue bajo, atribuido principalmente a la baja solubilidad de los compuestos; por lo que en esta investigación se propone la síntesis de BOSCHIBA derivada de aminoácidos, con el fin de mejorar la solubilidad de los compuestos y lograr un mejor teñido del citoplasma.

Corona-López *et al.* (17) propone la preparación de BOSCHIBA a partir de la condensación de 2-Hidroxi-1-naftaldehído **1** con la amina correspondiente; en esta investigación obtuvieron buenos rendimientos (85 %–90 %), sin embargo el tiempo de reacción fue de 48 h, por lo que llevar a cabo esta síntesis por medio de MW en lugar de por reflujo convencional podría resultar en un menor tiempo de reacción.

El estudio realizado por García-López *et al.* (16) detalla la síntesis de BOSCHIBA tetracoordinados vía una reacción de condensación de tres componentes con rendimientos elevados 80 %–90 % en un tiempo de reacción de 20 min.

En una investigación donde se preparan bases de Schiff basadas en Sn realizada por López-Espejel *et al.* (15) se conduce la reacción por medios convencionales de calentamiento y por MW; el tiempo de reacción se vio drásticamente reducido, de 24 h a 3 min, y los rendimientos mejoraron. En este estudio también se evaluó el uso de bases de Schiff basadas en Sn como agentes de tinción celular y se encontró que tienen baja citotoxicidad y buena capacidad de tinción.

## 3. Aportación científica

Plantear una metodología para la síntesis de compuestos de boro fluorescentes, con un alto rendimiento cuántico y un alto contraste de fluorescencia en medios de alta viscosidad, a partir de aminoácidos, así como su aplicación en la bioimagen de células. También se realizarán estudios *in silico* para determinar las propiedades fotofísicas de los compuestos.



## 4. Hipótesis

La incorporación de aminoácidos en la estructura de los BOSCHIBA logrará una mejor penetración de las membranas celulares, además de que se espera que los compuestos presenten un alto rendimiento cuántico y un alto contraste de fluorescencia en medios de alta viscosidad.

## 5. Objetivos y metas

### 5.1. Objetivo general

Realizar la síntesis de una serie de BOSCHIBA con su posible aplicación en tinción celular y estudiar sus propiedades fotofísicas por medio de cálculos *in silico*.

### 5.2. Objetivos específicos

- **Sintetizar** una serie de BOSCHIBA derivadas de L-triptófano **2**, L-fenilalanina **3**, L-tirosina **4** y glicina **5**;
- **Elucidar** los mecanismos involucrados en el efecto supresor de la luminiscencia en BO-Trp **6**;
- **Caracterizar** los compuestos por métodos espectroscópicos;

## 6. Metodología

### 6.1. Materiales

Tabla 2: Equipos que se utilizarán para la caracterización de los compuestos de esta investigación.

Instrumento	Marca y modelo	Locación
-------------	----------------	----------

Continued on next page

Tabla 2: Equipos que se utilizarán para la caracterización de los compuestos de esta investigación. (Continued)

Espectrofotómetro	Perkin-Elmer, Lambda 365	FCQ
Espectrofluorímetro	Horriba Scientificm, Fluorolog-3	FCQ
Sistema LC/MS/MS	EMAR, AB Sciex API 2000	CINVESTAV—IPN (DF)
Difractómetro de rayos X	Bruker, SMART APEX CCD	CINVESTAV—IPN (DF)
NMR ( $^1\text{H}$ -NMR, $^{11}\text{B}$ -NMR, $^{13}\text{C}$ -NMR)	Bruker, Avance DPX 400	Facultad de Medicina, UANL
Microscopio confocal	—	Facultad de Biología, UANL

## 6.2. Experimental

### 6.2.1. Síntesis

Se llevará a cabo la síntesis de los compuestos **1-4** (ver esquema 2) utilizando condiciones de reacción ecológicas y materiales de partida accesibles. Se optimizarán los parámetros de reacción para obtener rendimientos elevados y selectividad adecuada.

### 6.2.2. Determinación de propiedades ópticas

Se determinará el rendimiento cuántico de los compuestos **1-4**, así como su contraste de fluorescencia en medios de viscosidad variable.

### 6.2.3. Determinación de citotoxicidad

Se determinará la citotoxicidad de los compuestos **1-4** en la línea celular de melanoma murino *B16F10* (ATCC® CCL-6475™) derivado de ratón C57BL/6J.

#### 6.2.4. Modelado molecular

Se realizarán cálculos *in silico* por medio de DFT y 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.

**6.2.4.1. Preoptimización** En caso de no contar con datos cristalográficos en el momento del estudio *in silico*, se hará una búsqueda conformacional con ayuda del programa *Conformer-Rotamer Ensemble Sampling Tool* (CREST) (20) para obtener los conformeros más estables de los compuestos.

En caso de que se cuenten con datos cristalográficos, se utilizarán las coordenadas de la estructura cristalográfica para realizar la optimización geométrica en DFT.

**6.2.4.2. Optimización geométrica** Se hará la optimización geométrica de los compuestos **1-4** empleando el funcional meta-GGA  $r^2$ SCAN-3c<sup>1</sup> (21) hasta llegar a un nivel de teoría de DFT/def2-TZVP, o superior en caso de que sea necesario.

**6.2.4.3. Obtención de espectro de emisión** Se obtendrá el espectro de emisión de los compuestos **1-4** por medio de cálculos TDDFT con el funcional  $\omega$ B97X-V y con el fin de aproximarse al límite CBS, se requiere de aumentación con funciones difusas dobles, por lo que se usará el conjunto de funciones base def2-TZVPD o def2-QZVPPD si es necesario obtener estados de Rydberg.

### 6.3. Disposición de residuos

Tabla 3: Residuos que se generarán derivados de esta investigación.

Residuo	Tipo	Disposición
MeOH, hexano	Solventes orgánicos	C

Continued on next page

<sup>1</sup> La selección de este funcional para la optimización geométrica se debe a su desempeño comparable o superior con funcionales híbridos meta-GGA como M06-2X-D3(0)/TZP que costarían más tiempo de cómputo, así como su inclusión de correcciones relativistas como ECP y corrección para dispersión y su buen desempeño con el *benchmark* LMGB35 (Enlaces ligeros del grupo principal) y ROT34 (constantes rotacionales de moléculas orgánicas pequeñas)

Tabla 3: Residuos que se generarán derivados de esta investigación. (Continued)

DCM, Cloroformo	Solventes orgánicos halogenados	C
Sales inorgánicas	Sales	A

## 6.4. Costos

Se estima un costo aproximado de 70 000.00 MXN para la realización de esta investigación, el cual se desglosa en las cuadros 4 y 5.

### 6.4.1. Materiales

El costo de los materiales para la preparación de las muestras y para el estudio *in silico* no se incluye en el costo total de la investigación, ya que estos se encuentran disponibles en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL y en el CINVESTAV.

### 6.4.2. Reactivos

Todos los reactivos en la cuadro 4 se adquirirán en la empresa Merck KGaA.

Tabla 4: Costos de los reactivos. (*Costos aproximados*)

Reactivo	CAS	Cantidad	Costo total (MXN)
L-triptófano <b>2</b>	73-22-3	25 g	1017.00
L-fenilalanina <b>3</b>	63-91-2	25 g	971.00
L-tirosina <b>4</b>	60-18-4	50 g	2223.00
glicina <b>5</b>	56-40-6	500 g	764.00
ácido fenil borínico <b>7</b>	98-80-6	50 g	2359.00
2-Hidroxi-1-naftaldehído <b>1</b>	708-06-5	100 g	1769.00
<b>Total</b>			9093.00

### 6.4.3. Métodos de caracterización

Tabla 5: Costos de los metodos de cacterización. (*Costos aproximados*)

<b>Análisis</b>	<b>Muestras</b>	<b>Costo unitario (MXN)</b>	<b>Costo total (MXN)</b>
XRD	4	800.00	3200.00
NMR	4	2250.00	9000.00
FTIR	4	700.00	2800.00
UV-Vis	4	500.00	2000.00
LC/MC/MS	4	800.00	3200.00
Espectrofluorímetro	4	500.00	2000.00
<b>Total</b>			22 200.00

## Glosario

**BODIPY** BORon-DIPYrrromethene. 1, 2

**BOSCHIBA** Bases de Schiff de Boro (*del inglés "Boron Schiff Bases"*). 1, 2–5

**CREST** *Conformer-Rotamer Ensemble Sampling Tool*. 7

**DFT** Teoría del funcional de la densidad (*del inglés "Density Functional Theory"*). 1, 7

**FMR** Rotores Moleculares Fluorescentes (*Del inglés Flurescent Molecular Rotor*). 1, 2

**LE** Local Excitado (*del inglés "locally exited"*). 1

**NMR** Resonancia Magnética Nuclear (*del inglés "Nuclear Magnetic Resonance"*). 6

**TDDFT** Teoría del funcional de la densidad tiempo-dependiente (*del inglés "Time-Dependant Density Functional Theory"*). 1, 7

**TICT** transferencia de carga intramolecular retorcida (*del inglés "twisted intramolecular charge transfer"*). 1

## 7. Planificación

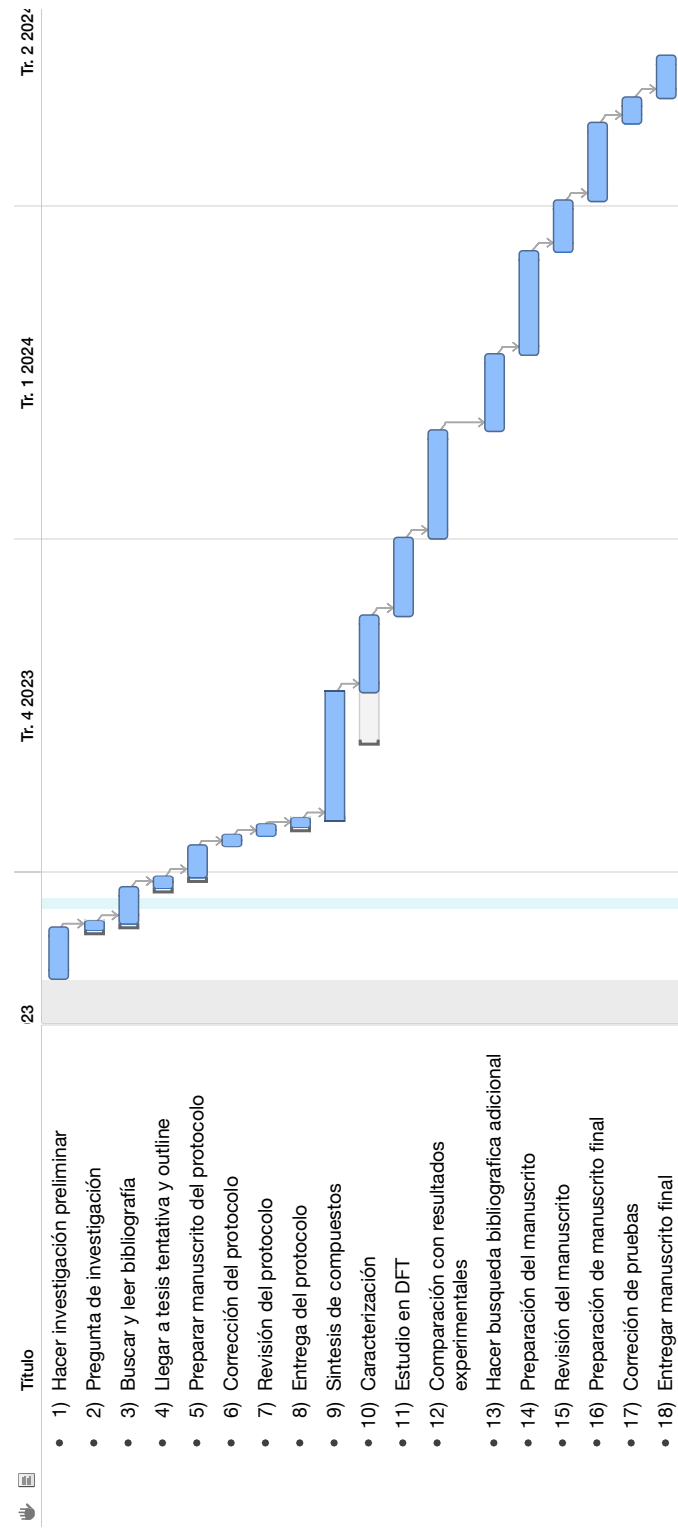


Figura 1: Diagrama de Gantt de la investigación.

## 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).
15. M. López-Espejel *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* **9**, 7698-7712, ISSN: 2050-750X, 2050-7518 (2021).
16. M. C. García-López *et al.*, *New Journal of Chemistry* **46**, 20138-20145, ISSN: 1144-0546, 1369-9261 (2022).
17. M. M. Corona-López, B. M. Muñoz-Flores, M. Chaari, R. Nuñez y V. M. Jiménez-Pérez, *European Journal of Inorganic Chemistry* **2021**, 2047-2054, ISSN: 1434-1948, 1099-0682 (7 de jun. de 2021).

18. A. M. Cantón-Díaz *et al.*, *New Journal of Chemistry* **42**, 14586-14596, ISSN: 1144-0546, 1369-9261 (2018).
19. M. M. Corona-López *et al.*, *Journal of Organometallic Chemistry* **852**, 64-73, ISSN: 0022328X (dic. de 2017).
20. P. Pracht, F. Bohle y S. Grimme, *Physical Chemistry Chemical Physics* **22**, 7169-7192, ISSN: 1463-9076, 1463-9084 (2020).
21. T. Gasevic, J. B. Stückrath, S. Grimme y M. Bursch, *The Journal of Physical Chemistry A* **126**, 3826-3838, ISSN: 1089-5639, 1520-5215 (16 de jun. de 2022).

## Pendientes

 Citar . . . . .	1
---	---