# 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 12 de octubre de 2023

Universidad Autónoma de Nuevo León, División de Posgrado

**No. de folio** 03-97179QMT-23-107

Maestría en Ciencias con orientación en química de los materiales

**Programa academico**

### Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento (LGAC)

Materiales moleculares

**Lugar de realización** Facultad de Ciencias Químicas, UANL

González

Dr. Víctor Manuel Jiménez Pérez LQI. Pablo Ernesto Alanis Director de tesis Autor

**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 invo- lucrados en el efecto supresor de la luminiscencia en dichos compuestos así como estudios de topológicos sobre los mismos. A su vez, se realizarán estudios de citotoxicidad y tinción *in vitro* para determinar su actividad biológica de los compuestos.

# Índice

1. [Introducción 1](#_TOC_250020)
2. [Antecedentes 3](#_TOC_250019)
   1. [Análisis crítico de los antecedentes 4](#_TOC_250018)
3. [Aportación científica 5](#_TOC_250017)
4. [Hipótesis 5](#_TOC_250016)
5. [Objetivos y metas 5](#_TOC_250015)
   1. [Objetivo general 5](#_TOC_250014)
   2. [Objetivos específicos 5](#_TOC_250013)
6. [Metodología 6](#_TOC_250012)
   1. [Materiales 6](#_TOC_250011)
   2. [Experimental 6](#_TOC_250010)
      1. [Síntesis 6](#_TOC_250009)
      2. [Determinación de propiedades ópticas 7](#_TOC_250008)
      3. [Determinación de citotoxicidad 7](#_TOC_250007)
      4. [Modelado molecular 7](#_TOC_250006)
   3. [Disposición de resiudos 8](#_TOC_250005)
   4. [Costos 8](#_TOC_250004)
      1. [Materiales 8](#_TOC_250003)
      2. [Reactivos 9](#_TOC_250002)
      3. [Métodos de caracterización 10](#_TOC_250001)
7. [Planificación 10](#_TOC_250000)

Índice de figuras

1. Diagrama de Gantt de la investigación. 10

Índice de tablas

1. Antecedentes de la investigación. 3
2. Instrumentos de caracterización. 6
3. Residuos. 8
4. Costos de los reactivos. 9
5. Costos de los metodos de cacterización. 10

**Índice de esquemas**

1. ER-Trackers™ 1
2. Compuestos que se sintetizarán en esta investigación. 3
3. Síntesis de las BOSCHIBA por MW 7

# 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).

Cl O O H

O

NH

O

O

S

F F

N B- N+

S O

H

N N N

H

O

H N

N

O

SO OH

HO

N

O

N OH

F F N+ B- N

Cl

(a) ER-Tracker™ Blue (b) ER-Tracker™ Green

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

Los Rotores Moleculares Fluorescentes *(Del inglés Flurescent 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 polaridad 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 ”twsited 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 exited”)* (LE), el cual fluórese. El efecto que tiene la polaridad 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 senso- res de viscosidad altamente sensibles, por ejemplo, incorporando grupos rotacionales asimétricos,(*6*) usando grupos con alta capacidad para rotar,(*7*) variación de puen- tes π-conjugados tipo *push-pull*,(*7*) la aplicación de rotadores di- o trímeros,(*8*) y la introducción de dos rotadores distintos 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 BOSCHI- BA 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 sintetizarán por una reacción multi- componente en Microondas *(del inglés ”Microwave”)* (MW) con el obejtivo de tener altos rendimientos químicos en un tiempo de reacción corto. Este método resulta más eficiente y rápido en comparación con BOSCHIBA similares reportadas en la literatura sintetizados por métodos convencionales.

H

**1**

H

N

**2**

O

R

N

O B O

OH

Ph

**3**

**4**

Esquema 2: Compuestos que se sintetizarán en esta investigación.

# Antecedentes

Tabla 1: Antecedentes de la investigación.

**Investigación Aportación(es) Referencia**

«Organotin Schiff Bases as Halofluorochromic

Dyes: Green Synthesis, Chemio-Photophysical Characterization, DFT, and Their Fluorescent Bioimaging *in Vitro*»

«New Luminescent Organoboron Esters Based on Damnacanthal: One-Pot Multicomponent Synthesis, Optical Behavior, Cytotoxicity, and Selectivity Studies against MDA-MBA-231 Breast Cancer Cells»

«Far‐Red and Near‐Infrared Boron Schiff Bases (BOSCHIBAs) Dyes Bearing Anionic Boron Clusters»

«Organoboron Schiff Bases as Cell-Staining Fluorescent Probes: Synthesis,

Chemio-photophysical Characterization, DFT, and X-ray Structures: BOSCHIBAs, Low Cytotoxicity, High Photostability, Bioimaging»

Sintesis por MW de BOSCHIBA con Sn (*15*)

Síntesis de BOSCHIBA por reacción *one-pot*

(*16*)

multicomponente (3-MCR)

Síntesis de BOSCHIBA con clusters de boro (*17*)

Síntesis de BOSCHIBA y su uso como sondas fluorescentes

(*1*)

*Continúa en la siguiente página*

Tabla 1: Antecedentes de la investigación. *(Continuación)*

«One-Pot Microwave-Assisted Synthesis of

Organotin Schiff Bases: An Optical and Electrochemical Study towards Their Effects in Organic Solar Cells»

«Synthesis, Characterization, Photophysical

Sintesis *one-pot* de BOSCHIBA (*18*)

Properties of New Fluorescent Boron Schiff Bases (BOSCHIBAs) and Their Application as Cytoplasm Staining Dyes in Vitro»

Síntesis de BOSCHIBA y su aplicación para teñir citoplasma

(*19*)

## Análisis crítico de los antecedentes

En la investigación conduicida por Corona-López *et al.* (*19*) se detalla la preparación de BOSCHIBA y su potencial aplicación como agente de tinción citoplasmatica *in vitro*; en esta ivestigación se sintetizó el producto por una reacción de condensación entre 2-hidroxi-1-etil naftaldehido con derivados de anilina. Se encontró en este proyecto que al incorporar sustituyentes voluminosos, mejoraba la estabilidad de las BOSCHIBA.

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 mo- derna *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-naftaldehido **1** con la amina correspondiente; en esta investigación obtuvieron buenos rendimientos (85 % a 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 BOSCHI- BA tetracoordinados vía una reacción de condensación de tres componentes con rendimientos elevados 80 % a 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.

# Aportación científica

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

# 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.

# Objetivos y metas

## 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*.

## 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;

# Metodología

## Materiales

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

### Instrumento Marca y modelo Locación

Espectrofotómetro Perkin-Elmer, Espectrofluorímetro Horriba Scientificm, Sistema LC/MS/MS EMAR,

Lambda 365

Fluorolog-3

AB Sciex API 2000

Bruker,

Difractómetro de rayos X SMART APEX CCD

NMR (1H-NMR, 11B-NMR, 13C-NMR) Bruker,

Avance DPX 400

FCQ

FCQ

CINVESTAV—IPN (DF)

CINVESTAV—IPN (DF)

Facultad de Medicina, UANL

Microscopio confocal — Facultad de

Biología, UANL

## Experimental

### Síntesis

Se llevará a cabo la síntesis de los compuestos **1-4** (ver esquemas 2 y 3) utilizando condiciones de reacción ecológicas y materiales de partida accesibles. Se optimiza- rán los parámetros de reacción para obtener rendimientos elevados y selectividad adecuada.

O

H

+

HO

HO2C

R

NH2

HO OH B

+

MW MeCN

180 ºC, 20 min

R

N

O B O

Ph



-2 H2O O

2-hidroxi-1- naftaldehido

aminoácido ácido fenilborónico

Esquema 3: Método de síntesis para las BOSCHIBA **1-4** por MW.

### 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.

### Determinación de citotoxicidad

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

### Modelado molecular

Se realizarán cálculos *in silico* por medio de DFT y TDDFT para estudiar las propie- dades 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.

* + - 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.

* + - 1. **Optimización geométrica** Se hará la optimización geométrica de los compuestos **1-4** empleando el funcional meta-GGA r2SCAN-3c1 (*21*) hasta llegar a un

1La 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

nivel de teoría de DFT/def2-TZVP, o superior en caso de que sea necesario.

* + - 1. **Obtención de espectro de emisión** Se obtendrá el espectro de emisión de los compuestos **1-4** por medio de cálculos TDDFT con el funcional ωB97X-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.

## Disposición de resiudos

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

### Resiudo Tipo Disposición

MeOH, hexano Solventes orgánicos C

DCM, Cloroformo Solventes orgánicos C

halogenados

Sales inorgánicas Sales A

## 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.

### 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.

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)

### 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 **2** | 73-22-3 | 25 g | 1017.00 |
| l-fenilalanina **3** | 63-91-2 | 25 g | 971.00 |
| l-tirosina **4** | 60-18-4 | 50 g | 2223.00 |
| glicina **5** | 56-40-6 | 500 g | 764.00 |
| ácido fenil borinico **7** | 98-80-6 | 50 g | 2359.00 |
| 2-Hidroxi-1- | 708-06-5 | 100 g | 1769.00 |

naftaldehido **1**

**Total** 9093.00

### Métodos de caracterización

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Análisis** | Muestras **Costo unitario Costo total (MXN) (MXN)** | | |
| 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 |
| **Total** |  |  | 22 200.00 |

# Planificación



Tr. 2 202

Título

1. Hacer investigación preliminar
2. Pregunta de investigación
3. Buscar y leer bibliografía
4. Llegar a tesis tentativa y outline
5. Preparar manuscrito del protocolo
6. Corrección del protocolo
7. Revisión del protocolo
8. Entrega del protocolo
9. Sintesis de compuestos
10. Caracterización
11. Estudio en DFT
12. Comparación con resultados experimentales
13. Hacer busqueda bibliografica adicional
14. Preparación del manuscrito
15. Revisión del manuscrito
16. Preparación de manuscrito final
17. Correción de pruebas
18. Entregar manuscrito final

23

Tr. 4 2023

Tr. 1 2024

Figura 1: Diagrama de Gantt de la investigación.

# Glosario

**BODIPY** boron-dipyrromethene. 1, 2

**BOSCHIBA** Bases de Schiff de Boro *(del inglés ”Boron Schiff Bases”)*. ii, 2–5, 7

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

**DFT** Teoría del funcional de la densidad *(del inglés ”Density Functional Theory”)*. ii, 7 **FMR** Rotores Moleculares Fluorescentes *(Del inglés Flurescent Molecular Rotor)*. 1, 2 **LE** Local Excitado *(del inglés ”locally exited”)*. 1

**MW** Microondas *(del inglés ”Microwave”)*. 2–4, 7

**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”)*. ii, 7, 8

**TICT** transferencia de carga intramolecular retorcida *(del inglés ”twsited intramolecular charge transfer”)*. 1

# 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).

1. 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).

1. R. Yadav *et al.*, *New Journal of Chemistry* **43**, 7109-7119, issn: 1144-0546,

1369-9261 (2019).

1. M. Haidekker, T. Brady, D. Lichlyter y E. Theodorakis, *Bioorganic Chemistry* **33**, 415-425, issn: 00452068 (dic. de 2005).
2. S.-C. Lee *et al.*, *Chemical Communications* **52**, 13695-13698, issn: 1359-7345,

1364-548X (2016).

1. J. Karpenko *et al.*, *Journal of Materials Chemistry C* **4**, 3002-3009, issn: 2050- 7526, 2050-7534 (2016).
2. J. D. Kimball *et al.*, *RSC Advances* **5**, 19508-19511, issn: 2046-2069 (2015).
3. S. L. Raut *et al.*, *Physical Chemistry Chemical Physics* **18**, 4535-4540, issn: 1463-9076, 1463-9084 (2016).
4. S.-C. Lee *et al.*, *Chemistry – A European Journal* **24**, 13688-13688, issn: 0947- 6539, 1521-3765 (18 de sep. de 2018).
5. N. Gupta *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* **4**, 1968-1977, issn: 2050-750X, 2050-7518 (2016).
6. L.-L. Li *et al.*, *Analytical Chemistry* **90**, 5873-5878, issn: 0003-2700, 1520-6882

(1 de mayo de 2018).

1. E. Kim *et al.*, *Organic & Biomolecular Chemistry* **14**, 1311-1324, issn: 1477-0520,

1477-0539 (2016).

1. M. Ibarra-Rodríguez *et al.*, *The Journal of Organic Chemistry* **82**, 2375-2385, issn: 0022-3263, 1520-6904 (3 de mar. de 2017).
2. M. López-Espejel *et al.*, *Journal of Materials Chemistry B* **9**, 7698-7712, issn: 2050-750X, 2050-7518 (2021).
3. M. C. García-López *et al.*, *New Journal of Chemistry* **46**, 20138-20145, issn: 1144-0546, 1369-9261 (2022).
4. M. M. Corona‐López, B. M. Muñoz‐Flores, M. Chaari, R. Nuñez y V. M. Jimé- nez‐Pérez, *European Journal of Inorganic Chemistry* **2021**, 2047-2054, issn: 1434-1948, 1099-0682 (7 de jun. de 2021).
5. A. M. Cantón-Díaz *et al.*, *New Journal of Chemistry* **42**, 14586-14596, issn: 1144-0546, 1369-9261 (2018).
6. M. M. Corona-López *et al.*, *Journal of Organometallic Chemistry* **852**, 64-73, issn: 0022328X (dic. de 2017).
7. P. Pracht, F. Bohle y S. Grimme, *Physical Chemistry Chemical Physics* **22**, 7169-7192, issn: 1463-9076, 1463-9084 (2020).
8. 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).