

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***SÍNTESIS, FOTOQUÍMICA Y FOTOFÍSICA DE UNA  
SONDA FLUORESCENTE PARA LA DETECCIÓN  
DE OXÍGENO MOLECULAR SINGULETE EN  
MITOCONDRIAS***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magister en Química**

**Memoria para optar al Título de Química por:**

**CATALINA ANDREA CORTÉS GUAJARDO**

**Director de Tesis: Dr. Antonio Zanocco Loyola**

**Santiago-CHILE**

**Marzo 2020**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

**CATALINA ANDREA CORTÉS GUAJARDO**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química y Título de Química, en el examen público rendido el día 27 de Marzo del 2020.

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Antonio Zanocco Loyola**

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. German Gunther Sapunar**

**Dra. Nancy Pizarro Urzúa**

**Dr. Javier Romero Parra**

*A la familia  
de todas las formas y tamaños  
la manada que caza junta  
y comparte la merienda.  
La que te empuja al barranco  
esperando que sobrevivas.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al profesor Antonio por aceptarme trabajar con él y ayudar a forjar mi carácter.

Al profesor Germán por realizar los experimentos de fluorescencia bifotónica, y por supuesto, gracias por mantener siempre las puertas abiertas para quien lo necesite.

A la profesora Else, quien me compartió pequeñas ideas que retumbaron fuerte en mi cabeza.

A los profesores Marco Tulio Núñez y Alejandro Roth, por su tiempo y voluntad para poder realizar los experimentos en microscopía.

A Renzo, por ser Renzo. Gracias por creer en mis capacidades y ayudarme a cultivarlas.

A Christian Silva, por ese entusiasmo intrínseco hacia la formación de comunidad. Entre los tres, junto a Beto, nos salvamos incontables veces del abismo.

A todas las personas del Laboratorio de Biodinámica, en especial a los Brucepticons, quienes me acogieron y siempre me hicieron sentir en casa. Al Dr. Cristian Suarez, quien me facilitó todo lo necesario para poder sintetizar mi sonda fluorescente, y al profesor Bruce Cassels por aceptarme con los brazos abiertos en el laboratorio.

Agradezco enormemente a la Liga de los Reprobados. Sin querer, formamos una robusta y linda comunidad.

Agradecer a todas mis amigas y amigos quienes me entregaron una palabra de aliento para seguir adelante, recordándome que sí se podía. En especial a mi mejor amiga Karina Gaete, la eterna compañera, de principio a fin.

A Darío Martínez Afani, quién fue, y sigue siendo, una persona con incansable búsqueda de respuestas. Quiero agradecer tu ayuda durante todo el proceso de tesis, con énfasis en el diseño y desarrollo sintético. Somos afortunados de nuestras contradicciones. Te amo profundamente, científico loco.

Por último, a la gran familia que tengo. A todos y cada uno de ellos, gracias por nunca irse. Desde los más pequeños a los más experimentados, de todos he aprendido a perseverar y disfrutar la vida. Los amo con todo el corazón.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ÍNDICE DE IMÁGENES .....	IV
ÍNDICE DE ESQUEMAS .....	IV
RESUMEN .....	V
SUMMARY .....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Oxígeno molecular singulete.....	1
1.2. Propiedades del $^1\text{O}_2$ .....	1
1.2.1. Configuración electrónica .....	1
1.2.2. Mecanismos de desactivación.....	3
1.2.3. Reactividad.....	4
1.3. Importancia del $^1\text{O}_2$ en sistemas biológicos .....	6
1.4. Generación de $^1\text{O}_2$ .....	6
1.5. Detección y cuantificación de $^1\text{O}_2$ .....	10
1.6. Sondas fluorescentes de $^1\text{O}_2$ .....	11
1.6.1. Transferencia de Electrones Fotoinducida (PET).....	11
1.6.2. Transferencia de Energía Intramolecular (IET).....	14
1.6.3. Transferencia de Carga Intramolecular (ICT) .....	16
1.6.4. Sondas fluorescentes del tipo Furilvinilnaftoxazol (FN) .....	17
1.7. Detección de $^1\text{O}_2$ en células.....	18
2. HIPÓTESIS .....	20
3. OBJETIVOS .....	20
3.1. Objetivo general .....	20
3.2. Objetivos específicos .....	20
4. MATERIALES Y REACTIVOS.....	21
5. INSTRUMENTACIÓN.....	22
5.1. Absorción Ultravioleta-Visible.....	22
5.2. Espectros de emisión .....	22
5.3. Mediciones resueltas en el tiempo .....	22
5.4. Sistema de fotólisis .....	23
5.5. Resonancia Magnética de Protones.....	23
5.6. Microscopía .....	23
5.7. Espectros de fluorescencia bifotónica .....	23
6. METODOLOGÍAS .....	24
6.1. Espectros de absorción y coeficientes de absortividad molar .....	24

6.2.	Espectros de emisión y rendimientos cuánticos de fluorescencia.....	24
6.3.	Análisis multiparamétrico de los desplazamientos de la fluorescencia ....	25
6.4.	Cinéticas de consumo en presencia de $^1\text{O}_2$ .....	25
6.5.	Obtención de las constantes de desactivación de $^1\text{O}_2$ .....	26
6.6.	Experimentos en células .....	27
6.7.	Microscopía.....	28
6.8.	Síntesis .....	28
6.8.1.	Síntesis de ( <i>E</i> )-2-(2-(5-hidroximetil-fur-2-il)vinil)nafto[1,2-d]oxazol (FN-11) .....	29
6.8.2.	Síntesis de ( <i>E</i> )-(5-(2-(nafto[1,2-d]oxazol-2-il)vinil)furan-2-il)2-bromoacetato de metilo (C) .....	29
6.8.3.	Síntesis de bromuro de ( <i>E</i> )-(2-((5-(2-(nafto[1,2-d]oxazol-2-il)vinil)furan-2-il)metoxi)-2-oxoetil)trifenilfosfonio (FN-12).....	30
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
7.1.	Caracterización fotofísica y fotoquímica .....	32
7.1.1.	Espectros de absorción .....	32
7.1.2.	Coeficiente de absortividad molar .....	33
7.1.3.	Espectros de emisión .....	34
7.1.4.	Análisis multiparamétrico de los desplazamientos de la fluorescencia..	35
7.1.5.	Rendimiento cuántico de fluorescencia .....	36
7.2.	Reactividad de FN-12 frente a $^1\text{O}_2$ .....	37
7.2.1.	Métodos estacionarios.....	37
7.2.1.1.	Fotosensibilización con NMB .....	37
7.2.1.2.	Fotosensibilización con RoBen.....	37
7.2.2.	Métodos resueltos en el tiempo.....	42
7.2.2.1.	Fotosensibilización con NMB.....	42
7.2.2.2.	Fotosensibilización con RoBen.....	42
7.3.	Selectividad frente a otras ROS .....	48
7.4.	Autosensibilización de $^1\text{O}_2$ .....	48
7.5.	Microscopía de fluorescencia .....	49
7.6.	Espectroscopía de fluorescencia bifotónica .....	52
8.	CONCLUSIONES .....	56
	REFERENCIAS .....	57
	ANEXOS .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Curva de energía potencial de los estados electrónicos del oxígeno molecular.....	2
<b>Figura 2:</b> Ocupación de los orbitales moleculares de los diferentes estados electrónicos del oxígeno molecular. ....	2
<b>Figura 3:</b> Generación fotosensibilizada de $^1\text{O}_2$ .....	8
<b>Figura 4:</b> Estructura molecular de NMB (izquierda) y RoBen (derecha).....	9
<b>Figura 5:</b> Mecanismo del tipo FRET. El donador excitado (D) transfiere su energía mediante un proceso no radiativo al aceptor cercano (A). ....	15
<b>Figura 6:</b> Estructura química de (a) MTTA-Eu <sup>+3</sup> , (b) MTDTA-Eu <sup>+3</sup> y (c) PATA-Tb <sup>+3</sup> . .....	16
<b>Figura 7:</b> Mecanismo de Apagamiento ICT. ....	17
<b>Figura 8:</b> Estructura de FN. ....	17
<b>Figura 9:</b> Espectros de absorción normalizados y máximos de absorción de FN-12 en diferentes solventes.....	32
<b>Figura 10:</b> Espectros de emisión fluorescente normalizados de FN-12. Tabla de los máximos de emisión de FN-12 en diferentes solventes ( $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ ).....	34
<b>Figura 11:</b> Corrimiento de Stokes en función de ecuación LSER.....	35
<b>Figura 12:</b> Espectro de absorción (a) y de emisión (b) de FN-12 durante la fotosensibilización ( $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$ ). Dependencia de la absorbancia (c) y fluorescencia (d) con el tiempo de irradiación del sensibilizador NMB. ....	38
<b>Figura 13:</b> Aumento relativo de fluorescencia bajo diferentes proporciones FN-12:NMB. Tabla de las condiciones utilizadas. Ajuste de absorbancia en u.a. ....	39
<b>Figura 14:</b> (a) Espectro de absorción de FN-12 (izquierda) y RoBen (derecha). (b) Espectro de emisión de FN-12 durante la fotosensibilización ( $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$ ). Dependencia de la absorbancia (c) y fluorescencia (d) con el tiempo de irradiación del sensibilizador RoBen. ....	40
<b>Figura 15:</b> Aumento relativo de fluorescencia bajo diferentes proporciones FN-12:RoBen. Tabla de las condiciones utilizadas. Ajuste de absorbancia en u.a. ....	41
<b>Figura 16:</b> Intensidad de fosforescencia del $^1\text{O}_2$ con el sensibilizador NMB, en ausencia (azul) y presencia (rojo) de FN-12.....	42
<b>Figura 17:</b> Constante total versus % MeOD en mezclas MeOD / D2O. ....	43
<b>Figura 18:</b> Gráficos de cinética de pseudo primer orden para (a) FN-12 y (b) DMA frente a $^1\text{O}_2$ generado por fotosensibilización con NMB.....	43
<b>Figura 19:</b> Intensidad de fosforescencia del $^1\text{O}_2$ con el sensibilizador RoBen, en ausencia (rosa) y presencia (rojo) de FN-12. ....	44
<b>Figura 20:</b> Gráficos de cinética de pseudo primer orden para (a) FN-12 y (b) DMA frente a $^1\text{O}_2$ generado por fotosensibilización con RoBen.....	45
<b>Figura 21:</b> (a) Espectro de absorción de FN-12(izquierda) y RoBen (derecha) variando la concentración de FN-12. (b) Espectro de emisión de RoBen a diferentes concentraciones de FN-12.....	46

<b>Figura 22:</b> Gráficos de cinética de pseudo primer orden para FN-12 y $^1\text{O}_2$ generado por fotosensibilización con NMB (rojo) y RoBen (gris). .....	47
<b>Figura 23:</b> Aumento relativo de fluorescencia frente a $\text{H}_2\text{O}_2$ y $\text{O}_2^-$ .....	48
<b>Figura 24:</b> Escaneo lineal de fluorescencia combinado, MitoTracker (rojo) y sonda FN-12 (verde). .....	51
<b>Figura 25:</b> Dependencia del espectro de fluorescencia bifotónica de FN-12 con la longitud de onda de irradiación. Espectros corregidos por la potencia del láser. ...	53
<b>Figura 26:</b> Espectros de fluorescencia bifotónica de FN-12 obtenidos con irradiación a diferentes longitudes de onda del láser. El espectro total corresponde a la suma de dos señales que fueron deconvolucionadas, centradas a 523 y 573 nm. ....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Tiempos de vida del $^1\text{O}_2$ en solventes orgánicos. ....	4
<b>Tabla 2:</b> Propiedades fotofísicas de los sensibilizadores.....	9
<b>Tabla 3:</b> Coeficientes de absorptividad molar de FN-12 en diferentes solventes. ...	33
<b>Tabla 4:</b> Rendimientos cuánticos de fluorescencia de FN-12.....	36

## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>Imagen 1:</b> Imágenes confocales de células SH-SY5Y incubadas con FN-12. Microscopía de campo claro (izquierda) y de fluorescencia UV-Vis (derecha) ( $\lambda_{\text{exc}} = 353 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{emi}} = 465 \text{ nm}$ ).....	50
<b>Imagen 2:</b> Localización intracelular de MitoTracker Red (a) ( $\lambda_{\text{exc}} = 557 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{emi}} = 572$ ) y FN-12 (b) ( $\lambda_{\text{exc}} = 353 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{emi}} = 465 \text{ nm}$ ). (c) superposición de (a) y (b)...	51

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Caminos de desactivación del $^1\text{O}_2$ . ....	3
<b>Esquema 2:</b> Mecanismos de reacción del $^1\text{O}_2$ .....	5
<b>Esquema 3:</b> Mecanismo de Apagamiento PET.....	12
<b>Esquema 4:</b> Sondas fluorescentes de $^1\text{O}_2$ DPAX, DMAX y sus respectivos endoperóxidos.....	13
<b>Esquema 5:</b> Ruta sintética de FN-12.....	28

## RESUMEN

El oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) es una especie electrónicamente excitada del oxígeno molecular y altamente reactiva. Pertenece a la familia de las especies reactivas de oxígeno (ROS), protagonistas de diversos procesos fisiológicos y patológicos. El  $^1\text{O}_2$  juega un papel clave en una amplia variedad de procesos químicos y biológicos, entre otros, en síntesis orgánica, terapia fotodinámica del cáncer, erradicación de microorganismos patógenos, o señalización celular.

A pesar de su relevancia, solo existen algunas técnicas disponibles para monitorear el  $^1\text{O}_2$  en medios biológicos. Es por esta razón que actualmente se han desarrollado métodos de detección indirectos basados en sondas que reaccionan selectivamente con  $^1\text{O}_2$ . Entre estos métodos, las sondas fluorescentes son herramientas atractivas para la detección de  $^1\text{O}_2$  en medios biológicos debido a su alta sensibilidad, respuesta rápida y la capacidad de obtención de imágenes utilizando microscopía de fluorescencia.

Sondas fluorescentes furil derivados del vinilnaftoxazol (FN) que actúan bajo un mecanismo del tipo “apagado-encendido”, muestran un notable aumento de la fluorescencia del grupo naftoxazol luego de la reacción del residuo furano con  $^1\text{O}_2$ . En este trabajo de tesis se sintetizó una sonda fluorescente del tipo FN (FN-12), en donde se adiciona al anillo furano una sal de trifenilfosfonio terminal, conocido como un localizador mitocondrial, con el fin de ampliar el uso de estas sondas hacia sistemas de interés biológico.

La sonda FN-12 se caracterizó por métodos espectroscópicos clásicos, se analizaron sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas y se evaluó su reactividad frente al  $^1\text{O}_2$  generado por fotosensibilización, utilizando sensibilizadores clásicos como el Nuevo Azul de Metileno y Rosa Bengala. Los resultados son prometedores; la sonda FN-12 reacciona químicamente con  $^1\text{O}_2$  alcanzando un aumento de fluorescencia de 581 veces utilizando el sensibilizador Rosa Bengala. Además, la sonda es fotoestable, presenta selectividad frente a otras ROS (radical superóxido y peróxido de hidrógeno) y posee una baja autosensibilización. Luego de los

resultados del comportamiento de la sonda FN-12 en medio homogéneo, se analizó su localización celular. La sonda FN-12 fue introducida en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano, en conjunto a un marcador mitocondrial comercial MitoTracker Red. Utilizando microscopía confocal, se observa en la imagen picos de fluorescencia superpuestos, correspondientes a la sonda FN-12 y al MitoTracker Red, lo que confirma la localización de la sonda FN-12 en la mitocondria.

Considerando los resultados obtenidos, se postula a la sonda fluorescente FN-12 como una candidata idónea para monitorear la dinámica de generación de  $^1\text{O}_2$  en mitocondrias.

## SUMMARY

Singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) is an electronically excited species of molecular oxygen, highly reactive and belong to the reactive oxygen species (ROS), who have a major role in diverse pathological and physiologic process. The  $^1\text{O}_2$  play a key role on a wide chemical and biologic process, among others, organic synthesis, photodynamic therapy, eradication of pathogenic microorganism, or cellular signaling.

Despite its relevant, there are only a few techniques available for monitoring the  $^1\text{O}_2$  on biologic systems. For this reason, currently have been developed indirect methods of detection, based on probe that selectively react with  $^1\text{O}_2$ . Among these, fluorescent probes are attractive tools for detection of  $^1\text{O}_2$  on biological medium due to its high sensibility, quick response and ability to obtain images using fluorescence microscopy.

Furyl derivatives of vinylnaphthoxazol (FN) are fluorescent probe that operates under a “turn off - on” mechanism and exhibits great enhancement of fluorescence of the naphthoxazol group, after the reaction of furan moiety with singlet oxygen. In this work, it is synthetized a fluorescent probe of FN type (FN-12), where the inclusion of triphenylphosponium terminal salt on furan moiety, a common mitochondrial tracker, it is done with the purpose of extending the use of this probe to biological systems.

The probe FN-12 is characterized using classic spectroscopic methods, its photophysical and photochemical properties are also analyzed, as well as its reactivity with  $^1\text{O}_2$ , generated by photosensitization using classics sensitizers like New Methylene Blue and Rose Bengal. The results were promising; the probe reacts chemically with  $^1\text{O}_2$  reaching a fluorescence increase of 581-fold using Rose Bengal as sensitizer. Also, the probe is photostable, presented selectivity over others ROS, like superoxide radical and hydrogen peroxide, and had a low autosensitization. After the results of the behavior of probe FN-12 on homogeneous medium, its cellular localization was analyzed. The probe was introduces into human neuroblastoma line cells (SH-SY5Y), together with the commercial MitoTracker Red. Using confocal microscopy, it is observed that the images show overlays peak of fluorescence,

corresponding to probe FN-12 and the MitoTracker Red, confirming the mitochondrial localization of the probe.

Considering the results, it is postulated that the fluorescent probe FN-12 as suitable candidate for monitoring the generation of  $^1\text{O}_2$  on mitochondria.

# 1. INTRODUCCIÓN

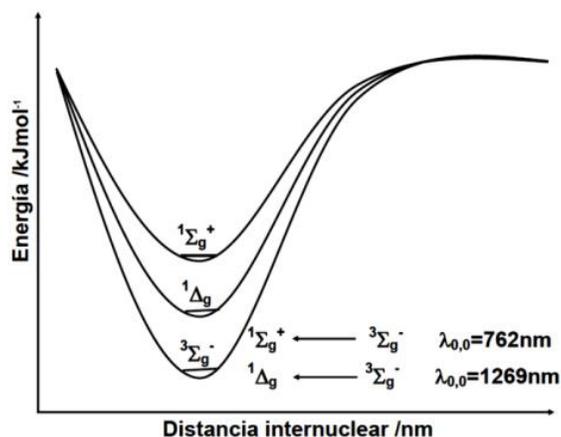
## 1.1. Oxígeno molecular singulete

El oxígeno molecular singlete ( $O_2(^1\Delta_g)$ , en lo sucesivo  $^1O_2$ ), el primer estado electrónico excitado de la molécula de oxígeno, es una especie de oxígeno altamente reactiva que, aunque posee tiempo de vida cortos en solventes orgánicos y en sistemas de interés biológico, es capaz de oxidar una gran cantidad de moléculas y biomoléculas. El  $^1O_2$  juega un papel clave en una amplia variedad de procesos químicos y biológicos, entre otros, en síntesis orgánica, terapia fotodinámica del cáncer, erradicación de microorganismos patógenos, o señalización celular.

## 1.2. Propiedades del $^1O_2$

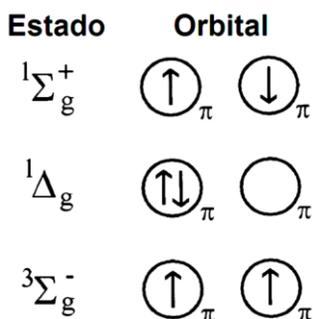
### 1.2.1. Configuración electrónica

A diferencia de la mayoría de las moléculas, el oxígeno molecular en estado basal posee una configuración electrónica de capa abierta, con dos electrones de igual espín que ocupan diferentes orbitales moleculares degenerados. Posee dos estados excitados de multiplicidad singulete.



**Figura 1:** Curva de energía potencial de los estados electrónicos del oxígeno molecular.

La configuración electrónica del oxígeno triplete comúnmente se designa con la terminología  $O_2(^3\Sigma_g^-)$  o  $^3O_2$ . Los dos estados excitados de menor energía poseen estados de spin singulete. El estado de menor energía se designa como  $O_2(^1\Delta_g)$  o  $^1O_2$ , y el siguiente nivel singulete excitado es representado por el símbolo  $O_2(^1\Sigma_g^+)$ . Debido a la alta energía, baja estabilidad y menores tiempos de vida del estado  $O_2(^1\Sigma_g^+)$ , es que el término “oxígeno singulete” comúnmente se refiere al estado  $^1O_2$ .



**Figura 2:** Ocupación de los orbitales moleculares de los diferentes estados electrónicos del oxígeno molecular.

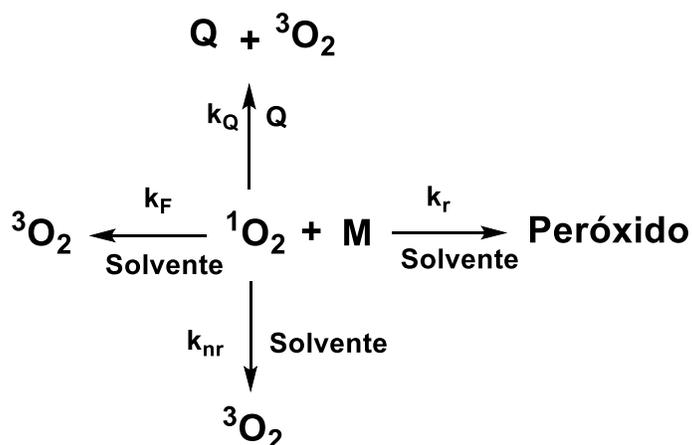
El oxígeno en estado basal posee dos electrones del mismo spin que ocupan orbitales  $\pi^*$  degenerados, lo cual por restricción de spin, solo es capaz de aceptar un electrón a la vez durante una reacción redox (tipo radical), reaccionando lentamente con la mayoría de las moléculas orgánicas, las cuales poseen electrones apareados, configuración singulete basal. Sin embargo, el  $^1O_2$  es una especie más

reactiva de oxígeno. Posee pares de electrones apareados con spines opuestos, por lo tanto la restricción de spin es removida y es capaz de aceptar dos electrones a la vez, incrementando así su capacidad oxidativa comparada con  $^3\text{O}_2$ .

Una vez que el oxígeno se encuentra en el estado singulete excitado, existen diferentes caminos de desactivación para regresar a su estado basal.

### 1.2.2. Mecanismos de desactivación

La cinética de decaimiento del  $^1\text{O}_2$  es extremadamente dependiente del entorno donde se encuentra, razón por la cual existen diferentes caminos de desactivación, los que pueden ser tanto físicos como químicos. Estos procesos ocurren al mismo tiempo y son competitivos entre sí.



**Esquema 1:** Caminos de desactivación del  $^1\text{O}_2$ . [1]

La desactivación radiativa ( $k_{\text{F}}$ ) ocurre mediante la emisión fosforescente característica del  $^1\text{O}_2$  que se observa a 1275 nm. Esta emisión es comúnmente utilizada como método para la detección del  $^1\text{O}_2$ . La desactivación física del  $^1\text{O}_2$  mediante un apagador ( $k_{\text{Q}}$ ) es un proceso de transferencia de energía el que ocurre principalmente por choques inelásticos entre ambas moléculas. La desactivación no radiativa ( $k_{\text{nr}}$ ), en fases condensadas, ocurre mediante una transferencia de energía electrónica-vibracional con moléculas de solvente, siendo probablemente el camino

de desactivación más importante y el responsable del tiempo de vida media del  $^1\text{O}_2$  en fases condensadas. La desactivación vía solvente es más efectiva en aquellos que poseen una alta frecuencia vibracional, como enlaces O-H o C-H, debido a que la energía vibracional de enlace coincide con la energía electrónica de desactivación del  $^1\text{O}_2$ . Generalmente se aprovecha el efecto isotópico utilizando solventes deuterados para aumentar los tiempos de vida del  $^1\text{O}_2$ , como también reemplazando los hidrógenos por flúor se logran incrementos aún mayores.

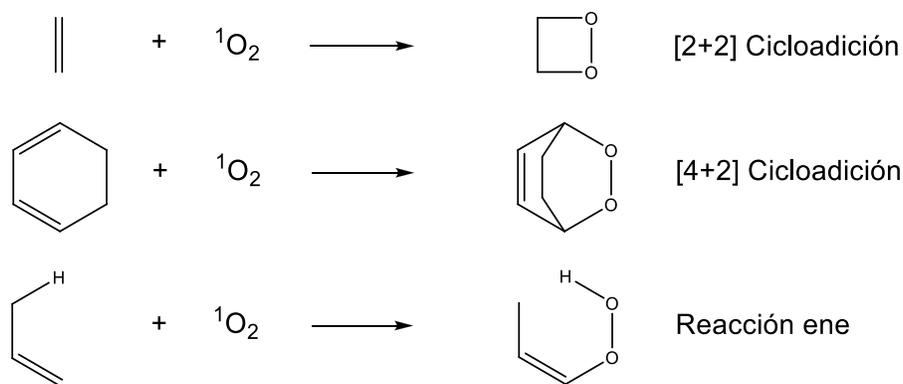
**Tabla 1:** Tiempos de vida del  $^1\text{O}_2$  en solventes orgánicos. [2-5]

Solventes	Tiempos de vida ( $\mu\text{s}$ )
$\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$	3,8/62
$\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{OD}/\text{CD}_3\text{OD}$	9,5/29/240
$\text{CHCl}_3/\text{CDCl}_3$	264/740
$\text{C}_6\text{H}_6/\text{C}_6\text{D}_6/\text{C}_6\text{F}_6$	30/630/3900
$(\text{CH}_3)_2\text{CO}/(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	50/723
$\text{CH}_3\text{CN}/\text{CD}_3\text{CN}$	62/554
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3/\text{C}_6\text{D}_5\text{CD}_3$	27/320

La desactivación química, o reacción química del  $^1\text{O}_2$  con un sustrato M ( $k_r$ ), es uno de los caminos más interesantes y ampliamente utilizado para sus diferentes aplicaciones.

### 1.2.3. Reactividad

El oxígeno basal posee un estado electrónico triplete, por lo que su reacción con moléculas orgánicas de capa cerrada es prohibida por spin. En cambio, el  $^1\text{O}_2$  reacciona rápidamente con moléculas orgánicas insaturadas y/o con moléculas orgánicas que posean heteroátomos con pares de electrones libre, ya que la restricción de spin es removida. La reacción del  $^1\text{O}_2$  con un sustrato, para formar peróxidos como producto inicial, ocurre generalmente por tres mecanismos posibles; cicloadición [2+2], cicloadición [4+2] y reacción ene.



**Esquema 2:** Mecanismos de reacción del  $^1\text{O}_2$ . [6]

El éxito de la reacción química del  $^1\text{O}_2$  con un sustrato depende y/o compete con los diferentes caminos de desactivación, por lo que la elección del solvente juega un rol muy importante en el control de la reacción, influyendo tanto en la constante de velocidad como en la distribución de productos.

Furanos sustituidos han sido utilizados como atrapadores de  $^1\text{O}_2$  debido a que reaccionan con éste con elevadas constantes de velocidad, además son capaces de inducir quimioselectividad o hasta regioselectividad de forma relativamente fácil. [7]

Los furanos sustituidos simétricamente reaccionan con  $^1\text{O}_2$  por un mecanismo de cicloadición [4 + 2] sincrónico concertado, mientras que los furanos sustituidos asimétricamente lo hacen vía una cicloadición [4 + 2] asincrónica concertada en las posiciones 2,5 del furano, mediante la intervención de un exciplexo intermediario. [8-10] En principio, el producto inicial de la reacción de furano con  $^1\text{O}_2$  es siempre el endoperóxido, pero el siguiente paso de reacción posee una gran versatilidad, dependiendo principalmente de los sustituyentes y la elección del solvente. [11]

Debido a que existe una gran variedad de reacciones que se pueden llevar a cabo mediante el uso de  $^1\text{O}_2$ , su estudio y su uso se expande en diversas áreas de la química.

### 1.3. Importancia del $^1\text{O}_2$ en sistemas biológicos

El  $^1\text{O}_2$  posee una alta capacidad electrofílica, capaz de oxidar componentes celulares ricos en electrones como proteínas, ácidos nucleicos y estructuras lipídicas. Pertenece a la familia de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), las cuales juegan un rol protagónico en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Es generalmente aceptado el rol partícipe del  $^1\text{O}_2$  en procesos como la señalización celular, respuesta autoinmune, necrosis y muerte celular. <sup>[12-14]</sup> Además, el  $^1\text{O}_2$  es actualmente utilizado como herramienta para la erradicación de microorganismos patógenos o células neoplásicas.

La Terapia Fotodinámica (PDT) es probablemente la aplicación biológica más citada del  $^1\text{O}_2$ . En este tipo de terapia, se genera  $^1\text{O}_2$  intracelular por medio de un fotosensibilizador y un tipo de luz apropiada, lo que induce la muerte de células neoplásicas en la zona irradiada. La PDT es un método no invasivo con baja incidencia de efectos secundarios, posee variadas ventajas por sobre otras terapias del cáncer y se perfila como una opción de tratamiento en plena expansión en diversas áreas de la medicina. <sup>[15-17]</sup> Es por esta razón que el estudio de la generación y/o cuantificación del  $^1\text{O}_2$  intracelular es de vital importancia para su desarrollo.

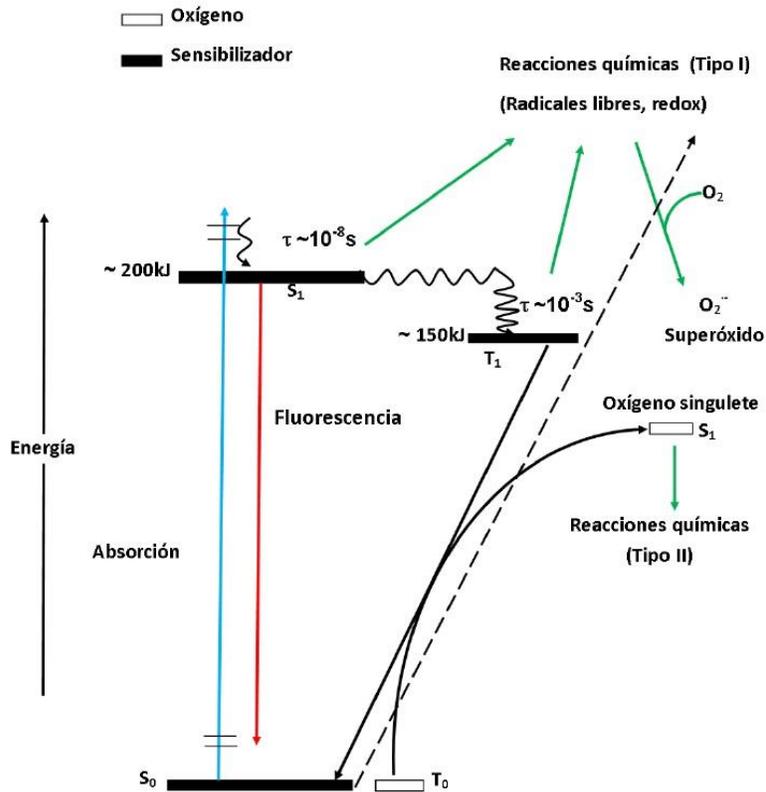
El estudio de la dinámica del  $^1\text{O}_2$  en medios celulares es de una alta complejidad. Aunque se han desarrollado varios tipos de atrapadores, descritos más adelante, sigue siendo una tarea difícil poder detectar  $^1\text{O}_2$  en sistemas biológicos debido, principalmente, a sus cortos tiempos de vida y elevada reactividad.

### 1.4. Generación de $^1\text{O}_2$

La generación de  $^1\text{O}_2$  desde el estado basal triplete utilizando la excitación electrónica directa es prohibida por spin y por lo tanto inherentemente ineficiente.

Dos formas comúnmente utilizadas para generar  $^1\text{O}_2$  son vía reacciones químicas o por medio de la fotosensibilización. La primera puede llevarse a cabo mediante la reacción del hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno o a través de la descomposición de endoperóxidos aromáticos. Esta última es una reacción reversible con  $^1\text{O}_2$ , un método limpio de generación que se utiliza como transportador de  $^1\text{O}_2$  en diferentes medios. [18-19] La fotosensibilización es un método simple y controlado de generación, en donde un sensibilizador, capaz de absorber luz UV-Vis, transfiere su energía de excitación al oxígeno molecular en su estado basal.

La excitación del sensibilizador ocurre generalmente vía transición por un fotón ( $h\nu$ ) entre el estado basal  $S_0$  y el estado singulete excitado  $S_n$ , en donde la relajación del estado  $S_n$  ocurre rápidamente hacia el estado singulete de menor energía del sensibilizador,  $S_1$ . El cruce intersistema genera el estado triplete del sensibilizador  $T_1$ . El tiempo de vida del  $T_1$  es mayor ( $\mu\text{s}$ ) en comparación al del singulete que lo produce (ns), permitiendo al estado excitado reaccionar por una de dos vías posibles, Tipo I y Tipo II. La vía Tipo I involucra la abstracción de un átomo de hidrógeno o una transferencia electrónica entre el sensibilizador excitado y un sustrato, generando radicales libres. Estos radicales pueden reaccionar con oxígeno para formar ROS como el radical superóxido. En la vía Tipo II, el  $^1\text{O}_2$  es generado por una transferencia de energía durante la colisión entre el sensibilizador excitado y el oxígeno molecular triplete.



**Figura 3:** Generación fotosensibilizada de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. [20]

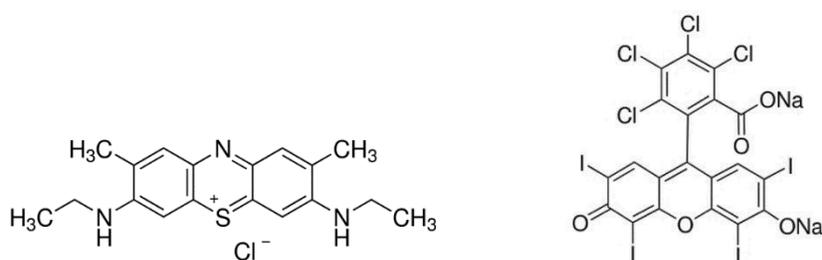
En organismos aeróbicos, la generación de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ocurre de forma endógena durante la respiración celular debido a la reducción incompleta del oxígeno, que ocurre en la membrana interna de la mitocondria, en donde también se generan otras ROS. [21]

En microorganismos, el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> es el principal agente causante del estrés fotooxidativo. En microorganismos fotosintéticos, la mayor fuente de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> es la generación sensibilizada mediante pigmentos, y en microorganismos no fotosintéticos, cofactores celulares como flavinas, rodopsinas, quinonas y porfirinas sirven como fotosensibilizadores. [22]

La eficiencia del fotosensibilizador depende de sus propiedades fotofísicas y de la energía de su estado triplete más bajo. Un buen sensibilizador debe cumplir con las siguientes propiedades; poseer un alto coeficiente de extinción molar en la región

espectral de excitación, un estado triplete de energía apropiada ( $E_T \geq 95 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) para una eficiente transferencia de energía al oxígeno en estado basal, alto rendimiento cuántico de triplete y además, largos tiempos de vida del estado triplete. [20]

Existen varios grupos de moléculas que absorben en el UV-Vis capaces de generar  $^1\text{O}_2$ , entre ellos, los sensibilizadores comúnmente utilizados son el azul de metileno (NB), nuevo azul de metileno (NMB) y rosa de bengala (RoBen), de los cuales los últimos dos fueron utilizados en este trabajo de tesis.



**Figura 4:** Estructura molecular de NMB (izquierda) y RoBen (derecha).

Estos sensibilizadores son eficientes debido a que presentan fotoestabilidad, elevados rendimientos cuánticos de generación de  $^1\text{O}_2$  ( $\Phi_\Delta$ ), largos tiempos de vida del triplete ( $\tau_T$ ) y un elevado rendimiento para la generación del triplete ( $\Phi_T$ ).

**Tabla 2:** Propiedades fotofísicas de los sensibilizadores. [23]

MeOH	Azul de Metileno	Rosa Bengala
$\Phi_\Delta$	0,51	0,76
$\Phi_T$	0,52	0,9
$\tau_T / \mu\text{s}$	450	130

Los datos para el NMB, análogo del Azul de Metileno, no se encuentran reportados.

## 1.5. Detección y cuantificación de $^1\text{O}_2$

En la actualidad se realiza un elevado número de investigaciones relacionadas a los métodos de detección del  $^1\text{O}_2$ , los cuales pueden clasificarse en dos grupos; detección directa y detección indirecta.

La detección directa se realiza mediante detectores con sensibilidad en el infrarrojo cercano, capaces de observar la fosforescencia intrínseca del  $^1\text{O}_2$  con el máximo centrado a 1275 nm. [24] Mediciones resueltas en el tiempo de la luminiscencia del  $^1\text{O}_2$  se utilizan para el estudio de la cinética de decaimiento del singulete. Una de las desventajas de este método es que sufre de una sensibilidad débil debido a la baja eficiencia de la emisión de  $^1\text{O}_2$ , donde la vida media del  $^1\text{O}_2$  en agua es muy corta ( $\sim 4 \mu\text{s}$ ) [25] y el rendimiento cuántico de fosforescencia es muy bajo, lo que da como resultado bajos valores en la relación señal : ruido.

En los métodos de detección indirecta se utilizan atrapadores químicos, donde en presencia de  $^1\text{O}_2$  experimentan una reacción con un notable cambio de una propiedad física medible, tales como absorción [26], señales de resonancia paramagnética electrónica (EPR) [27-28] o fluorescencia [29-30].

Una sonda espectrofométrica comúnmente utilizada para la detección de  $^1\text{O}_2$  es el 9,10-difenilantraceno (DFA). El DFA reacciona específicamente con  $^1\text{O}_2$  para formar un endoperóxido estable con una  $k_f$  de  $1,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . [31] El decrecimiento de la absorbancia a 355 nm es proporcional a la producción de  $^1\text{O}_2$ . A pesar de la importancia y conveniencia del uso de sondas espectrofotométricas, éstas poseen desventajas intrínsecas, como su baja sensibilidad y fotoestabilidad, lo que limitan su amplio uso.

Los métodos de EPR combinan la reacción de  $^1\text{O}_2$  con un atrapador químico para generar especies paramagnéticas fácilmente detectables. Estos métodos no solo detectan  $^1\text{O}_2$ , sino que también lo cuantifican con una alta sensibilidad, por lo que han sido utilizados frecuentemente para obtener información relativa a la eficiencia de la producción de  $^1\text{O}_2$ . [32] Sin embargo, las señales EPR son comúnmente

afectadas por iones coexistentes y solvente, lo que conlleva en ocasiones a errores significativos. Además, la instrumentación es de un costo elevado y la relativa complejidad de los procedimientos de análisis restringe su aplicación.

Las sondas fluorescentes son utilizadas para detectar  $^1\text{O}_2$  a través de los cambios en su espectro de emisión fluorescente, son altamente sensibles, de respuesta rápida y pueden proveer de una alta resolución espacial a través de imágenes microscópicas de fluorescencia.

## 1.6. Sondas fluorescentes de $^1\text{O}_2$

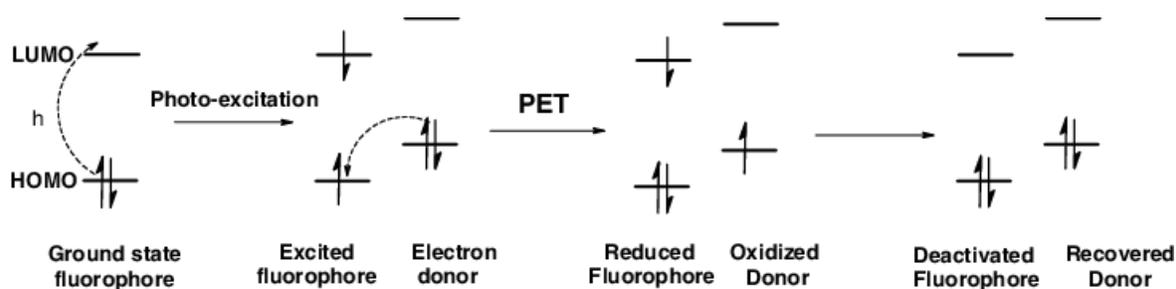
El método de fluorescencia es el método de detección indirecta más utilizado para la detección y cuantificación de  $^1\text{O}_2$ . En las últimas décadas, se han descrito sondas fluorescentes que han mostrado selectividad y eficiencia, siendo una opción ideal para el monitoreo de la generación de  $^1\text{O}_2$  intracelular debido a su alta sensibilidad, análisis rápido, no destructivo y capacidad de entregar información a tiempo real.

Las sondas fluorescentes del tipo “díadas” que operan bajo un mecanismo de “apagado – encendido” son ampliamente utilizadas. Éstas son conformadas por un atrapador químico unido covalentemente a un fluoróforo, en donde la fluorescencia inicialmente se encuentra apagada y es recuperada luego de la reacción del  $^1\text{O}_2$  con el atrapador. La oxidación del atrapador por  $^1\text{O}_2$  elimina el canal de desactivación y se recupera la luminiscencia del fluoróforo. Estos sensores fluorescentes de  $^1\text{O}_2$  pueden operar bajo tres posibles mecanismos de apagamiento: Transferencia de Electrones Fotoinducida (PET), Transferencia de Energía Intramolecular (IET) o Transferencia de Carga Intramolecular (ICT, siglas en inglés)

### 1.6.1. Transferencia de Electrones Fotoinducida (PET)

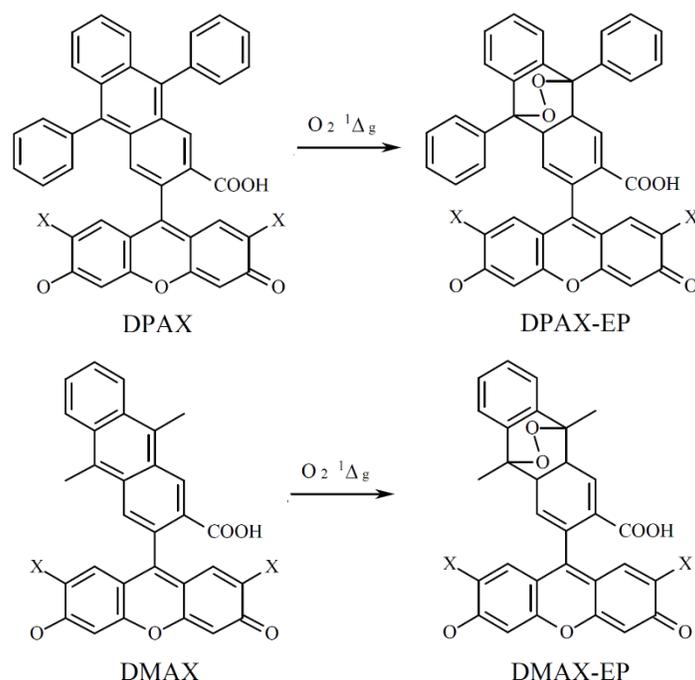
El mecanismo PET puede ser descrito de forma simple como la transferencia de un electrón desde una especie rica en electrones hacia una especie deficiente en

electrones, que se encuentran unidas por un espaciador. En el caso de una díada, se excita electrónicamente el fluoróforo, promoviendo un electrón hacia el orbital LUMO, en donde la vacante electrónica del HOMO es ocupada por un electrón proveniente de un atrapador con alta densidad electrónica, impidiendo que el electrón excitado del fluoróforo decaiga radiativamente a su estado basal. Cuando ocurre la oxidación del atrapador con el  $^1\text{O}_2$ , el canal de apagamiento se elimina recuperando la fluorescencia.



**Esquema 3:** Mecanismo de Apagamiento PET. <sup>[33]</sup>

La sonda DPAX fue la primera sonda fluorescente para la detección de  $^1\text{O}_2$ . El DPAX y sus derivados son díadas compuestas por una mitad fluoresceína y otra de antraceno, las que operan bajo un mecanismo PET. Éstas son prácticamente no-fluorescentes inicialmente, pero sus endoperóxidos son fuertemente fluorescentes con un rendimiento cuántico de fluorescencia en el rango de 0,5 y 0,7. El aumento de fluorescencia es selectivo al  $^1\text{O}_2$  ya que no aumenta frente a la reacción de peróxido de hidrogeno, superóxido u óxido nítrico. Los derivados de DPAX que incorporan grupos electroaceptores (X= Cl, F) en la posición 2- y 7- del cromóforo fluoresceína, exhiben intensidad de fluorescencia estable a valores de pH fisiológico. <sup>[34]</sup>



**Esquema 4:** Sondas fluorescentes de  $^1O_2$  DPAX, DMAX y sus respectivos endoperoxidos.

Una sonda fluorescente similar, DMAX, en donde el atrapador es un 9,10-dimetilantraceno, opera bajo un mecanismo PET y su endoperoxido es altamente fluorescente. Comparado con DPAX, DMAX es más sensible (siendo 53 veces más sensible que DPAX) y menos hidrofóbica, el que posee potencial para detección de  $^1O_2$  en muestras biológicas. [35]

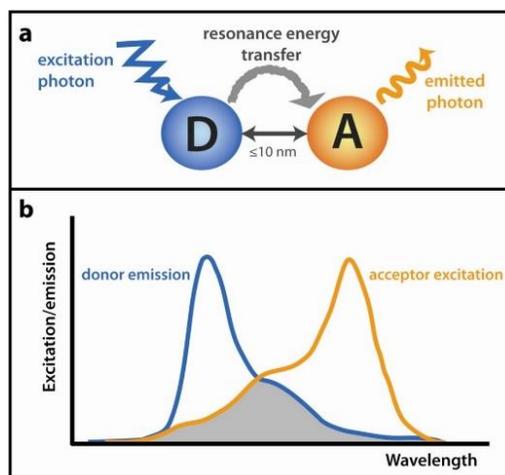
En 2004, Invitrogen/Molecular Probes introduce un nuevo sensor fluorescente comercial para  $^1O_2$ , nombrado Singlet Oxygen Sensor Green® (SOSG), el que ha sido utilizado ampliamente en una gran variedad de campos tales como la ciencia de los materiales, bioquímica y aplicaciones medicinales. Considerando sus espectros de absorción y de fluorescencia, y reportes previos en SOSG, es muy probable que SOSG esté compuesto por una díada formada por fluoresceína y un derivado del antraceno. La sonda SOSG ha sido amplia y frecuentemente utilizada debido a su elevada sensibilidad y selectividad hacia el  $^1O_2$ , buen contraste apagado-encendido y su solubilidad en agua. Sin embargo, SOSG es capaz de generar  $^1O_2$  bajo irradiación de luz UV-Vis, con un  $\Phi_\Delta = 0.06$ . [36] Este es un problema

crítico como sensor fluorescente debido a que produce la molécula objetivo por sí mismo durante la irradiación. [37-38]

Más recientemente, se ha diseñado una sonda fluorescente llamada Aarhus Sensor Green (ASG), formada por una fluoresceína tetrafluoro-sustituida unida covalentemente a un anillo 9,10-difenilantraceno, similar a la sonda SOSG. Una de las principales ventajas de la sonda Aarhus sobre la sonda SOSG, es que, a valores de pH fisiológico, ASG y su respectivo endoperóxido, no sufren de autosensibilización, por lo que al ser irradiados bajo largos periodos de tiempo, no conducen a la producción de  $^1\text{O}_2$ , donde el valor de generación es  $\Phi_{\Delta} < 0,02$ . [39]

### 1.6.2. Transferencia de Energía Intramolecular (IET)

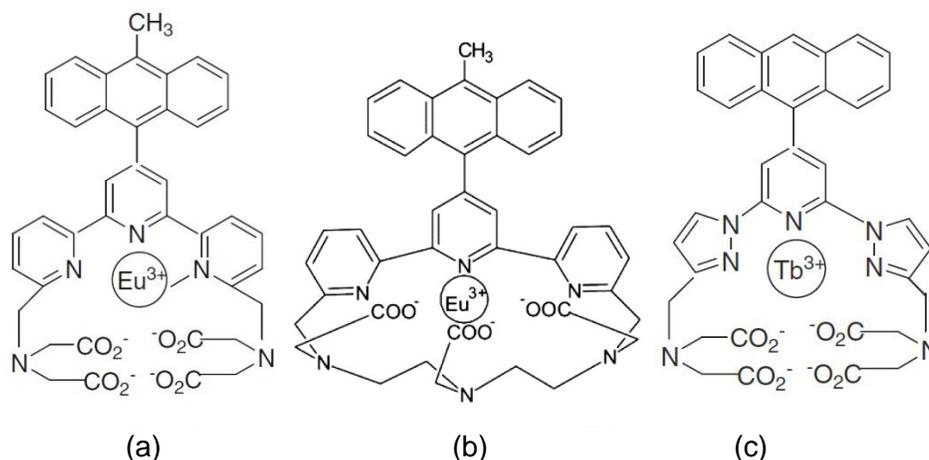
Por otra parte, sondas que operan bajo el mecanismo IET son generalmente sondas compuestas por metales de tierras raras, queladas con ligandos orgánicos atrapadores de  $^1\text{O}_2$ . El mecanismo IET ocurre típicamente por un mecanismo del tipo FRET (Föster Resonance Energy Transfer) en el cual la emisión del fluoróforo es modulada por la fluorescencia del aceptor y requiere solapamiento entre la banda de emisión del fluoróforo y la banda de absorción del atrapador. En presencia de  $^1\text{O}_2$  la banda de absorción del atrapador sufre un efecto hipsocrómico, desplazando la banda de absorción hacia longitudes de ondas menores y como resultado se produce un aumento de la emisión del fluoróforo.



**Figura 5:** Mecanismo del tipo FRET. El donador excitado (D) transfiere su energía mediante un proceso no radiativo al aceptor cercano (A). <sup>[40]</sup>

Complejos de  $\text{Eu}^{+3}$  y  $\text{Tb}^{+3}$  también han sido usados para la detección de  $^1\text{O}_2$ . Los iones lantánidos quelados poseen ventajas diferentes por sobre las sondas fluorescentes orgánicas; largos tiempos de vida de luminiscencia del endoperóxido formado luego de la reacción con el  $^1\text{O}_2$ , largos corrimientos de Stokes y respuesta independiente del pH.

Para sondas de este tipo, como los complejos  $\text{MTTA-Eu}^{+3}$ ,  $\text{MTDTA-Eu}^{+3}$  y  $\text{PATA-Tb}^{+3}$  (**Figura 6**), el rendimiento cuántico de luminiscencia de sus endoperóxidos respectivos son entre 15 y 23 veces mayores que la luminiscencia del compuesto inicial. <sup>[41-43]</sup>

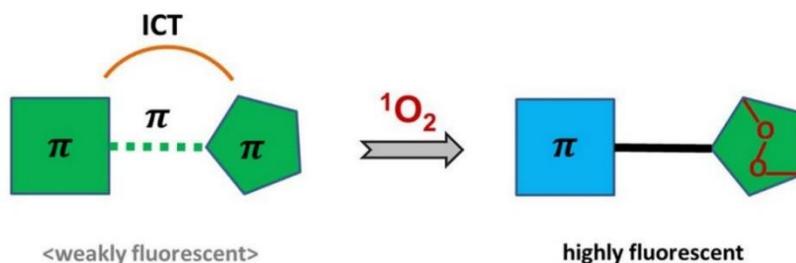


**Figura 6:** Estructura química de (a) MTTA-Eu<sup>3+</sup>, (b) MTDTA-Eu<sup>3+</sup> y (c) PATA-Tb<sup>3+</sup>.

MTDTA-Eu<sup>3+</sup> es soluble en agua y posee una alta sensibilidad. Esta sonda ha sido probada exitosamente en los primeros reportes de monitoreo de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> intracelular durante condiciones de PDT mediante imágenes luminiscentes obtenidas con la técnica “*time-gated microscopy*”. [42]

### 1.6.3. Transferencia de Carga Intramolecular (ICT)

Las sondas fluorescentes que operan bajo un mecanismo ICT, corresponden a moléculas que presentan un fluoróforo unido covalentemente a un atrapador mediante un sistema π-conjugado extendido, en donde la energía de excitación es capaz de disiparse por medio del movimiento de electrones, debido a la deslocalización electrónica del sistema π-conjugado, provocando el apagamiento de la fluorescencia. En presencia del <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, la aromaticidad extendida es interrumpida, cancelando la ICT, dando lugar a la recuperación de la fluorescencia.



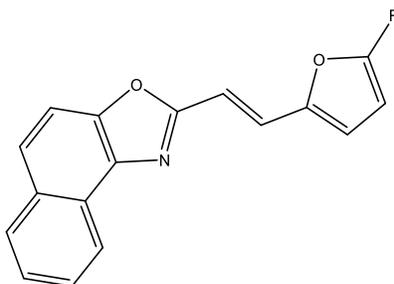
**Figura 7:** Mecanismo de Apagamiento ICT. <sup>[44]</sup>

En el 2013, dos estudios independientes reportaron sondas fluorescentes del tipo díadas para  $^1\text{O}_2$  que operan bajo el mecanismo ICT <sup>[45-46]</sup>.

En nuestro laboratorio se han desarrollado sondas fluorescentes exitosas para la detección de  $^1\text{O}_2$ . Estas sondas son del tipo furilvinilnaftoxazol (FN), las que poseen una elevada sensibilidad y un aumento de fluorescencia significativo al reaccionar con  $^1\text{O}_2$ .

#### 1.6.4. Sondas fluorescentes del tipo Furilvinilnaftoxazol (FN)

Las sondas del tipo FN operan bajo un mecanismo ICT, en donde el fluoróforo naftoxazol se encuentra unido a un anillo furano como atrapador, mediante un puente vinílico.



**Figura 8:** Estructura de FN.

Se ha observado que las sondas del tipo FN poseen incrementos de fluorescencia sobre las 300 veces, en donde se ha tomado ventaja del cambio espectral que sufre la sonda luego de la fotooxidación. Poseen selectividad y una alta reactividad frente

al  $^1\text{O}_2$ , del orden de  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , y por último poseen una despreciable contribución de autosensibilización. [47] Uno de los desafíos a enfrentar para el uso de estas sondas en sistemas biológicos es el aumento de su capacidad de penetración en membranas celulares.

Considerando la discusión anterior, en este trabajo de tesis se ha propuesto sintetizar una nueva sonda del tipo FN que incorpore en su estructura una sal de trifenilfosfonio, conocido marcador mitocondrial. Esto permitiría ampliar el uso de estas sondas hacia sistemas de interés biológico.

## 1.7. Detección de $^1\text{O}_2$ en células

La detección de  $^1\text{O}_2$  en medios celulares es de una alta complejidad, debido a dos factores principales; existencia de un gran número de biomoléculas capaces de reaccionar con él y sus cortos tiempos de vida.

En reportes previos, se ha logrado detectar  $^1\text{O}_2$  en neuronas individuales y células HeLa de forma directa observando la fosforescencia a 1270 nm con microscopía resuelta en el tiempo, bajo la irradiación de un fotosensibilizador incorporado en la célula. En este campo, grandes avances provienen del grupo de Ogilby. [48-50] Uno de los inconvenientes de esta técnica es la baja resolución espacial debido a la baja eficiencia de la emisión fosforescente del  $^1\text{O}_2$ .

Por otro lado, se han desarrollado diversas sondas fluorescentes capaces de monitorear la producción de  $^1\text{O}_2$  en medios celulares, con una mayor resolución espacial debido a la utilización de técnicas de microscopía fluorescente. Una de ellas, desarrollada por el grupo de Xiao-Bing Zhang, ha incorporado un grupo trifenilfosfonio a la sonda con el fin de direccionarla hacia la mitocondria. [51]

La mitocondria es un organelo subcelular de células eucariontes que juega un rol esencial en la producción de energía, generación de ROS, señalización celular y apoptosis. Por esta razón, las disfunciones mitocondriales están estrechamente

relacionadas con la muerte celular programada y a patologías asociadas al estrés oxidativo, como enfermedades neurodegenerativas. <sup>[52]</sup> Varios grupos han desarrollado agentes anticancerígenos dirigidos a mitocondrias, esperando una eficacia terapéutica óptima. <sup>[53-54]</sup> Una serie de evidencias también indican que el daño dirigido hacia la mitocondria es la razón principal de la apoptosis celular en el tratamiento de la PDT. <sup>[55-56]</sup>

En consecuencia, investigar la generación de  $^1\text{O}_2$  en mitocondrias es altamente significativo para entender los mecanismos asociados al comportamiento de esta especie activa de oxígeno a nivel molecular en sistemas de interés biológico.

## 2. HIPÓTESIS

La reacción del  $^1\text{O}_2$  con el anillo furano, unido mediante un puente vinilo a un sistema aromático naftoxazol, en una díada furano – naftoxazol, daría lugar a un aumento de la fluorescencia de la sonda. Si la sonda incluye en su estructura un grupo trifenilfosfonio, será posible internalizarla en mitocondrias. Consecuentemente, la díada podría ser un valioso sensor fluorescente del tipo apagado – encendido para monitorear la producción, dinámica y cinética del  $^1\text{O}_2$  en este organelo subcelular.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general

El propósito de esta tesis es sintetizar una sonda fluorescente que se pueda incorporar a células y que permita la obtención de imágenes de microscopía de fluorescencia para revelar la presencia y/o cuantificar  $^1\text{O}_2$ . Se sintetizará un derivado trifenilfosfonio de furilvinilnaftoxazol, promoviendo la internalización en células y orientación mitocondrial.

### 3.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar un derivado trifenilfosfonio de furilvinilnaftoxazol. Caracterizar el compuesto mediante análisis de espectroscopía de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H RMN}$ .
2. Obtener los espectros UV-Vis del compuesto en un conjunto reducido de solventes representativos de la escala de polaridad.
3. Obtener los espectros de fluorescencia y medir los rendimientos cuánticos de fluorescencia. Estos experimentos se realizarán en el mismo conjunto de solventes empleados para determinar los espectros UV-Vis.

4. Llevar a cabo experimentos de fotosensibilización con sensibilizadores típicos de  $^1\text{O}_2$  como Rosa de Bengala y Nuevo Azul de Metileno. Medir los aumentos de fluorescencia en función del tiempo de irradiación.
5. Medir la constante de velocidad de reacción total y la constante de velocidad de reacción química para la reacción entre la díada y el  $^1\text{O}_2$  en medios homogéneos usando como solvente  $\text{CH}_3\text{-OD}$  o mezclas  $\text{CH}_3\text{-OD} - \text{D}_2\text{O}$  y, si es posible, caracterizar los productos de reacción química empleando espectrometría de masas.
6. Determinar la localización celular de la sonda utilizando microscopía de fluorescencia.
7. Medir el aumento de fluorescencia en experimentos de microscopía de fluorescencia bifotónica, para detectar y/o cuantificar  $^1\text{O}_2$  en medios celulares.

#### **4. MATERIALES Y REACTIVOS**

Los solventes utilizados en la síntesis y purificación de los compuestos estudiados son de grado P.A. y se utilizaron sin tratamiento previo. Para las mediciones espectroscópicas se utilizaron solventes de grado espectroscópico.

Las soluciones de sulfato de quinina se obtuvieron utilizando agua grado Mili-Q y ácido sulfúrico grado P.A.

Los reactivos comerciales utilizados en reacciones son de calidad para síntesis.

El seguimiento de las reacciones se efectuó mediante cromatografía en capa fina (CCF) empleando cromatofolios de gel de sílice GF254 Merck sobre soporte de aluminio. La purificación por cromatografía en columna se realizó utilizando como fase estacionaria gel de sílice 60 Merck de 230-400 mallas por pulgada cuadrada. El eluyente empleado se indica para cada caso.

## 5. INSTRUMENTACIÓN

### 5.1. Absorción Ultravioleta-Visible

Los espectros de absorción UV-Vis y las mediciones de absorción a longitud fija se obtuvieron en un espectrofotómetro UV-visible ATI-Unicam modelo UV4 controlado por el programa Vision.

### 5.2. Espectros de emisión

Los estudios de emisión de la fluorescencia en estado estacionario se realizaron en un Espectrofluorímetro PC1 ISS provisto de polarizadores y controlado por el software Vinci.

### 5.3. Mediciones resueltas en el tiempo

Los tiempos de vida del oxígeno molecular singlete se obtuvieron midiendo la fosforescencia del  $^1\text{O}_2$  en la región del IR cercano, detectada usando un sistema PicoQuant Fluotime 200 modificado. Para la excitación se usa un láser Nd:YAG bombeado por diodo, FTSS355-Q3, Crystal Laser, Berlín, Alemania, trabajando a 1 kHz de frecuencia de repetición a 532 nm (2  $\mu\text{J}$  por pulso). El área irradiada fue de aproximadamente 7 mm<sup>2</sup>. La luminiscencia que sale de la muestra se hace incidir en un filtro de alta eficiencia de 1100nm (Edmund Optics, York, U.K.) y con un filtro de interferencia centrado a 1270 nm (NB-1270-010, Spectrogon, Sweden) para remover cualquier radiación dispersada del láser. Un lente plano-convexo de 25 mm diámetro x 75 mm FI, (Edmund Optics, York, U.K.) se usó para enfocar la luminiscencia emitida en la ventana de un fotomultiplicador sensible en el IR cercano (H1033A-45, Hamamatsu Photonics, Japón) usado como detector. El conteo de fotones se realiza con un escalador multicanal (PicoQuant Nanoharp 250). Las señales de la luminiscencia resuelta en el tiempo se analizan usando el software PicoQuant FluoFit 4.0. Los decaimientos de fluorescencia se registran con un sistema de conteo de fotones únicos correlacionado en el tiempo (Fluotime 200, PicoQuant GmbH, Berlín, Alemania) equipado con un fotomultiplicador sensible al

rojo. Los tiempos de vida de la fluorescencia se analizaron utilizando el software PicoQuant FluoFit 4.0.

#### 5.4. Sistema de fotólisis

El sistema de fotólisis está constituido por un porta celda termostatzado, con una bomba de aire Marina 2000, un regulador de voltaje LEDD1B de ThorLabs con iluminación Led. Se utilizó un Led M660L4 para NMB y un Led M565L3 para RoBen, ambos de ThorLabs, como fuentes lumínicas.

#### 5.5. Resonancia Magnética de Protones

Los espectros de RMN fueron determinados en un equipo Bruker modelo AVANCE 400. El software de funcionamiento es XWIN NMR versión 3.1.

#### 5.6. Microscopía

Las observaciones se realizaron en Microscopio Confocal Zeiss LSM 510, módulo confocal Meta 510 montado sobre microscopio Axiovert 200M.

#### 5.7. Espectros de fluorescencia bifotónica

Los espectros de fluorescencia bifotónica se obtuvieron en un microscopio de fluorescencia de dos fotones diseñado en el Laboratorio de Dinámica de Fluorescencia, University of California Irvine, Irvine, California, USA. Como fuente de excitación, se utiliza un láser de zafiro de titanio con bloqueo de modo (Mira 900, Coherent, Palo Alto, CA) bombeado por un láser de Nd:Vanadato duplicado en frecuencia (Verdi, Coherent). Para todas las mediciones, excitando entre 700 y 900 nm, la potencia promedio utilizada en la muestra oscila entre 42,5 y 82,5 mW/pulso. Se utiliza un fotomultiplicador en miniatura (R5600-P, Hamamatsu, Bridgewater, NJ) para la detección de luz en el modo de conteo de fotones y las cuentas se obtienen usando una tarjeta ISS (ISS, Inc., Champaign, IL). La adquisición de datos se realiza utilizando el programa SimFCS (Laboratorio de Dinámica de Fluorescencia, UCI,

CA). Se emplea un objetivo UPlan Apo / IR 60X / 1,20 (Olympus, Japón) para todas las mediciones.

## 6. METODOLOGÍAS

### 6.1. Espectros de absorción y coeficientes de absortividad molar

Se miden los espectros de absorción utilizando 1,2-dioxano, acetona, MeOH, ACN, DMF y agua. Los coeficientes de absortividad molar se calculan mediante la ecuación de Lambert-Beer utilizando una curva de concentración versus absorbancia.

### 6.2. Espectros de emisión y rendimientos cuánticos de fluorescencia

Los espectros de emisión se obtienen excitando la muestra a la longitud de onda máxima obtenida de los espectros de absorción. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\Phi_F$ ), corresponden a la razón entre los fotones absorbidos y los fotones emitidos a través del proceso de fluorescencia. Estos son medidos por el método de razones descrito por Eaton y Demas en solventes representativos de la escala de polaridad, usando sulfato de quinina en 0,1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( $\Phi_F = 0,55$ ) y 9,10-difenilantraceno ( $\Phi_F = 0,82$ )<sup>[57]</sup> en benceno como actinómetros. Brevemente, el método consiste en medir los espectros de absorción y emisión, a bajas absorbancias (menores a 1) para prevenir la autoabsorción. Para calcular los rendimientos cuánticos de fluorescencia se emplea la ecuación (1):

$$F_x = \left( \frac{m_x}{m_{act}} \right) \left( \frac{h_x^2}{h_{act}^2} \right) F_{act} \quad (1)$$

donde  $m_x$  y  $m_{act}$  son las pendientes de un gráfico del área integrada del espectro de emisión versus la absorbancia, de la muestra y del actinómetro respectivamente,  $\eta_x$

y  $\eta_{\text{act}}$  son los índices de refracción de la muestra y del actinómetro, y  $\Phi_{\text{act}}$  es el rendimiento cuántico del actinómetro.

### 6.3. Análisis multiparamétrico de los desplazamientos de la fluorescencia

Para realizar el análisis multiparamétrico de los desplazamientos de la fluorescencia en términos de los parámetros microscópicos del solvente, se emplea la ecuación solvatocrómica generalizada (LSER) desarrollada por Kamlet -Taft y col. [58]

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = \bar{\nu}_0 + a\pi^* + e\delta + b\alpha + c\beta + d\rho_H^2 \quad (2)$$

En la ecuación (2),  $\pi^*$  es una medida de la dipolaridad/polarizabilidad del solvente, el cual describe la habilidad del solvente para estabilizar una carga o un dipolo en virtud de su efecto dieléctrico,  $\delta$  es un término de corrección de polarizabilidad que es 0 para solventes alifáticos no clorados, 0,5 para alifáticos policlorados y 1 para solventes aromáticos,  $\alpha$  es la habilidad del solvente de donar enlace de hidrógeno o aceptar un par de electrones,  $\beta$  es la habilidad del solvente de aceptar un enlace de hidrógeno o de donar un par de electrones para formar un enlace coordinado y  $d\rho_H^2$  es el parámetro de solubilidad de Hildebrand al cuadrado, donde  $\rho_H$  es una propiedad del solvente que mide el trabajo necesario para separar las moléculas de solvente (es decir, la ruptura y reorganización de las interacciones solvente/solvente) a fin de crear una cavidad de tamaño adecuado para acomodar el soluto. Dado que este parámetro no tiene unidades de energía, se utiliza este parámetro al cuadrado que sí la tiene, por lo tanto,  $\rho_H^2$  se considera como una medida de la entalpía o energía libre de Gibbs requerida para separar las moléculas de solvente y proveer una cavidad de tamaño adecuado para el soluto.

### 6.4. Cinéticas de consumo en presencia de $^1\text{O}_2$

El consumo de la sonda fluorescente por reacción con  $^1\text{O}_2$  es seguido observando los cambios en los espectros de absorción UV-Visible y de emisión fluorescente. El

sistema de fotólisis utiliza un portacelda termostatzado que es iluminado usando un LED de longitud de onda apropiada. A la cubeta de paso óptico de 1 cm, se agregan 2 mL de solvente, la sonda en una concentración adecuada ajustando a una absorbancia menor que 1 y como sensibilizador se utiliza NMB y RoBen. Los experimentos son realizados a una temperatura de 20 °C.

## 6.5. Obtención de las constantes de desactivación de $^1O_2$

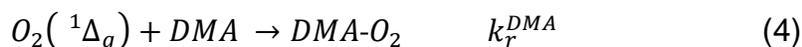
Se calculan las constantes reactivas ( $k_r$ ) y totales ( $k_t$ ) utilizando la aproximación de estado estacionario para el  $^1O_2$  bajo las condiciones experimentales descritas.

Las constantes de velocidad total para la desactivación de  $^1O_2$  se obtienen a partir de medidas resueltas en el tiempo utilizando la relación Stern-Volmer, ecuación (3), que relaciona los tiempos de vida del  $^1O_2$  con la concentración de sustrato.

$$\frac{1}{\tau_{\Delta}} = \frac{1}{\tau_{\Delta}^0} + k_t [M] \quad (3)$$

Donde  $\tau_{\Delta}^0$  es el tiempo de vida del  $^1O_2$  en el solvente utilizado,  $\tau_{\Delta}$  es el tiempo de vida en presencia de la sonda y  $k_t$  es la constante total de desactivación.

El cálculo de la constante reactiva ( $k_r$ ) se realiza utilizando 9,10-dimetilantraceno (DMA) como actinómetro, donde la velocidad de reacción del DMA frente a  $^1O_2$  está dada por:



$$v = -\frac{\delta[DMA]}{\delta t} = k_r^{DMA} [DMA][O_2(^1\Delta_g)] \quad (5)$$

Aplicando la aproximación de estado estacionario para la concentración de  $^1O_2$ , la ley de velocidad se puede reescribir como un proceso de pseudo-primer orden.

$$v = -\frac{\delta[DMA]}{\delta t} = k_{exp}[DMA] \quad (6)$$

$$k_{exp} = k_{DMA}[DMA][O_2(^1\Delta_g)] \quad (7)$$

Se determina una  $k_{exp}$  para DMA y FN-12, por separado, utilizando iguales condiciones experimentales. La  $k_{exp}$  es proporcional a la  $k_r$ , de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\frac{k_r^{DMA}}{k_{exp}^{DMA}} = \frac{k_r^{FN-12}}{k_{exp}^{FN-12}} \quad (8)$$

Por lo tanto, conociendo la  $k_r^{DMA}$  se obtiene el valor de  $k_r^{FN-12}$ . [59]

En estos experimentos se utiliza  $CH_3-OD$  como solvente. El  $^1O_2$  es generado utilizando NMB y RoBen ajustando a 1 de absorbancia.

## 6.6. Experimentos en células

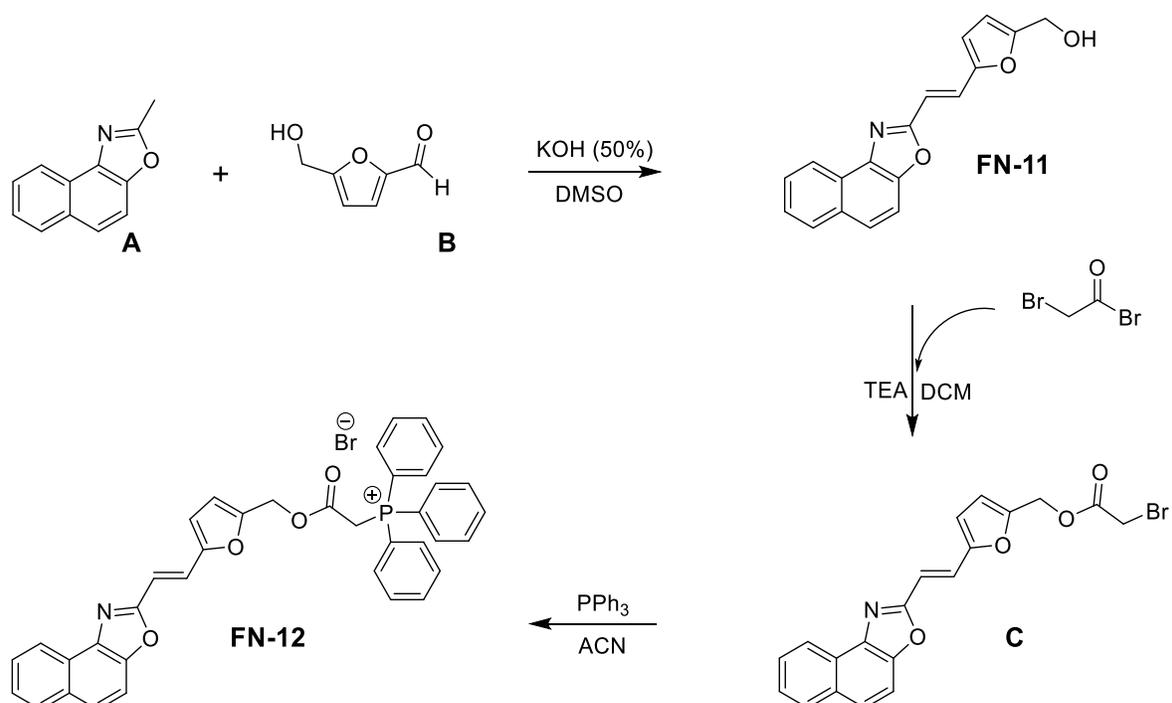
Para el cultivo de la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano (ATCC número CRL-2266, Rockville, MD), se utiliza como medio de cultivo una mezcla de MEM (Minimum Essential Medium) y F12 (Nutrient Mixture F-12) 1:1, suplementado con 20 mM de Hepes, 20 mM de  $NaHCO_3$ , aminoácidos no esenciales, suero fetal bovino (SFB) al 10 % y antibióticos (Anti-Anti, GIBCO, Life Technologies). Las células son mantenidas en un incubador bajo condiciones constantes de temperatura (37°C) y presión de  $CO_2$  (5%). Las células crecen en placas de 60 mm para la mantención y sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro en placas de 35 mm para el ensayo. Para los pasajes se utiliza tripsina (0,05% Trypsin-EDTA, GIBCO, Life Technologies) luego de lavar con PBS. Para el registro de la fluorescencia las células son colocadas en HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution).

El marcador mitocondrial utilizado fue MitoTracker® Red 580 (Cat. no. M22425), ThermoFisher.

## 6.7. Microscopía

Las observaciones se realizaron en Microscopio Confocal ZEISS LSM 510. El microscopio cuenta con un módulo META, el que permite un sistema de barrido espectral de 16 canales, seleccionando las longitudes de onda de absorción y de emisión óptimas para la observación.

## 6.8. Síntesis



**Esquema 5:** Ruta sintética de FN-12.

### 6.8.1. Síntesis de (*E*)-2-(2-(5-hidroximetil-fur-2-il)vinil)nafto[1,2-d]oxazol (FN-11)

El FN-11 fue obtenido por el método desarrollado por Zajac y col.<sup>[60]</sup>, el cual utiliza hidróxido de potasio como base y DMSO como solvente. La reacción transcurre mediante un mecanismo de tipo aldólico.

En un balón de 250 mL se adicionan 854  $\mu$ L (5,5 mmol) de 2-metilnaftooxazol (A), 25 mL de DMSO y 631 mg (5 mmol) de 5-hidroximetilfurfural (B). Bajo agitación magnética vigorosa, se adicionan gota a gota 12,2 mL de una solución de KOH al 50%, se esperan 10 minutos y se detiene la agitación. Después de una hora de reposo, se agregan 250 mL de solución saturada de agua-sal. El precipitado formado se filtra y se lleva a sequedad. Crudo de reacción de calor café se purifica mediante cromatografía en columna de sílica en fase 1:1 AcOEt:éter de petróleo. Finalmente, el producto se recrystaliza dos veces en DCM, dando lugar a 481 mg de cristales amarillos. (33% rendimiento). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.38 (d, *J* = 8.2 Hz, Ar-H<sub>6</sub>), 8.09 (d, *J* = 8.2 Hz, Ar-H<sub>5</sub>), 7.94 (d, *J* = 8.9 Hz, Ar-H<sub>4</sub>), 7.88 (d, *J* = 8.9 Hz, Ar-H<sub>3</sub>), 7.70 (t, *J* = 7.3 Hz, Ar-H<sub>2</sub>), 7.62 (d, *J* = 16.0 Hz, Vi-H<sub>2</sub>), 7.59 (t, *J* = 7.2 Hz, Ar-H<sub>1</sub>), 6.92 (d, *J* = 16.0 Hz, Vi-H<sub>1</sub>), 6.90 (d, *J* = 3.1 Hz, Fu-H<sub>2</sub>), 6.49 (d, *J* = 3.3 Hz, Fu-H<sub>1</sub>), 5.41 (t, *J* = 5.8 Hz, OH), 4.50 (d, *J* = 5.8 Hz, CH<sub>2</sub>).

### 6.8.2. Síntesis de (*E*)-(5-(2-(nafto[1,2-d]oxazol-2-il)vinil)furan-2-il)2-bromoacetato de metilo (C)

La formación del grupo acetiloxi se realizó utilizando un derivado de bromuro de acetilo en presencia de la base trietilamina.<sup>[61]</sup> La reacción ocurre en dos etapas, primero un ataque nucleofílico al grupo acetilo, seguido de la eliminación del halogenuro.

En un balón de 100 mL se adicionan 400 mg (1,4 mmol) de FN-11 sobre 40 mL de DCM. El balón se encuentra en un baño de agua-hielo, y bajo agitación vigorosa, se adicionan 383  $\mu$ L (2,8 mmol) de trietilamina gota a gota. Después de 15 minutos de agitación, se adicionan lentamente 300  $\mu$ L (3,4 mmol) de bromuro de bromoacetilo. Terminada la adición, el baño de agua-hielo se retira y la reacción se lleva a temperatura ambiente. Luego de 20 h, la solución de reacción se lava tres veces con 40 mL de solución brine y se extrae el producto con DCM. La purificación se realiza mediante cromatografía en columna de sílica en fase 2:1 hexano : AcOEt. Producto se cristaliza en MeOH y se obtienen 323 mg de cristales amarillo pálido. (60% rendimiento).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.38 (d,  $J = 8.2$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>), 8.10 (d,  $J = 8.2$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>), 7.96 (d,  $J = 9.0$  Hz, Ar-H<sub>4</sub>), 7.89 (d,  $J = 8.9$  Hz, Ar-H<sub>3</sub>), 7.71 (t,  $J = 7.5$  Hz, Ar-H<sub>2</sub>), 7.64 (d,  $J = 16.2$  Hz, Vi-H<sub>2</sub>), 7.60 (t,  $J = 7.6$  Hz, Ar-H<sub>1</sub>), 7.00 (d,  $J = 16.2$  Hz, Vi-H<sub>1</sub>), 6.96 (d,  $J = 3.3$  Hz, Fu-H<sub>2</sub>), 6.75 (d,  $J = 3.3$  Hz, Fu-H<sub>1</sub>), 5.25 (s, CH<sub>2</sub>), 4.26 (s, CH<sub>2</sub>).

### 6.8.3. Síntesis de bromuro de (*E*)-(2-((5-(2-(nafto[1,2-d]oxazol-2-il)vinil)furan-2-il)metoxi)-2-oxoetil)trifenilfosfonio (FN-12)

La síntesis del bromuro de trifenilfosfonio ocurre mediante un mecanismo del tipo S<sub>N</sub>2 en un solvente polar aprótico.

En un balón de 100 mL, bajo un ambiente seco y de N<sub>2</sub>, se adicionan 151 mg (0,57 mmol) de PPh<sub>3</sub> disuelto en 5 mL de ACN seco. Luego, gota a gota, se adiciona una solución de 240 mg (0,57 mmol) de C disuelto en 30 mL de ACN seco durante 1 h. Después de agitación vigorosa a temperatura ambiente durante 21 horas, el crudo de reacción se rotavapora, se disuelve en el mínimo de DCM para luego adicionarlo gota a gota a un vaso con dietiléter frío. El precipitado formado se filtra y se lava tres veces con AcOEt en ultrasonido. El filtrado se arrastra con acetona, lo que al llevarlo a sequedad resultan 140 mg de cristales color amarillo brillante (36 % rendimiento). Es importante mencionar que para este paso sintético se requiere que

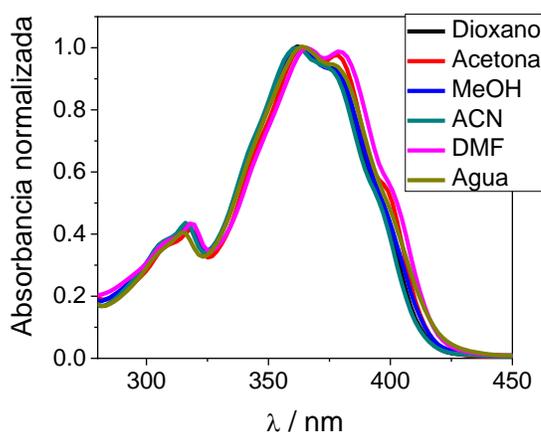
los reactivos posean un alto grado de pureza.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.41 (d,  $J = 8.1$  Hz, Ar-H<sub>6</sub>), 8.13 (d,  $J = 8.2$  Hz, Ar-H<sub>5</sub>), 8.05 – 7.48 (m, 20H), 6.92 (d,  $J = 3.2$  Hz, Fu-H<sub>2</sub>), 6.87 (d,  $J = 16.2$  Hz, Vi-H<sub>2</sub>), 6.63 (d,  $J = 3.3$  Hz, Fu-H<sub>1</sub>), 5.47 (d,  $J = 14.6$  Hz, CH<sub>2</sub>), 5.20 (s, CH<sub>2</sub>).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Caracterización fotofísica y fotoquímica

#### 7.1.1. Espectros de absorción

Los espectros de absorción de FN-12 se obtuvieron a temperatura ambiente en seis solventes representativos de la escala de polaridad; 1,2-dioxano, acetona, MeOH, ACN, DMF y agua. En la **Figura 9** se muestran los espectros de absorción normalizados utilizando el máximo de absorbancia. Para el espectro de acetona solo se grafican los datos desde los 333 nm debido a la interferencia propia del solvente.



Solvente	$\lambda_{\text{máx}}$ / nm
Dioxano	364
Acetona	363
MeOH	363
ACN	362
DMF	366
Agua	365

**Figura 9:** Espectros de absorción normalizados y máximos de absorción de FN-12 en diferentes solventes.

Los espectros de absorción muestran una banda de alta intensidad y de menor energía con el máximo alrededor de los 364 nm y una segunda banda más débil con el máximo de absorbancia alrededor de 315 nm. La posición del máximo de absorción es prácticamente independiente de la polaridad del solvente.

### 7.1.2. Coeficiente de absortividad molar

El coeficiente de absortividad molar ( $\epsilon$ ) se determinó mediante la ecuación de Lamber-Beer a partir de una curva de concentración versus absorbancia en los distintos solventes. Las curvas obtenidas muestran una dependencia lineal de la absorbancia con la concentración de FN-12 a valores de absorbancia  $< 1$ .

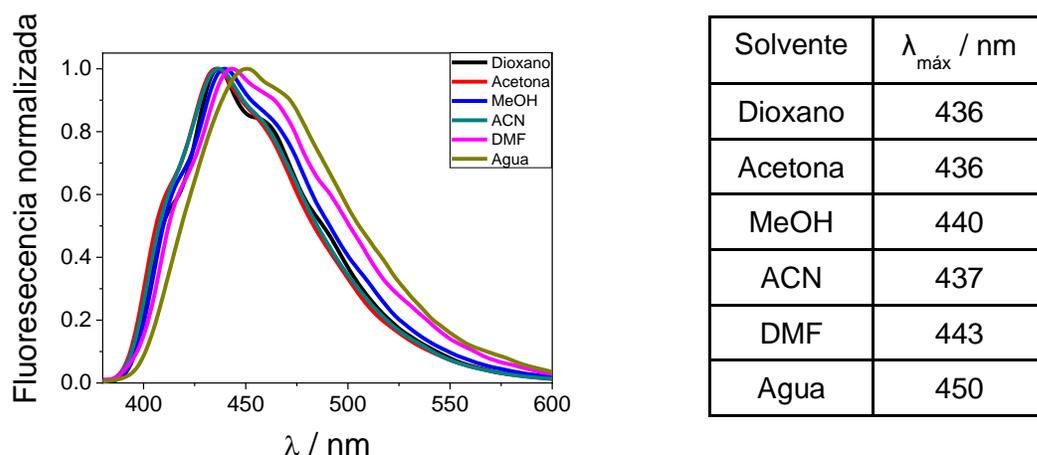
**Tabla 3:** Coeficientes de absortividad molar de FN-12 en diferentes solventes.

<b>Solvente</b>	<b>Dioxano</b>	<b>Acetona</b>	<b>MeOH</b>	<b>ACN</b>	<b>DMF</b>	<b>Agua</b>
$\epsilon$ [ $M^{-1} cm^{-1}$ ] / $10^4$	3,8	3,7	3,9	3,9	3,7	2,4

Los altos valores de los coeficientes de extinción molar, del orden de  $30.000 M^{-1}cm^{-1}$ , la ubicación del máximo de absorción y el análisis de los orbitales moleculares descritos para este tipo de moléculas <sup>[62]</sup> sugieren que las transiciones observadas para estos compuestos corresponden a transiciones del tipo  $\pi-\pi^*$ .

### 7.1.3. Espectros de emisión

Los espectros de emisión fueron obtenidos en el mismo conjunto de solventes utilizados para medir los espectros de absorción, a temperatura ambiente, utilizando una longitud de onda de excitación de 355 nm. La longitud de onda del máximo de emisión es ligeramente dependiente de la naturaleza del solvente, como se observa en la Figura 15.

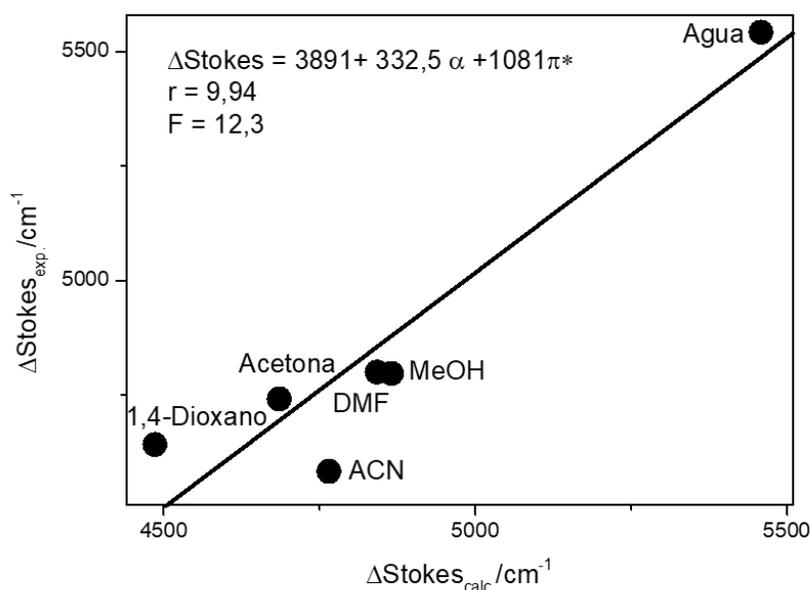


**Figura 10:** Espectros de emisión fluorescente normalizados de FN-12. Tabla de los máximos de emisión de FN-12 en diferentes solventes ( $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm).

A medida que aumenta la polaridad del solvente, se observa un leve desplazamiento de la banda de emisión hacia longitudes de ondas mayores.

#### 7.1.4. Análisis multiparamétrico de los desplazamientos de la fluorescencia

Para obtener un análisis más detallado del desplazamiento de los máximos de emisión de fluorescencia producto de la interacción con el solvente, se utiliza la ecuación LSER descrita anteriormente.



**Figura 11:** Corrimiento de Stokes en función de ecuación LSER.

El corrimiento de Stokes muestra una correlación razonable con los parámetros microscópicos  $\pi^*$  y  $\alpha$ . Este resultado indica que el estado excitado es estabilizado por solventes con elevada capacidad para estabilizar cargas y/o dipolos, y por solventes que tienen alta posibilidad de donar enlace de hidrógeno, lo que sugiere que el estado excitado de la sonda tiene un carácter de transferencia parcial de carga.

### 7.1.5. Rendimiento cuántico de fluorescencia

Se determinan los rendimientos cuánticos de fluorescencia utilizando el método de Eaton y Demas, empleando las condiciones descritas en el capítulo anterior y en el mismo conjunto de solventes. Se utilizan dos actinómetros; sulfato de quinina en solución 0,1 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 9,10-dimetilantraceno en etanol.

**Tabla 4:** Rendimientos cuánticos de fluorescencia de FN-12.

Solvente	Sulfato de quinina	9,10-dimetilantraceno
Dioxano	$\phi_F = 0,092 \pm 0,004$	$\phi_F = 0,046 \pm 0,002$
Acetona	$\phi_F = 0,044 \pm 0,002$	$\phi_F = 0,053 \pm 0,003$
MeOH	$\phi_F = 0,025 \pm 0,001$	$\phi_F = 0,035 \pm 0,002$
ACN	$\phi_F = 0,038 \pm 0,002$	$\phi_F = 0,062 \pm 0,003$
DMF	ND <sup>a</sup>	$\phi_F = 0,017 \pm 0,0009$
Agua	$\phi_F = 0,012 \pm 0,006$	$\phi_F = 0,021 \pm 0,001$

<sup>a</sup> No disponible.

En la **Tabla 3** se muestra que FN-12 presenta bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia, independiente de la naturaleza del solvente. En comparación con los ariloxazoles, los que presentan rendimientos cuánticos de fluorescencia elevados <sup>[54]</sup>, en el rango de 0,7 a 1, para el FN-12 el grupo furilo actúa como un efectivo desactivante de la fluorescencia del anillo oxazol, como consecuencia de una desactivación por transferencia de carga.

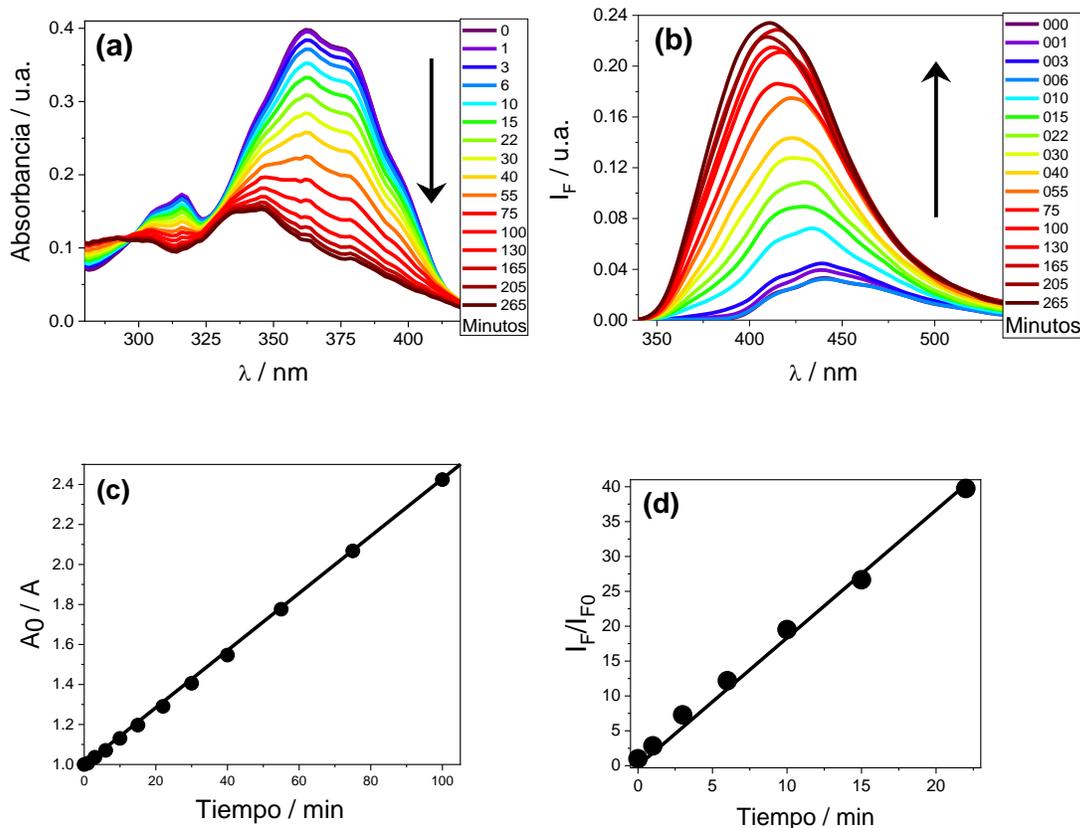
## 7.2. Reactividad de FN-12 frente a $^1\text{O}_2$

La capacidad de la sonda FN-12 para reaccionar con  $^1\text{O}_2$  fue estudiada utilizando métodos estacionarios, observando los cambios en los espectros de absorción y emisión, y mediante métodos resueltos en el tiempo, evaluando los cambios en el decaimiento de la luminiscencia del oxígeno excitado en función de la concentración de sonda. La fotosensibilización se lleva a cabo en MeOH utilizando los sensibilizadores NMB y RoBen.

### 7.2.1. Métodos estacionarios

#### 7.2.1.1. Fotosensibilización con NMB

La **Figura 12** muestra los cambios en los espectros de absorción y emisión fluorescente de FN-12 observados en un lapso de 265 minutos de irradiación del sensibilizador NMB. El seguimiento de la fluorescencia se realiza a una longitud de onda de excitación de  $\lambda_{\text{exc}} = 330$  nm y de recolección en el rango de  $\lambda_{\text{emi}} = 340 - 550$  nm.

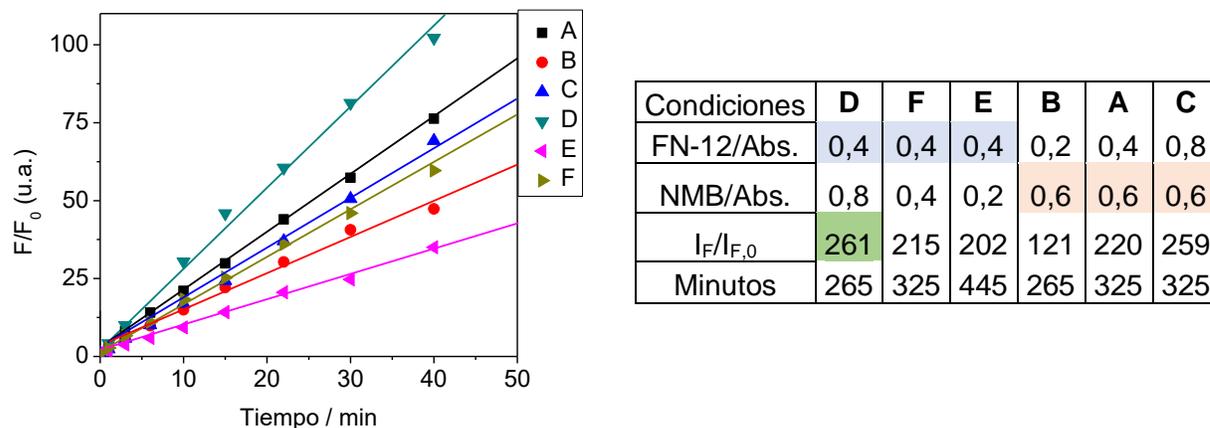


**Figura 12:** Espectro de absorción (a) y de emisión (b) de FN-12 durante la fotosensibilización ( $\lambda_{exc} = 330$  nm). Dependencia de la absorbancia (c) y fluorescencia (d) con el tiempo de irradiación del sensibilizador NMB.

La sonda muestra una sustantiva disminución del máximo de absorción de la banda de menor energía del espectro y presenta un punto isosbético alrededor de los 300 nm, lo que se relaciona con la formación de un fotoproducto. En el espectro de emisión se observa un sustantivo aumento de fluorescencia con un desplazamiento hipsocrómico. Además, tanto la disminución de la absorbancia como el aumento de la emisión fluorescente varían de forma lineal con el tiempo de irradiación. Estos resultados nos indican que ocurre una reacción entre el anillo furilo de la sonda con  $^1O_2$ , en donde la cicloadición [2 + 4] al anillo furano irrumpe la extensión de la aromaticidad, cancelando la ICT, dando lugar a la formación de un fotoproducto que posee un rendimiento cuántico de fluorescencia mucho mayor que FN-12.

Para la optimización de las condiciones de fotosensibilización, se realizan cinéticas con diferentes proporciones FN-12:NMB. Todos los experimentos se realizaron bajo

las mismas condiciones de irradiación; igual distancia de fuente lumínica, intensidad del led, celda de fluorescencia y volumen empleado.

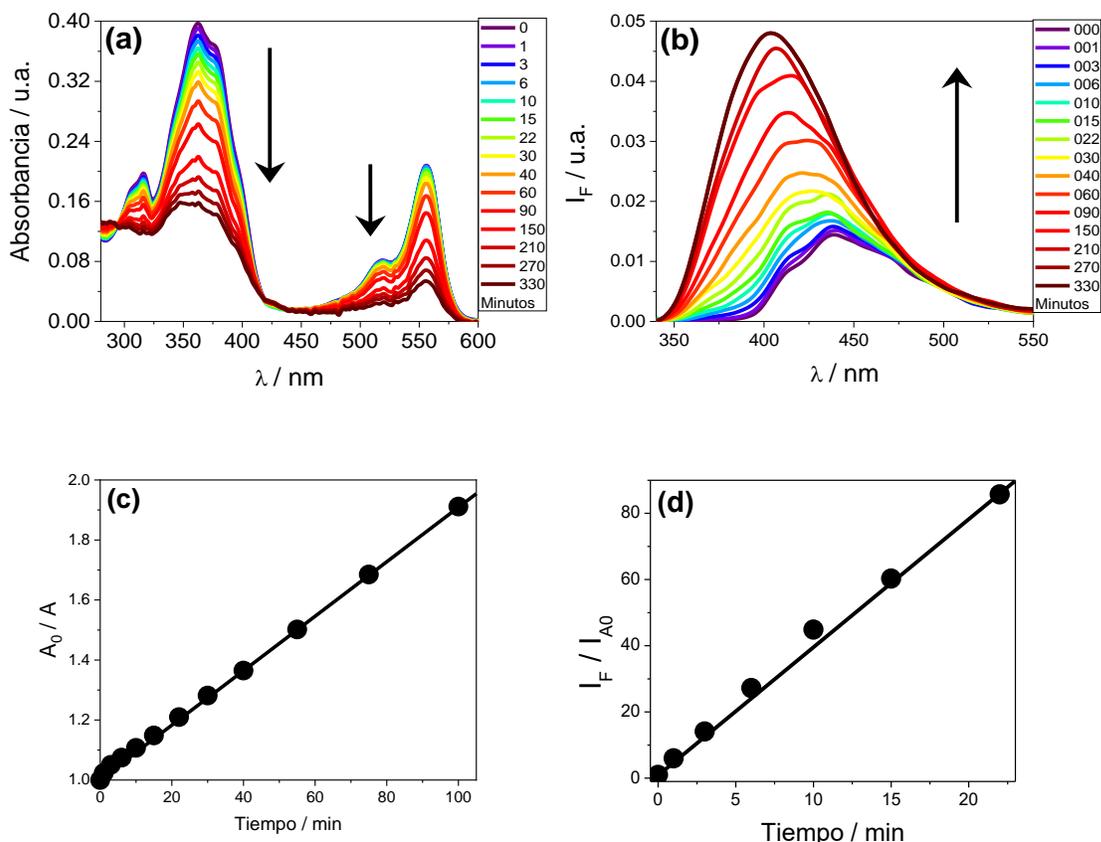


**Figura 13:** Aumento relativo de fluorescencia bajo diferentes proporciones FN-12:NMB. Tabla de las condiciones utilizadas. Ajuste de absorbancia en u.a.

Se obtiene una rápida respuesta y una mayor sensibilidad para las condiciones de fotosensibilización de FN-12 con el sensibilizador NMB en proporción 1:2 FN-12:NMB, generando un aumento relativo de fluorescencia de 261 veces en 265 minutos de fotólisis.

### 7.2.1.2. Fotosensibilización con RoBen

La **Figura 14** muestra los cambios en los espectros de absorción y emisión fluorescente de FN-12 observados en un lapso de 330 minutos de irradiación del sensibilizador RoBen. El seguimiento de la fluorescencia se realiza bajo las mismas condiciones que para el sensibilizador NMB.

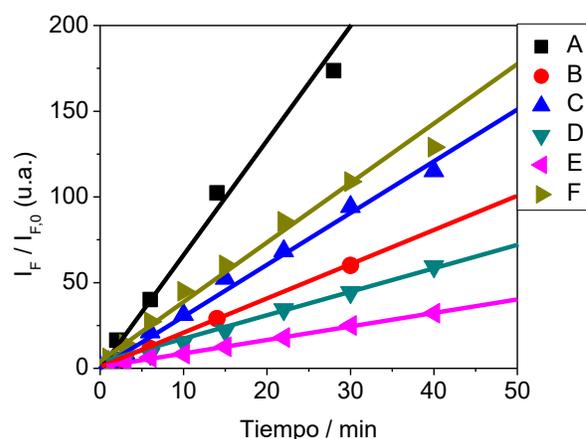


**Figura 14:** (a) Espectro de absorción de FN-12 (izquierda) y RoBen (derecha). (b) Espectro de emisión de FN-12 durante la fotosensibilización ( $\lambda_{exc} = 330$  nm). Dependencia de la absorbancia (c) y fluorescencia (d) con el tiempo de irradiación del sensibilizador RoBen.

Al igual que para el sensibilizador NMB, tanto la disminución de la absorbancia como el aumento de la emisión fluorescente varían de forma lineal con el tiempo.

Se observa que durante la fotosensibilización con RoBen, éste muestra una disminución de las bandas de absorción conforme al tiempo, lo que indica que se consume durante la fotosensibilización. Este resultado se discutirá más adelante.

Para la optimización de las condiciones de fotosensibilización, se realizan cinéticas con diferentes proporciones FN-12:RoBen.



Condiciones	C	D	E	F	A	B
FN-12/Abs.	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,8
RoBen/Abs.	0,8	0,4	0,2	0,6	0,6	0,6
$I_F/I_{F,0}$	252	171	113	260	581	298
Minutos	230	230	270	230	176	354

**Figura 15:** Aumento relativo de fluorescencia bajo diferentes proporciones FN-12:RoBen. Tabla de las condiciones utilizadas. Ajuste de absorbancia en u.a.

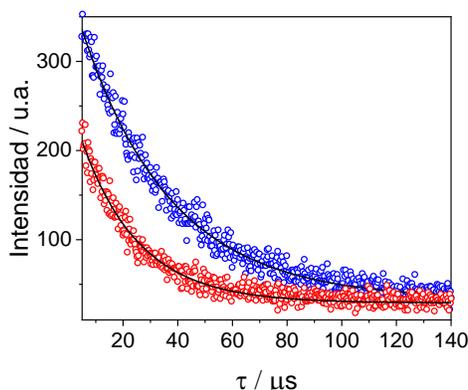
Se obtiene una rápida respuesta y una mayor sensibilidad para las condiciones de fotosensibilización de FN-12 con el sensibilizador RoBen en una proporción 2:3 FN-12:RoBen, generando un aumento relativo de fluorescencia de 581 veces en 176 minutos de fotólisis.

Si comparamos las respuestas de la sonda frente a la generación de  $^1O_2$  mediante fotosensibilización con los dos sensibilizadores, se obtiene una respuesta mayormente favorable con RoBen, en donde se alcanza un mayor aumento de fluorescencia en tiempos más cortos. Entonces podemos suponer que existe una interacción entre RoBen y la sonda FN-12, o entre RoBen y el fotoproducto, y es una de estas posibilidades, la razón del mayor aumento de la fluorescencia. Se discutirá nuevamente más adelante.

## 7.2.2. Métodos resueltos en el tiempo

### 7.2.2.1. Fotosensibilización con NMB

La reactividad de FN-12 hacia el  $^1\text{O}_2$  se determinó midiendo la constante de velocidad total ( $k_t$ ) y reactiva ( $k_r$ ), observando la disminución del tiempo de vida de la luminiscencia del  $^1\text{O}_2$  en metanol-d y  $\text{D}_2\text{O}$ , empleando NMB como sensibilizador.



**Figura 16:** Intensidad de fosforescencia del  $^1\text{O}_2$  con el sensibilizador NMB, en ausencia (azul) y presencia (rojo) de FN-12.

En la **Figura 16** se observa la disminución de la intensidad de fosforescencia del  $^1\text{O}_2$  en presencia de la sonda FN-12, lo que indica que la sonda desactiva el  $^1\text{O}_2$  generado por el sensibilizador.

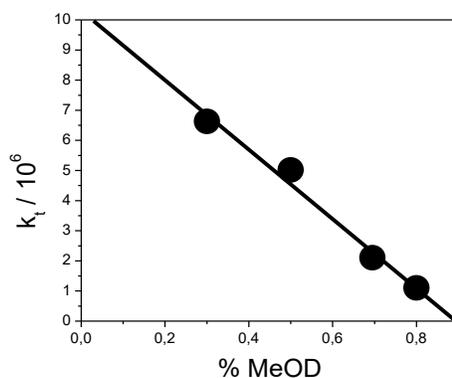
La constante de desactivación total  $k_t$  se calcula utilizando la ecuación (3):

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \tau_0 k_T [M]$$

Generando un gráfico de Stern-Volmer, se observa la dependencia lineal de la constante de decaimiento del  $^1\text{O}_2$  con la concentración de FN-12. El valor calculado de  $k_t$  para el sensibilizador NMB es de  $2,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Debido a que la sonda precipita en agua bajo las concentraciones utilizadas, no es posible calcular la  $k_t$  directamente en solución acuosa. Para estimar su valor, se

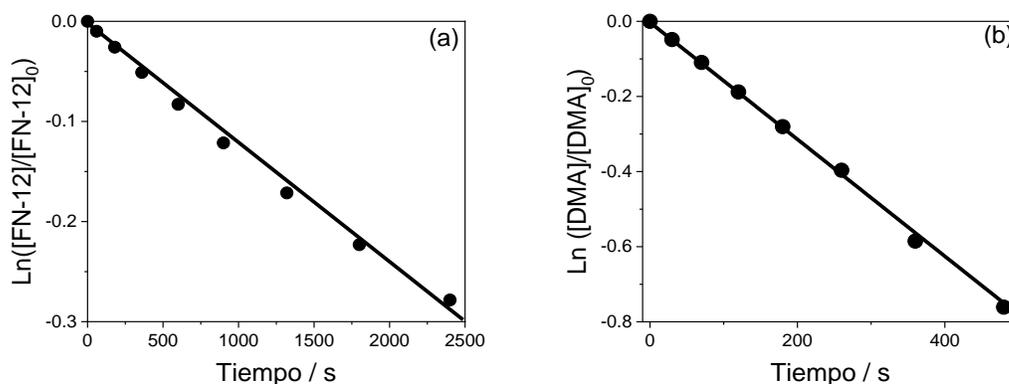
realizaron mediciones en cubetas con D<sub>2</sub>O adicionando diferentes alícuotas de la sonda FN-12 disuelta en MeOD, calculando a cada una de ellas una  $k_t$ .



**Figura 17:** Constante total versus % MeOD en mezclas MeOD / D<sub>2</sub>O.

El valor de  $k_t$  en D<sub>2</sub>O se obtiene del intercepto del gráfico % MeOD versus  $k_t$ . El valor estimado de la  $k_t$  en D<sub>2</sub>O es de  $1,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

El cálculo de constante reactiva ( $k_r$ ) se realiza bajo condiciones de pseudo primer orden, concentración de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> constante y utilizando 9,10-dimetilantraceno como actinómetro. En la **Figura 18** se observa el consumo de la sonda FN-12 y del actinómetro DMA expresado en términos del Ln del cociente de la absorbancia y absorbancia inicial, en función del tiempo de irradiación.



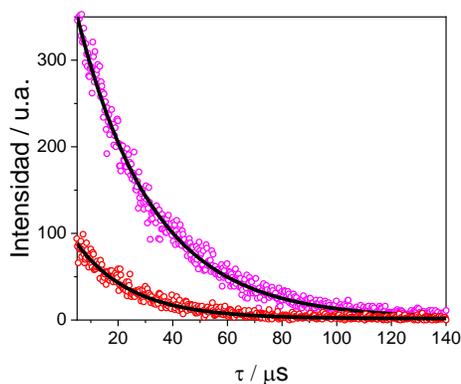
**Figura 18:** Gráficos de cinética de pseudo primer orden para (a) FN-12 y (b) DMA frente a <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generado por fotosensibilización con NMB.

De los gráficos de la **Figura 18**, se calculan las  $k_t$  experimentales, y luego utilizando la ecuación (8) de proporcionalidad entre la  $k_t$  y  $k_r$ , el valor calculado de la  $k_r$  de FN-12 frente a  $^1\text{O}_2$  generado por el sensibilizador NMB es de  $2,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

La alta similitud en los valores obtenidos de  $k_t$  ( $2,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) y  $k_r$  ( $2,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) indican que la sonda FN-12 desactiva principalmente el  $^1\text{O}_2$  de forma química, siendo despreciable la contribución por desactivación física.

#### 7.2.2.2. Fotosensibilización con RoBen

Al igual que para el sensibilizador NMB, la reactividad de FN-12 hacia el  $^1\text{O}_2$  se determina calculando las constantes de velocidad total ( $k_t$ ) y reactiva ( $k_r$ ) observando la disminución del tiempo de vida de la luminiscencia del  $^1\text{O}_2$  en  $\text{CH}_3\text{-OD}$ .

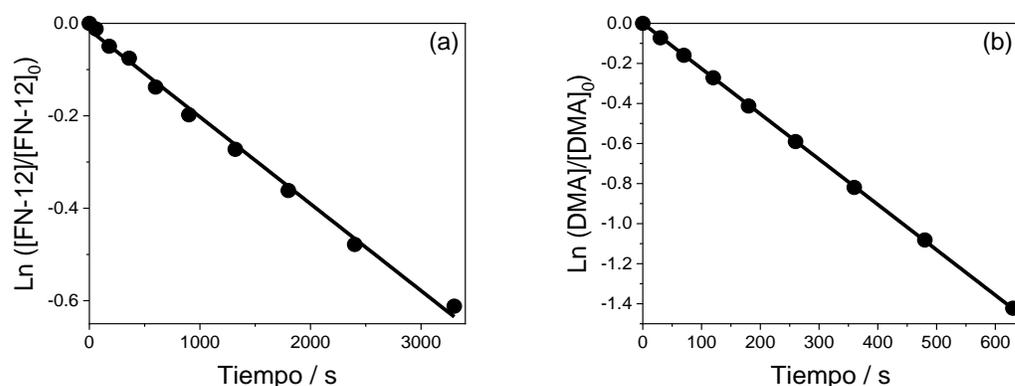


**Figura 19:** Intensidad de fosforescencia del  $^1\text{O}_2$  con el sensibilizador RoBen, en ausencia (rosa) y presencia (rojo) de FN-12.

En la **Figura 19** se observa una disminución de la amplitud a tiempo cero de la señal de fosforescencia del  $^1\text{O}_2$  en presencia de la sonda FN-12.

Al igual que para el sensibilizador NMB, la constante de desactivación total  $k_t$  se calcula utilizando la ecuación (3), generando un gráfico de Stern-Volmer. El valor calculado de  $k_t$  para el sensibilizador RoBen es de  $2,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

El cálculo de constante reactiva ( $k_r$ ) se realiza de la misma forma que para el sensibilizador NMB. En la **Figura 20** se observa el consumo de la sonda FN-12 y del actinómetro DMA expresado en términos del Ln del cociente de la absorbancia y absorbancia inicial, en función del tiempo de irradiación.



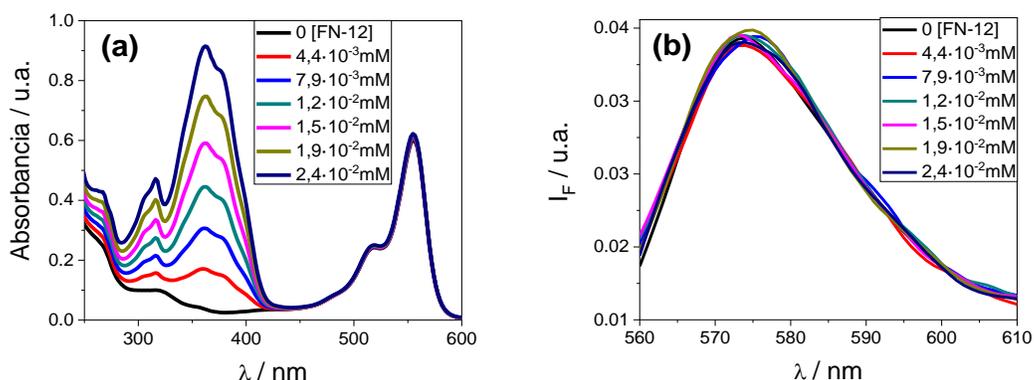
**Figura 20:** Gráficos de cinética de pseudo primer orden para (a) FN-12 y (b) DMA frente a  $^1\text{O}_2$  generado por fotosensibilización con RoBen.

De los gráficos de la **Figura 20**, se calculan las  $k_t$  experimentales, y luego utilizando la ecuación (8) de proporcionalidad entre la  $k_t$  y  $k_r$ , el valor calculado de la  $k_r$  de FN-12 frente a  $^1\text{O}_2$  generado por el sensibilizador RoBen es de  $3,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

La constante total describe los procesos bimoleculares de desactivación del  $^1\text{O}_2$  y por lo tanto la constante reactiva debe ser menor o igual a la constante total dependiendo de la contribución en la desactivación física del quencher. Para el caso de la fotosensibilización con RoBen, la constante reactiva ( $3,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) es mayor a la constante total ( $2,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), lo que indica que puede estar ocurriendo más de un proceso a la vez.

Para estudiar el consumo de RoBen durante la fotosensibilización, se proponen dos posibles mecanismos de reacción; a) El sensibilizador RoBen es capaz de reaccionar con la sonda FN-12, o b) RoBen en estado excitado (RoBen\*) reacciona con la sonda y/o con el fotoproducto.

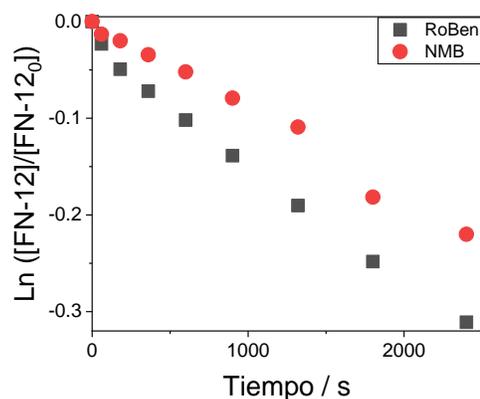
Para estudiar el mecanismo a) se observa el espectro de absorción y emisión del sensibilizador RoBen en función de la concentración de FN-12. La excitación se realiza a una longitud de onda de 555 nm.



**Figura 21:**(a) Espectro de absorción de FN-12(izquierda) y RoBen (derecha) variando la concentración de FN-12. (b) Espectro de emisión de RoBen a diferentes concentraciones de FN-12.

Tanto el espectro de absorción como el de emisión de RoBen permanecen inalterables al aumento de la concentración de la sonda. Esto demuestra que no existe una interacción entre RoBen y FN-12 en el estado basal, por lo tanto, se descarta el mecanismo propuesto a).

Para evaluar el mecanismo b), se grafica el Ln de la variación de la concentración de la sonda FN-12 conforme al tiempo de irradiación, para ambos sensibilizadores.



**Figura 22:** Gráficos de cinética de pseudo primer orden para FN-12 y  $^1\text{O}_2$  generado por fotosensibilización con NMB (rojo) y RoBen (gris).

Considerando que la **Figura 22** se genera bajo condiciones estacionarias de  $^1\text{O}_2$ , para el sensibilizador RoBen la pendiente es ligeramente mayor que para el NMB, lo que quiere decir que la sonda se consume más rápidamente. Este resultado muestra que para el sensibilizador RoBen se abre un camino adicional. Se proponen tres posibles caminos adicionales:

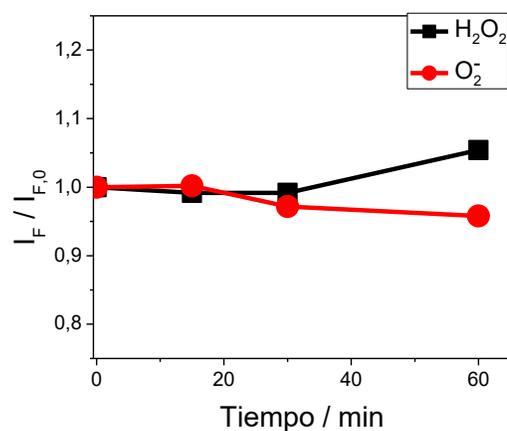
- El sensibilizador en estado excitado (RoBen\*) es capaz de reaccionar con la sonda.
- El sensibilizador en estado excitado (RoBen\*) es capaz de reaccionar con el fotoproducto.
- El sensibilizador genera ROS mediante reacciones del Tipo I.

Debido al tiempo disponible, no se realizaron mayores estudios para dilucidar esta propuesta.

Finalmente, los valores de la constante de velocidad total para ambos sensibilizadores son similares entre sí. En comparación a otras sondas fluorescentes, como DMAX y DPAX, a las que se ha calculado una  $k_r$  igual a  $2,5 \cdot 10^7$  y  $8,1 \cdot 10^5$ , respectivamente, la sonda FN-12 posee constante reactivas bastante aceptables, acorde al orden de magnitud para sondas similares.

### 7.3. Selectividad frente a otras ROS

Un aspecto fundamental en el diseño de una sonda es que sea específica para el sustrato que se intenta detectar y cuantificar. Teniendo en consideración que en los sistemas bajo estrés oxidativo se generan diferentes ROS, es importante demostrar que la sonda FN-12 no reacciona con éstas. Por lo tanto, se evalúa la reactividad de FN-12 frente a peróxido de hidrógeno y radical superóxido en una concentración 1:10 FN-12:ROS.



**Figura 23:** Aumento relativo de fluorescencia frente a  $H_2O_2$  y  $O_2^-$ .

En la **Figura 23** se observa el aumento de fluorescencia del FN-12 en metanol antes y después de adicionar un exceso de  $H_2O_2$  y mantener a temperatura ambiente por 60 min. Lo mismo se realiza para el superóxido. No se aprecia un aumento de fluorescencia significativo, por lo que la sonda FN-12 es selectiva para  $^1O_2$  frente a estas ROS.

### 7.4. Autosensibilización de $^1O_2$

La autosensibilización es uno de los problemas frecuentes que presentan sondas fluorescentes que incorporan sistemas policíclicos aromáticos o colorantes como parte de su estructura. Consecuentemente, se evaluó la producción de  $^1O_2$  por la

sonda FN-12. Se observan las señales de la fosforescencia del  $^1\text{O}_2$  al irradiar FN-12 y fenalenona, por separado, bajo las mismas condiciones experimentales, en donde el comparar la amplitud a tiempo cero de la señal de decaimiento del  $^1\text{O}_2$ , permite calcular el rendimiento cuántico de generación de  $^1\text{O}_2$  de la sonda.

El valor obtenido es de  $\Phi_{\Delta} = 0,02 \pm 0,001$ . Esto demuestra que, aunque la sonda FN-12 produce  $^1\text{O}_2$ , lo hace con un bajo rendimiento cuántico, comparado con la sonda comercial SOSG que tiene un rendimiento de  $\Phi_{\Delta} = 0,06$ .

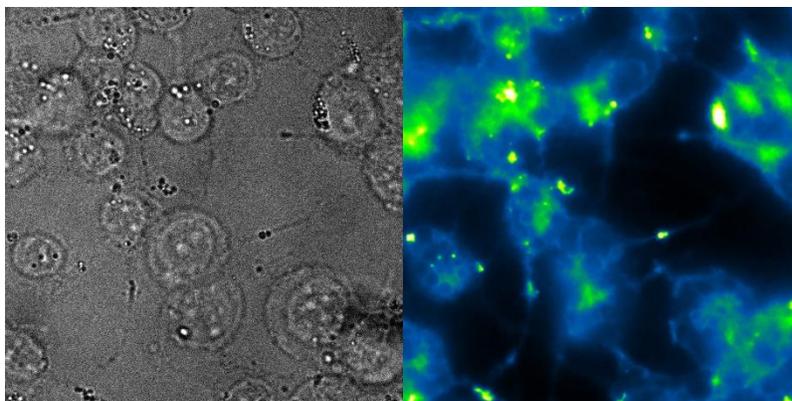
## 7.5. Microscopía de fluorescencia

Como se comentó anteriormente, las técnicas de fluorescencia son sin duda las más convenientes para detectar y cuantificar la formación de  $^1\text{O}_2$  en células y estructuras sub-celulares, debido a que son capaces de proporcionar información “in situ” en tiempo real, y además, son metodologías no destructivas de elevada sensibilidad.

Para estudiar el comportamiento de la sonda FN-12 en sistemas celulares, se utilizan células de la línea SH-SY5Y de neuroblastoma humano.

Antes de los experimentos, las células son incubadas por 72 horas en un cubreobjetos de 25 mm de diámetro, el que se utiliza posteriormente para el registro de la fluorescencia. Se prepara una solución madre de FN-12 en DMSO de 10 mM.

En el primer experimento, se adiciona una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  de sonda en el medio celular de mantenimiento (HBBS). Se esperan 20 minutos y se procede a la observación.

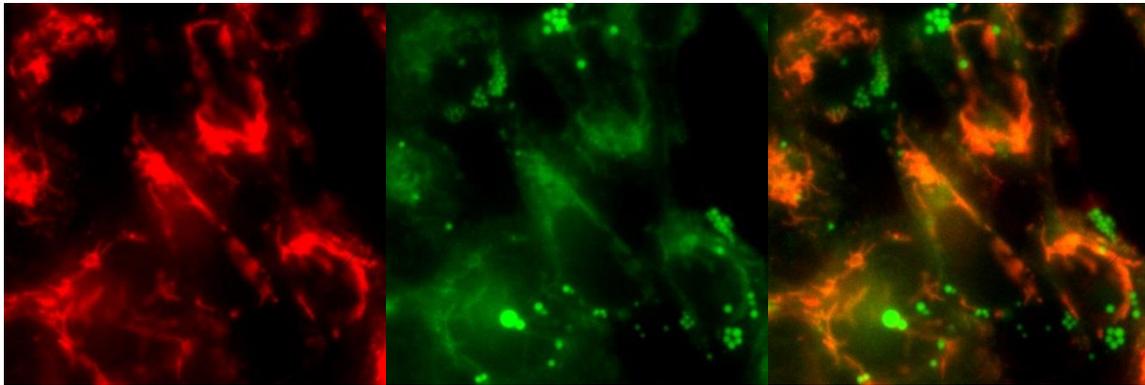


**Imagen 1:** Imágenes confocales de células SH-SY5Y incubadas con FN-12. Microscopía de campo claro (izquierda) y de fluorescencia UV-Vis (derecha) ( $\lambda_{exc} = 353 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{emi} = 465 \text{ nm}$ ).

La **Imagen 1** da cuenta que la sonda FN-12 puede ser observada de forma directa utilizando microscopía de fluorescencia UV-Vis y es capaz de penetrar la membrana celular de forma sencilla, ya que no requiere de largos tiempos de incubación. También se puede observar que la sonda se aloja y concentra en algún compartimiento celular (zonas verdes).

El siguiente experimento se realiza para estudiar la distribución subcelular de la sonda, en donde la adición de un grupo trifenilfosfonio, tendría como objetivo direccionar la sonda hacia la mitocondria. Para comprobar esta hipótesis, se compara la ubicación de FN-12 dentro de la célula con un marcador mitocondrial comercial MitoTracker Red.

Las células se incubaron con  $10 \mu\text{M}$  de FN-12 y  $0,5 \mu\text{M}$  de MitoTracker Red durante 20 minutos. Luego se toman las imágenes en dos canales diferentes, uno para observar el MitoTracker y otro para la sonda FN-12.



(a)

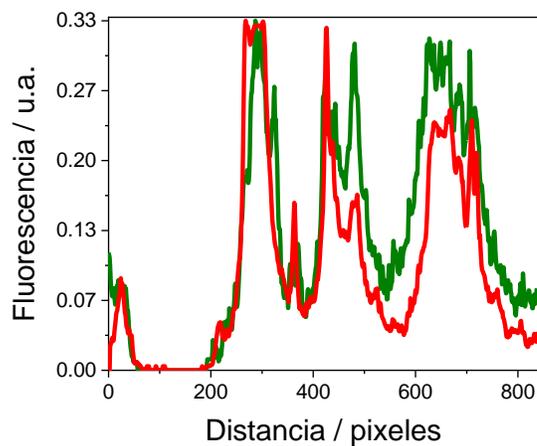
(b)

(c)

**Imagen 2:** Localización intracelular de MitoTracker Red (a) ( $\lambda_{exc} = 557 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{emi} = 572$ ) y FN-12 (b) ( $\lambda_{exc} = 353 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{emi} = 465 \text{ nm}$ ). (c) superposición de (a) y (b).

En la **Imagen 2** se observa que la sonda FN-12 (verde) se encuentra en zonas similares al MitoTracker (rojo), pero además se concentra en reservorios de gotas de lípidos. Con la superposición de la imagen (a) y (b), a simple vista, se observa una colocalización entre la sonda y el marcador mitocondrial.

Para comprobar la colocalización mitocondrial, se realiza una superposición de gráficos en 2D de la fluorescencia en una zona arbitraria de la imagen.



**Figura 24:** Escaneo lineal de fluorescencia combinado, MitoTracker (rojo) y sonda FN-12 (verde).

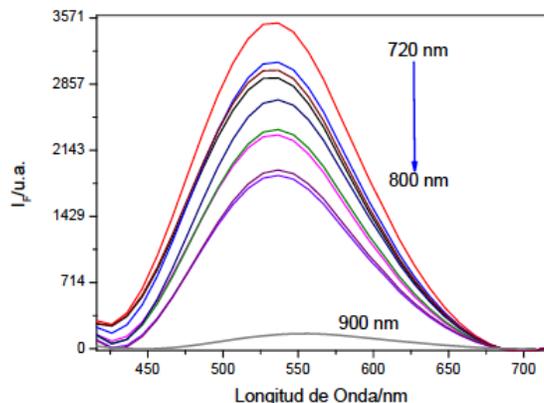
De la **Figura 24** se puede observar que los picos de emisión fluorescente de determinados pixeles de ambos canales se solapan entre sí, lo que significa que el MitoTracker y la sonda FN-12 se encuentran en el mismo espacio de la observación microscópica.

Dado los antecedentes presentados, se comprueba que la incorporación de un grupo trifenilfosfonio a una sonda del tipo FN, permite la penetración celular y además direcciona su localización hacia la mitocondria.

## 7.6. Espectroscopía de fluorescencia bifotónica

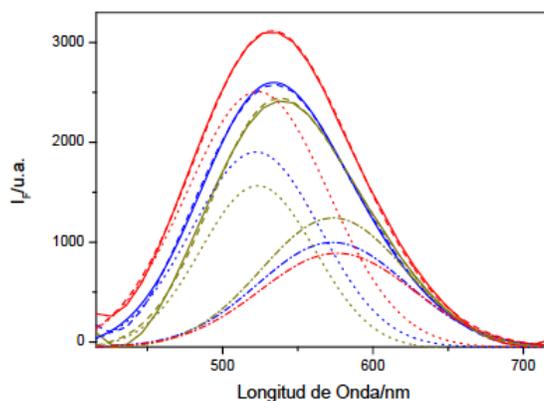
La microscopía bifotónica de fluorescencia posee significativas ventajas por sobre la monofotónica, dentro de ellas, posee una mayor capacidad de penetración en tejidos, menores señales de interferencia y fotoblanqueo. Además, ha sido utilizada para la generación de imágenes en vivo. <sup>[63]</sup> Por esta razón, se estudia el comportamiento fotofísico de la sonda FN-12 en condiciones de excitación bifotónica.

Los espectros de fluorescencia de excitación bifotónica se obtienen empleando una serie de longitudes de onda de excitación entre 700 y 900 nm. Los espectros muestran que el máximo de emisión se desplaza hacia el rojo a medida que aumenta la longitud de onda del láser empleado para la excitación, desde 536 nm (excitación a 720 nm) hasta 554 nm (excitación a 900 nm), como se observa en la **Figura 25**.



**Figura 25:** Dependencia del espectro de fluorescencia bifotónica de FN-12 con la longitud de onda de irradiación. Espectros corregidos por la potencia del láser.

Este resultado es indicativo de que el espectro de emisión proviene de más de una especie, comportamiento esperable, dado que los experimentos se realizaron sin purificación previa de la muestra sometida a fotosensibilización (debido a razones de tiempo y cantidad de sustrato) y sólo fueron removidos el sensibilizador utilizado (NMB) y el solvente. Sin embargo, la contribución de cada especie, sonda inicial y producto de la reacción de sensibilización puede ser razonablemente obtenida realizando la deconvolución del espectro experimental como se muestra en la **Figura 26**.



**Figura 26:** Espectros de fluorescencia bifotónica de FN-12 obtenidos con irradiación a diferentes longitudes de onda del láser. El espectro total corresponde a la suma de dos señales que fueron deconvolucionadas, centradas a 523 y 573 nm.

La deconvolución del espectro experimental sugiere que éste corresponde a la contribución de dos señales de fluorescencia centradas a 523 nm y 573 nm, que posiblemente corresponden al fotoproducto y a la sonda de partida, respectivamente.

Por otra parte, una notable diferencia se observa en los espectros de emisión bifotónica con relación a los espectros de emisión monofotónica. En el espectro bifotónico deconvolucionado, las bandas de emisión del fotoproducto y la sonda aparecen desplazados hacia el rojo alrededor de 125 y 114 nm, respectivamente. Este comportamiento es anómalo y es poco observado en experimentos de espectroscopía bifotónica, sin embargo, ha sido previamente descrito para el FN-11. En el caso del FN-11, el espectro de emisión bifotónico, respecto del monofotónico, se desplaza 90 y 84 nm para el fotoproducto y la sonda inicial, respectivamente.

Previamente se ha descrito para el compuesto del tipo D- $\pi$ -A, 1,3-difenil-6,8-bis-(4'-N,N-dimetilfeniletinil)pireno, un desplazamiento hacia el rojo de 49 nm del máximo correspondiente al espectro de emisión bifotónico respecto del máximo de emisión observado en la fluorescencia normal, sin embargo, los autores no proponen una explicación clara para este comportamiento. <sup>[64]</sup> Ellos sugieren que podría deberse a un efecto de reabsorción, pero este efecto conduce a desplazamientos pequeños del máximo de emisión bifotónico, del orden de 3 a 6 nm, y ha sido descrito para sistemas sólidos o para fluoróforos unidos a nanopartículas. Alternativamente, han sugerido que tal corrimiento al rojo de los espectros de emisión se puede atribuir a diferentes estados emisores a los que se accede mediante la excitación de uno o dos fotones, sin que se dé ninguna evidencia experimental o teórica que soporte esta conclusión, y que además, no es compatible con las reglas de selección que regulan el comportamiento fotofísico en este tipo de experimentos.

En el caso de este trabajo, es probable que dada la alta intensidad del láser empleado para la excitación bifotónica, se promuevan procesos fotoquímicos competitivos con el decaimiento de la fluorescencia que conduzcan a fotoproductos

estables (probablemente con un fuerte carácter de transferencia de carga en el estado excitado) que produce la emisión observada.

Por último, tanto la sonda FN-12 como el fotoproducto responden positivamente frente a experimentos de excitación bifotónica, siendo posible su utilización en este tipo de sistemas.

## 8. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar y caracterizar un derivado trifenilfosfonio de furilvinilnaftoxazol, utilizando un éster como grupo enlazador (FN-12).

Se estudian las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de la sonda FN-12, donde los resultados indican que la sonda presenta bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia, elevada reactividad frente a  $^1\text{O}_2$ , donde luego de reaccionar con él, se observa un aumento relativo de fluorescencia de 581 veces. También la sonda presenta elevada selectividad frente a otras ROS y posee una baja autosensibilización, por lo que FN-12 cumple con las características y requisitos para su uso como sonda de  $^1\text{O}_2$ .

No se logró caracterizar el o los fotoproductos de FN-12 y  $^1\text{O}_2$  debido a no contar con un espectrómetro de masas disponible.

A continuación de los experimentos realizados en solución, se observa la localización intracelular de FN-12 mediante microscopía de fluorescencia, donde se comprueba su localización mitocondrial. Además, es interesante mencionar que la fluorescencia inicial de FN-12, aunque es baja, fue de gran utilidad para su visualización.

Los experimentos de excitación bifotónica muestran que tanto la sonda como el fotoproducto presentan respuesta fluorescente para este tipo de sistemas.

Por último, no se realizaron experimentos en microscopía fluorescente bifotónica para monitorear la generación de  $^1\text{O}_2$  en medios celulares debido, principalmente, a no tener acceso a un sensibilizador capaz de generar  $^1\text{O}_2$  en las cercanías de la mitocondria. Se espera para más adelante poder realizar experimentos que comprueben la hipótesis planteada: FN-12 sería capaz de monitorear la producción y/o consumo de  $^1\text{O}_2$  en mitocondrias.

## REFERENCIAS

- [1] Edward L. Clennan, (2016). Overview of the Chemical Reactions of Singlet Oxygen, Applications in Biosciences and Nanosciences. (Vol. 2, pp. 355). Cambridge, UK. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences.
- [2] A. A. Gorman & M. A. J. Rodgers. (1989). *CRC Handbook of Organic Photochemistry*, ed. J. C. Scaiano, CRC Press, Boca Raton, FL, (2), 229–247.
- [3] Schweitzer C. & Schmid R. (2003). Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chem. Rev.* 103, 1685–1757.
- [4] Wilkinson F. & Ross B. A. (1995). Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 24, 663.
- [5] J. R. Hurst & G. B. Schuster. (1983). Nonradiative Relaxation of Singlet Oxygen in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* (105), 5756–5760
- [6] Mikkel Bregnhøj, M. 2018. The Electronic Transitions of Molecular Oxygen. Switzerland, Springer Theses.
- [7] T. Montagnon, G. Vassilikogiannakis. (2014). Furans and singlet oxygen – why there is more to come from this powerful partnership. *Chem. Commun.* (50), 15480–15498
- [8] E. L. Clennan and M. E. Mehrsheikh-Mohammadi. (1983). Addition of Singlet Oxygen to Conjugated Dienes. The Mechanism of Endoperoxide Formation. *J. Am. Chem. Soc.* (105) 5932–5933.
- [9] E. L. Clennan and M. E. Mehrsheikh-Mohammadi. (1984). Mechanism of Endoperoxide Formation. 3. Utilization of the Young and Carlsson Kinetic Techniques. *J. Am. Chem. Soc.* (106) 7112–7118.
- [10] E. L. Clennan and M. E. Mehrsheikh-Mohammadi. (1984). Mechanism of Endoperoxide Formation. 2. Possibility of Exciplexes on the Reaction Coordinates. *J. Org. Chem.* (49) 1321–1322.
- [11] Gollnick, K. & Griesbeck, A. (1985). Singlet oxygen photooxygenation of furans. *Tetrahedron*, 41(11), 2057–2068.
- [12] Ryter, S. W., & Tyrrell, R. M. (1998). Singlet Molecular Oxygen ( $^1\text{O}_2$ ): A Possible Effector of Eukaryotic Gene Expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 24(9), 1520–1534.
- [13] Anquez, F. & Courtade, E. (2011). Cancerous Cell Death from Sensitizer Free Photoactivation of Singlet Oxygen. *Photochem. Photobiol.*, 88(1), 167–174.
- [14] Grether-Beck, S. & Krutmann, J. (1996). Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation-and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 14586–14591.
- [15] Maldonado Alvarado, E., & Ramón Gallegos, E. (2017). Effectiveness of Photodynamic Therapy in Elimination of HPV-16 and HPV-18 Associated with CIN I in Mexican Women. *Photochem. Photobiol.* 93(5), 1269–1275
- [16] Ron R. Allison<sup>1</sup> and Keyvan Moghissi. (2013). Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc.* (46), 24–29.

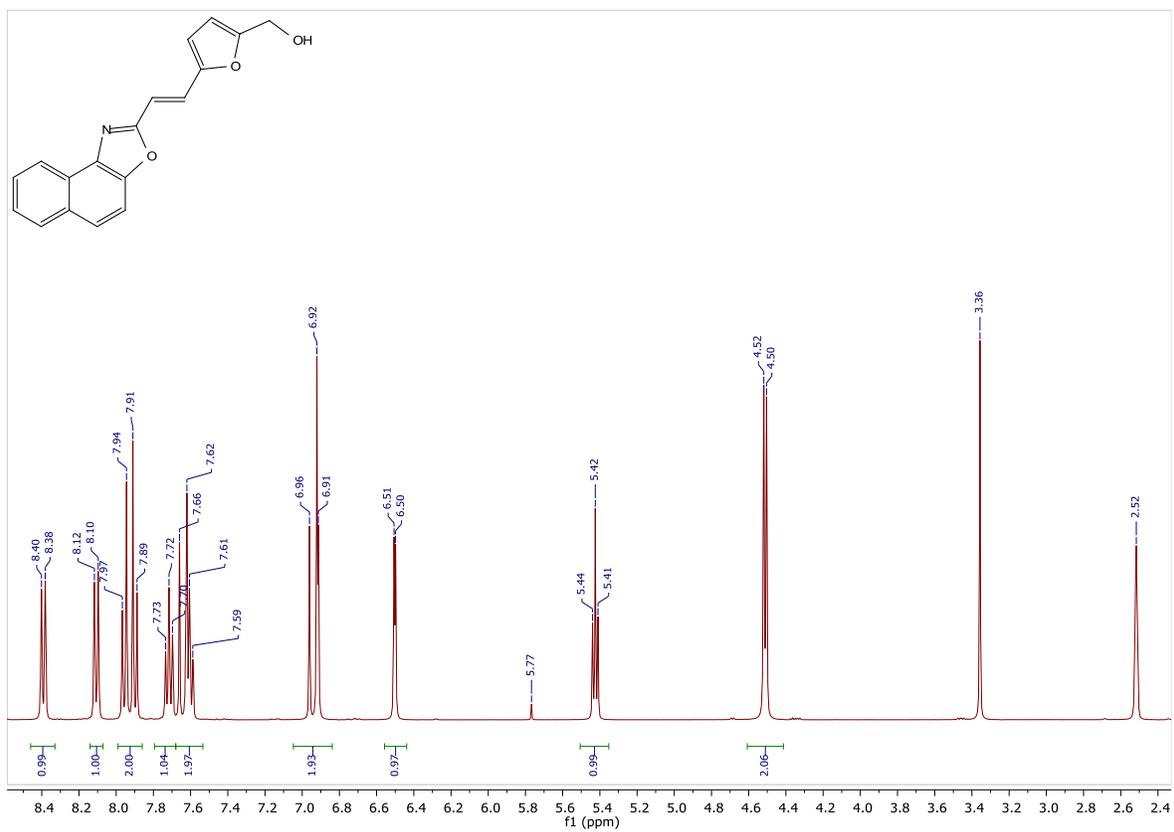
- [17] Stanisław Kwiatkowski, y Julita Kulbacka. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed. Pharmacother.* (106), 1098–1107.
- [18] Jean-Marie Aubry. (2002). Reversible Binding of Oxygen to Aromatic Compounds. *Acc. Chem. Res.* (36), 668-675.
- [19] Filatov, M. A. & Senge, M. O. (2016). Molecular devices based on reversible singlet oxygen binding in optical and photomedical applications. *Molecular Systems Design & Engineering*, 1(3), 258–272.
- [20] Maria C. DeRosa c Robert J. Crutchley. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.*, (233-234), 351–371.
- [21] Emile D. Kerver, Wilma M. Frederiks. (1997). In situ detection of spontaneous superoxide anion and singlet oxygen production by mitochondria in rat liver and small intestine. *Histochemical Journal* 29, 229–237.
- [22] Glaeser, J., Nuss, A. M., Berghoff, B. A., & Klug, G. (2011). Singlet Oxygen Stress in Microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.*, 141–173.
- [23] García Fresnadillo, D., & Sylvie Lacombe. (2016). Reference Photosensitizers for the Production. *En: Singlet Oxygen, Applications in Biosciences and Nanosciences.* (Vol. 1, pp. 105–121). Cambridge, UK. *Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences.*
- [24] Nonell, S., & Braslavsky, S. E. (2000). Time-resolved singlet oxygen detection. *En Methods in Enzymology.* Elsevier, (319), 37–49.
- [25] M. Rodgers & P. Snowden. (1982). Lifetime of ( $^1\text{O}_2$ ) in Liquid Water As Determined by Time-Resolved Infrared Luminescence Measurements. *J. Am. Chem. Soc.*, (104), 5541–5543.
- [26] Rabello, B. R. & Hioka, N. (2012). Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation. *J. Photochem. Photobiol.* 238, 53-62.
- [27] Hideg, É. (2004). Detection of free radicals and reactive oxygen species. *En R. Carpentier, Photosynthesis Research Protocols* (Vol. 274, pp. 249-260). New Jersey: Humana Press.
- [28] Kálai, T. & Hideg, K. (1998). Double (fluorescent and spin) sensors for detection of reactive oxygen species in the thylakoid membrane. *Free Radic. Biol. Med.*, 24(4), 649-652.
- [29] Soh, N. (2006). Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Anal. Bioanal. Chem.*, 386(3), 532–543.
- [30] You, Y. (2018). Chemical tools for the generation and detection of singlet oxygen. *Org. Biomol. Chem.*, 16(22), 4044–4060.
- [31] Haiyan Wu, Baoguo Xu. (2011). Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods. *Trends. Anal. Chem.* 30(1), 133–141.
- [32] Nardi, G. & Lhiaubet-Vallet, V. (2014). Scope and limitations of the TEMPO/EPR method for singlet oxygen detection: the misleading role of electron transfer. *Free Radic. Biol. Med.* (77), 64–70.
- [33] Aigner, D., Borisov & Klimant, I. (2011). New fluorescent perylene bisimide indicators a platform for broadband pH optodes. *Anal. Bioanal. Chem.* 400(8), 2475–2485.
- [34] Umezawa, N. & Nagano, T. (1999). Novel Fluorescent Probes for Singlet Oxygen. *Angew. Chem.* 38(19), 2899–2901.

- [35] Tanaka, K. & Nagano, T. (2001). Rational Design of Fluorescein-Based Fluorescence Probes. Mechanism-Based Design of a Maximum Fluorescence Probe for Singlet Oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(11), 2530–2536.
- [36] Kim, S. & Majima, T. (2013). Photochemistry of Singlet Oxygen Sensor Green. *J. Phys. Chem. B*, 117(45), 13985–13992.
- [37] Ragas, X. & Nonell, S. (2009). Singlet Oxygen Photosensitisation by the Fluorescent Probe Singlet Oxygen Sensor Green. *Chem. Commun.* 2920–2922.
- [38] Gollmer, A. & Ogilby, P. (2011). Singlet Oxygen Sensor Green: Photochemical Behavior in Solution and in a Mammalian Cell. *Photochem. Photobiol.* 87, 671–679.
- [39] Stephan K. Pedersen & Peter R. Ogilby. (2014). Aarhus Sensor Green: A Fluorescent Probe for Singlet Oxygen. *J. Org. Chem.* (79), 3079–3087.
- [40] Šimková, E. & Staněk, D. (2012). Probing nucleic acid interactions and pre-mRNA splicing by Förster resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Int. J. Mol. Sci.* 13(12), 14929–14945.
- [41] B. Song & J. Yuan. (2006). A Europium(III) Complex as an Efficient Singlet Oxygen Luminescence Probe. *J. Am. Chem. Soc.* (128), 13442–13450.
- [42] Dai, Z. & Yuan, J. (2013). A cell-membrane-permeable europium complex as an efficient luminescent probe for singlet oxygen. *J. Mater. Chem. B.* (1), 924–927.
- [43] Tan, M. & Yuan, J. (2006). A new terbium(III) chelate as an efficient singlet oxygen fluorescence probe. *Free Radic. Biol. Med.* 40(9), 1644–1653.
- [44] Ruiz-Gonzalez & R., Zanocco, A. (2016). Singlet oxygen fluorescent probes. En: Singlet Oxygen, Applications in Biosciences and Nanosciences. (Vol. 2, pp. 105–117). Cambridge, UK. Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences.
- [45] R. Ruiz-Gonzalez, S. Nonell & E. Lemp. (2013). Naphthoxazole-based singlet oxygen fluorescent probes. *Photochem. Photobiol.* (89), 1427–1432.
- [46] D. Song, Y. You & W. Nam. (2013). Ratiometric Fluorescent Probes for Detection of Intracellular Singlet Oxygen. *Org. Lett.* 14 (15), 3582–3585.
- [47] Zanocco, R. (2017). Síntesis, fotoquímica y fotofísica de furilderivados de ariloxazoles. Sensores fluorescentes de oxígeno molecular singulete (tesis doctoral). Universidad de Chile, Chile.
- [48] John W. Snyder & Peter R. Ogilby. (2005). Subcellular, Time-Resolved Studies of Singlet Oxygen in Single Cells. *J. Am. Chem. Soc.* (127), 14558–14559
- [49] Marina K. Kuimova & Peter R. Ogilby. (2009). Singlet Oxygen in a Cell: Spatially-Dependent Lifetimes and Quenching Rate Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 131(1), 332–340.
- [50] John W. Snyder & Peter R. Ogilby. (2006). '5,10,15,20-Tetrakis(N-Methyl-4-Pyridyl)-21 H,23H-Porphine (TMPyP) as a Sensitizer for Singlet Oxygen Imaging in Cells: Characterizing the Irradiation-dependent Behavior of TMPyP in a Single Cell. *Photochem. Photobiol.* (82), 177–184.
- [51] Hong-wen & Liu Xia-Bing Zhang. (2016). An efficient twophoton fluorescent probe for monitoring mitochondrial singlet oxygen in tissues during photodynamic therapy. *Chem. Comm.* 52(83), 12330–12333.
- [52] Gary E. Gibson & M. Flint Beal. (2008). Mitochondria and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1147), 1–20.

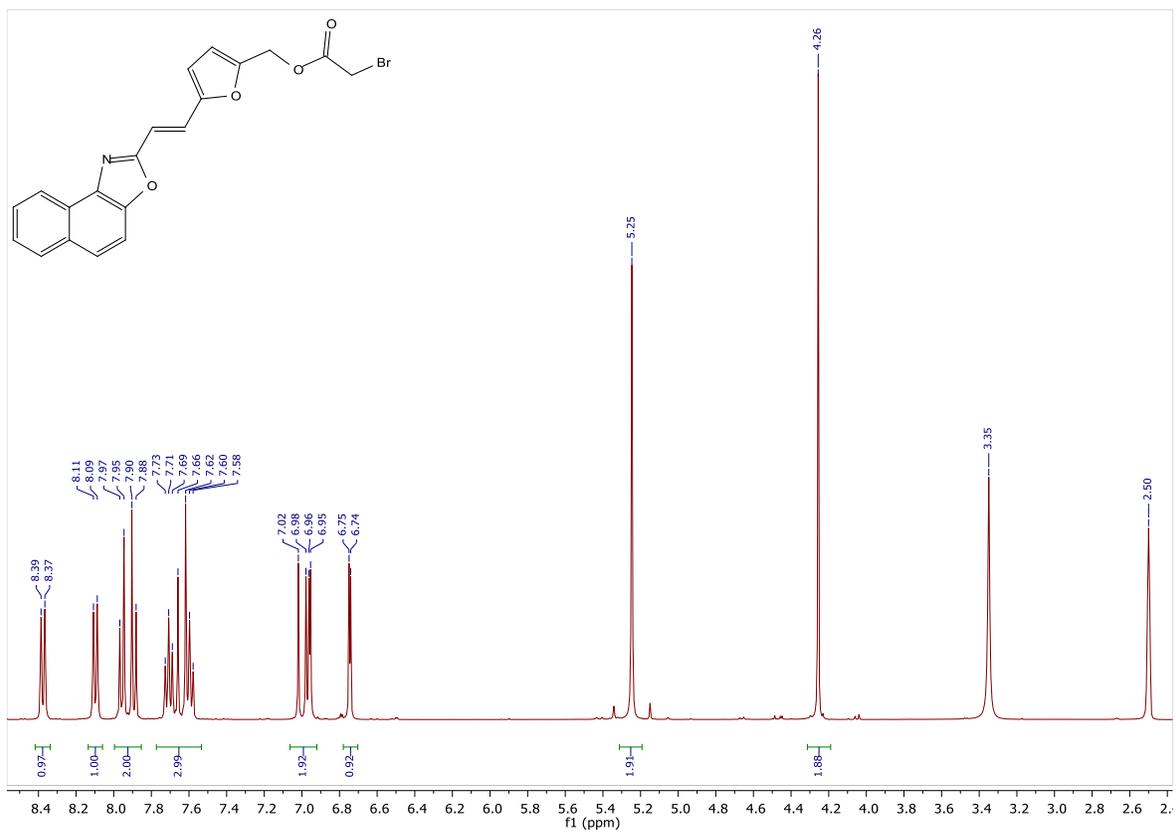
- [53] José A. Jara, Vicente Castro-Castillo & Jorge Ferreira. (2014). Antiproliferative and Uncoupling Effects of Delocalized, Lipophilic, Cationic Gallic Acid Derivatives on Cancer Cell Lines. Validation in Vivo in Singenic Mice. *J. Med.Chem.* 57(6), 2440–54.
- [54] Jacek Zielonka & Balaraman Kalyanaraman. (2017). Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chem. Rev.* (117), 10043–10120.
- [55] R. Hilf. (2007). Mitochondria are targets of photodynamic therapy. *J. Bioenerg. Biomembr.* (39), 85–89.
- [56] 12. C.-J. Zhang & B. Liu. (2015). Image-guided combination chemotherapy and photodynamic therapy using a mitochondria targeted molecular probe with aggregation induced emission characteristics. *Chem. Sci.* (6), 4580–4586.
- [57] John V. Morris, Mary A. Mahaney, and J. Robert Huber. (1976). Fluorescence quantum yield determinations. 9,10-Diphenylanthracene as a reference standard in different solvents *J. Phys. Chem.* (80), 969–974.
- [58] Kamlet, M. J.; Abboud, J. L. M.; Abraham, M. H.; Taft, R. W. (1983). Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters,  $\rho^*$ ,  $\alpha$ , and  $\beta$ , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. *J. Org. Chem.* 48: (17), 2877-2887.
- [59] G.Günther, E. Lemp. & A. Zanocco. (2000). On the use of 9,10-dimethylantracene as chemical rate constant actinometer in singlet molecular oxygen reactions. *Bio. Soc. Chil. Quim.*, 45, 637–644.
- [60] M. Zajac, & P. Zahradník. (2008). Donor– $\pi$ -acceptor benzothiazole-derived dyes with an extended heteroaryl-containing conjugated system: synthesis, DFT study and antimicrobial activity. *Tetrahedron*, 64, 10605–10618.
- [61] Zhou, S. & Liu, H. (2017). Design, synthesis and biological evaluation of 4,7,12,12a-tetrahydro-5H-thieno[3',2':3,4]pyrido[1,2-b]isoquinolines as novel adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase (AMPK) indirect activators for the treatment of type 2 diabetes. *Eur. J. Med. Chem.* 140, 448–464.
- [62] M. Curitol & A. L. Zanocco (2013) Solvent and media effects on the photophysics of naphthoxazole derivatives. *Photochem. Photobiol.* 89, 1327–1334.
- [63] Podgorski, K. & Haas, K. (2012). Ultra-Bright and -Stable Red and Near-Infrared Squaraine Fluorophores for In Vivo Two-Photon Imaging. *PLOS One*, 7(12), e51980.
- [64] Chuan-Zeng W. & Takehiko Y. (2018). Two-Photon-Absorption Properties of Pyrene-Based Dipolar D-p-A Fluorophores. *ChemPhotoChem*, 2, 749–756.

# ANEXOS

Espectro  $^1\text{H-NMR}$  de FN-11, (*E*)-2-(2-(5-hidroximetil-fur-2-il)vinil)nafto[1,2-d]oxazol.



Espectro  $^1\text{H-NMR}$  de C (*E*)-(5-(2-(nafto[1,2-d]oxazol-2-il)vinil)furan-2-il)2-bromoacetato de metilo.



Espectro  $^1\text{H-NMR}$  de FN-12 (*E*)-(2-((5-(2-(nafto[1,2-d]oxazol-2-il)vinil)furan-2-il)metoxi)-2-oxoetil)trifenilfosfonio.

